

UNIVERSIDAD DE NAVARRA
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología



**Universidad
de Navarra**

**“Inyección intraarticular de células madre
mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea en
el tratamiento de la artrosis de rodilla: Ensayo clínico
multicéntrico aleatorizado (Fase I/II)”**

Clinical Trials.gov identifier: NCT02123368
Nº EudraCT: 2009-017624-72

**Trabajo presentado por D. José María Lamo de Espinosa Vázquez de Sola
para optar al grado de Doctor en Medicina**

Bajo la dirección de los doctores,
D. Juan Ramón Valentí Nin
D. Froilán Granero Moltó

Pamplona, 2017

A mi madre, porque solo ella sabe el camino recorrido juntos, de Madrid a Pamplona, hasta hoy.

A mis hermanos, Emilio y Álvaro, por su generosidad mostrada todo este tiempo de ausencia en casa.

A la Universidad de Navarra, por darme la oportunidad de formarme como persona y médico.

A mis directores de tesis. Al Dr. Valentí, por su pasión, motivación y confianza. Ejemplo de vida profesional y personal. Al Dr. Granero, al que he conocido y descubierto más durante la realización de este trabajo. Sin su experiencia profesional, su disponibilidad y conocimiento hubiera sido mucho más difícil haber llegado a este momento.

Al Dr. Mora, agradecido por guiar el proyecto y confiar en mí desde el inicio, cuando era un residente joven, para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Prósper, estímulo constante, que ha hecho crecer en mi el interés hacia la investigación.

A los pacientes anónimos. Su interés por nuestro trabajo y su participación en el ensayo es fundamental para seguir avanzando hacia el futuro.

A los Departamentos de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hematología, Radiología, Área de Terapia Celular y Unidad de Ensayos Clínicos de la Clínica Universidad de Navarra y del Hospital Universitario de Salamanca y a todos los que han estado de una u otra forma implicados en este proyecto, porque sin ellos, nada de esto sería posible.

A mi mujer, Elena, por darle a todo sentido. Perdón por haberte robado tantas horas.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	8
1.1.- Definición y epidemiología de la artrosis.....	8
1.2.- El cartílago sano: Metabolismo y Función Biomecánica.....	9
1.2.1- Metabolismo del cartílago articular.....	9
1.2.2- Función biomecánica.....	12
1.3.- El camino hacia la artrosis de rodilla.....	14
1.3.1- Fisiopatología de la artrosis.....	14
1.3.2.- El papel del hueso subcondral.....	17
1.3.3.- El papel de la Membrana sinovial.....	21
1.3.4.- Cambios moleculares en la artrosis.....	24
1.3.5- La artrosis como enfermedad inflamatoria.....	27
1.4.- Tratamientos actuales en la artrosis de rodilla.....	29
1.4.1.- Ejercicio y órtesis.....	29
1.4.2.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y derivados opioides.	30
1.4.3.- Condroprotectores.....	31
1.4.4.- Infiltración corticoanestésica.....	32
1.4.5.- Viscosuplementación.....	33
1.4.6.- Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	36
1.4.7.- Otros tratamientos no quirúrgicos de la artrosis.....	37
1.4.8.- Tratamiento Quirúrgico.....	38
1.5.- Células Troncales o Células Madre Mesenquimales.....	39
1.5.1.- Definición e Historia.....	39
1.5.2.- Propiedades de las célula madre mesenquimales.....	40
1.5.2.1- Actividad Inmunomoduladora.....	40
1.5.2.2.- Autorrenovación y regeneración tisular.....	44
1.5.3.- Células madre mesenquimales como medicamento.....	47

1.5.4.- Fuentes de obtención.....	48
1.5.4.1.- Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSCs).....	48
1.5.4.2.- Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	49
1.5.4.3.- Células madre mesenquimales derivadas de membrana sinovial.....	49
2 .- HIPÓTESIS.....	50
3.- OBJETIVOS.....	52
3.1.- Objetivo Principal.....	52
3.2.- Objetivos Secundarios.....	52
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
4.1.-Grupos de tratamiento.....	55
4.2.-Fases del ensayo clínico.....	55
4.3.-Variables principales de valoración.....	56
4.3.1-Seguridad y viabilidad.....	56
4.3.2-Valoración clínica.....	56
4.3.3-Valoración Radiológica.....	57
4.4.-Cultivo celular.....	59
4.5.-Administración del tratamiento.....	60
4.6.-Cálculo del tamaño muestral.....	60
4.7.-Análisis estadístico.....	61
5.- RESULTADOS.....	63
5.1.-Datos demográficos.....	63
5.2.-Seguridad.....	64
5.3.-Valoración clínica.....	65
5.4.-Rango articular de la rodilla.....	69
5.5-Resultados Radiológicos: interlínea articular y Resonancia Magnética (Protocolo WOMS).....	70

6.- DISCUSIÓN.....	72
6.1.-MSCs vs Implantación de condrocitos autólogos.....	72
6.2.- Seguridad: reacciones adversas vistas en la administración de las MSCs.....	74
6.3.-Viabilidad del procedimiento.....	76
6.4.-Dolor y función articular.....	78
6.5.-Radiología.....	81
6.6.-Dosis óptima de MSCs.....	81
6.7.-Cuestiones futuras sobre el uso de las MSCs en el tratamiento de la artrosis.....	83
6.8.-Estudios comparativos de las fuentes.....	84
7.- CONCLUSIONES.....	87
REFERENCIAS.....	88
ANEXOS.....	118
ANEXO I: Criterios para el diagnóstico de artrosis (ACR, American College of Rheumatology).....	118
ANEXO II: Clasificación radiográfica de la Artrosis de Kellgren & Lawrence.....	119
ANEXO III: Calendario de visitas.....	120
ANEXO IV: Eficacia del tratamiento evaluada por la escala KOOS.....	121
ANEXO V: Resultado de la escala WORMS (Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score).....	123
ANEXO VI: Artículo Publicado.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ADAMTS-12	A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin motif 12
ADMSCs	Células Madre Mesenquimales derivadas de tejido Adiposo
AH	Acido Hialurónico
ASPN	Asporina
BM-MSCs	Células Madre Mesenquimales derivadas de Médula Ósea
BMP	Proteína Morfogénica Ósea
CILP	Proteína de la Capa Intermedia del Cartílago
CFU-f	Unidad Formadora de Colonias-fibroblasto
CMM	Células Madre Mesenquimales
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CS	Condroitín Sulfato
CUN	Clínica Universidad de Navarra
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
EVA	Escala Visual Analógica
GDF5	Factor de Crecimiento y Diferenciación 5
GMP	Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practices)
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
IGF-I	Factor de Crecimiento similar a la Insulina I
MMPs	Metaloproteinasas
MO	Médula ósea
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa Beta
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
QS	Queratán Sulfato
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TLR	Receptor similar a Toll
VDR	Receptor de la vitamina D
WORMS	Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Definición y epidemiología de la artrosis.

La artrosis es un proceso de carácter crónico-degenerativo en el que participa el cartílago articular, el hueso subcondral y la membrana sinovial. Debido a su naturaleza avascular y la limitada capacidad de autorrenovación de los condrocitos, el cartílago articular presenta una limitada capacidad de reparación. Los tratamientos actuales tienen carácter paliativo y su objetivo es tratar el dolor, sin tener efecto en la progresión natural de la enfermedad [1]. En casos de artrosis severa, la artroplastia, sustituyendo la articulación, sigue siendo la única opción terapéutica [2].

La artrosis afecta a más de 28 millones de personas en Estados Unidos, siendo la causa principal de más del 50% de las artroplastias de cadera y rodilla, lo que supone un coste global anual (directo e indirecto) de 1500 millones de dólares [3]. En Europa, la artrosis de rodilla afecta a 70 millones de personas, lo que supone un coste directo de más de 2000 millones de euros. Las previsiones calculan que en el año 2030 un 20% de la población adulta en Europa Occidental y Norte América habrá desarrollado artrosis de rodilla dolorosa, por encima de 2,5 en la escala analógica visual (EVA), y/o impotencia funcional, duplicando la prevalencia del año 2004 [4]. El coste sanitario generado por la artrosis rivaliza incluso con los costes sanitarios de la cardiopatía isquémica, lo cual hace hincapié en la acuciante necesidad de nuevos y más eficaces tratamientos para estas lesiones articulares [5, 6].

La mayoría de personas por encima de los 65 años muestran signos radiográficos de artrosis en al menos una o más articulaciones. A pesar de que el nivel de degradación articular es muy variable para cada persona, la sintomatología está presente en el 60% de los hombres y el 70% de las mujeres en edades por encima de los 65 años, suponiendo la causa más frecuente de incapacidad física en adultos mayores de 50 años. De manera global, y según la Organización Mundial de la Salud, la artrosis de rodilla y cadera suponen la undécima causa de discapacidad.

A pesar de ser poco frecuente por debajo de los 40 años, su incidencia en las personas jóvenes está aumentando.

1.2.- El cartílago sano: Metabolismo y Función Biomecánica.

1.2.1- Metabolismo del cartílago articular.

En los adultos, la matriz del cartílago articular se separa de los espacios vasculares subcondrales por la placa subcondral. La nutrición del cartílago articular se produce, por tanto, por difusión desde el líquido sinovial. La matriz del cartílago restringe el paso de nutrientes por tamaño, carga y configuración molecular. Se estima que el tamaño medio de los poros dentro de la matriz extracelular (MEC) es de aproximadamente 6 nm [7-9]. Sin un suministro directo de los nutrientes de la sangre vasos o linfáticos, los condrocitos dependen principalmente del metabolismo anaeróbico.

El condrocito es el tipo de celular residente en el cartílago articular. Los condrocitos son células altamente especializadas, metabólicamente activas, jugando un papel único en la síntesis, mantenimiento y reparación de la MEC.

Los condrocitos se originan a partir de células madre mesenquimales y constituyen aproximadamente el 2% del volumen total de cartílago articular [10]. Los condrocitos tienen un potencial limitado de replicación, lo que contribuye a una capacidad intrínseca limitada de reparación del cartílago en respuesta a una lesión. La supervivencia de los condrocitos depende por tanto de un entorno químico y mecánico óptimo. Cada condrocito establece un microambiente especializado y es responsable del mantenimiento de la MEC en sus inmediaciones. Este microentorno atrapa esencialmente al condrocito dentro de su propia matriz y por lo tanto evita cualquier migración a las zonas adyacentes de cartílago. Es raro que los condrocitos formen contacto célula-célula para la transducción de señales directas entre ellas. Por el contrario, el condrocito es capaz de responder a una variedad de estímulos como son los factores de crecimiento, la carga mecánica, los estímulos y fuerzas piezoeléctricas y las presiones hidrostáticas [11].

Como decimos, la actividad metabólica de los condrocitos está alterado por la presencias de factores químicos y mecánicos dentro de su ambiente circundante. Las citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 (Interleucina 1) y TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa), tienen efectos catabólicos y anabólicos sobre el condrocito, participando en la degradación y la síntesis de las macromoléculas que componen la MEC [11].

Un número de factores de crecimiento y péptidos reguladores han sido implicados en la regulación del metabolismo de proteoglicanos, incluyendo el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), TGF- β , IL-1 y TNF- α . Se sabe muy poco sobre el mecanismo molecular por el cual estos factores de

crecimiento y péptidos provocan sus efectos sobre el metabolismo de proteoglicanos.

Los condrocitos están protegidos de las fuerzas biomecánicas por la MEC circundante. La homeostasis de ese medio regula el metabolismo de la MEC equilibrando la degradación y síntesis de las diferentes macromoléculas. Un dato interesante es que se estima que la renovación o recambio de los proteoglicanos presentes en la MEC puede tardar hasta 25 años mientras que la vida media de colágeno se estima en un rango de varias décadas [12].

Las proteasas son las principales enzimas involucradas en el recambio de la MEC. Especialmente las metaloproteinasas (MMPs; principalmente colagenasa, gelatinasa, y estromelisina) y las catepsinas (catepsina B y D). La colagenasa degrada las fibras de colágeno helicoidal nativo. La gelatinasa degrada las cadenas de colágeno de tipo IV y II desnaturalizado; asociando también una actividad significativa contra la fibronectina, elastina y colágenos tipo V, VII, X, y XI. El rol de la estromelisina y catepsinas es degradar el núcleo de la proteína de agregano. Todas las MMPs son secretadas como proenzimas latentes que requieren la activación extracelular.

El movimiento y la carga sobre la articulación son importantes para el mantenimiento de la estructura y función del cartílago. La inactividad de la articulación se ha demostrado que conduce a la degradación de cartílago, por una disminución de la difusión y circuito de nutrientes desde el líquido articular al interior del cartílago [11]. Ese equilibrio conjunto del movimiento y la carga dinámica es importante para el mantenimiento del cartílago articular sano. El desarrollo de la artrosis, se asocia con cambios drásticos en el metabolismo del

cartílago en un desequilibrio fisiológico entre la degradación y la síntesis por parte de los condrocitos [13].

1.2.2- Función biomecánica.

El cartílago articular es un cartílago hialino de unos 2-4 mm de grosor. Es un tejido avascular, carente también de vasos linfáticos y nervios. En su composición destacan 2 partes, una matriz extracelular (MEC), compuesta fundamentalmente por agua, colágeno, proteoglicanos, proteínas no colagénicas y glicoproteínas y una matriz celular, en los que destacan los condrocitos dispuestos en una determinada distribución y orientación. La disposición de la MEC y de los condrocitos es altamente especializada, confiriendo al cartílago sus propiedades viscoelásticas únicas.

La función principal del cartílago es la de proporcionar una superficie lisa, lubricada, de bajo rozamiento que facilite la transmisión de cargas al hueso subcondral subyacente. El cartílago articular es único en su capacidad para soportar altas cargas cíclicas [11, 14, 15].

El comportamiento biomecánico del cartílago articular es mejor entendido cuando hablamos de él como medio bifásico. El cartílago articular consta de 2 fases, una fase líquida y una fase sólida. El agua es el componente principal de la fase líquida, contribuyendo hasta en un 80% del peso total del tejido. Aproximadamente el 30% de esta agua se encuentra embebida en el espacio interfibrilar del colágeno, un pequeño porcentaje en el espacio intracelular. El resto está contenido en el espacio de la matriz [16, 17]. Los iones inorgánicos tales como sodio, calcio, cloruro y potasio también se encuentran en esta fase.

La concentración de agua relativa tiene una distribución asimétrica, pasando desde el 80% en la zona superficial al 65% en la capa profunda [11]. La fase sólida se caracteriza por la MEC, que es porosa y poco permeable [18-20].

La relación entre los agregados de proteoglicano y el líquido intersticial proporciona resistencia a la compresión del cartílago a través de las fuerzas de repulsión electrostáticas [9]. La aplicación inicial y rápida de fuerzas durante la carga, provoca un aumento inmediato de la presión del líquido intersticial. Este incremento local de la presión hace que el líquido fluya fuera de la MEC [21-23].

Cuando la carga de compresión es eliminada, el líquido intersticial fluye de vuelta al intersticio. La baja permeabilidad del cartílago articular impide que el líquido fluya rápidamente desde el interior al exterior de la MEC [24]. El hueso subcondral participa de manera activa evitando la deformidad mecánica del cartílago.

El cartílago articular es viscoelástico y exhibe una capacidad para la deformación en presencia de carga [23]. La matriz pericelular, que es una capa fina adyacente a la membrana celular y que rodea completamente al condrocito, contiene principalmente proteoglicanos, glicoproteínas y otras proteínas no colágenas. Esta región de la matriz juega un papel funcional para iniciar la transducción de señales dentro del cartílago cuando es estimulado con la carga [25]. La matriz territorial rodea la matriz pericelular; está compuesta principalmente de fibras de colágeno finas, formando una red (que han descrito como semejante a una canasta de baloncesto) alrededor de los condrocitos [26-28]. Esta región es de mayor grosor que la matriz pericelular y

parece tener un papel en la protección de las células contra las agresiones mecánicas contribuyendo a la elasticidad de la estructura de cartílago articular y su capacidad para soportar cargas [29]. La región interterritorial es la de mayor grosor y la que más contribuye a las propiedades biomecánicas del cartílago articular [30]. Esta región se caracteriza por los haces aleatoriamente orientados de grandes fibras de colágeno, dispuestas en paralelo a la superficie de la zona superficial, de forma oblicua en la zona media, y perpendicular a la superficie de la articulación en la zona profunda. Los proteoglicanos son abundantes en la zona interterritorial.

Dos tipos de mecanismos son responsables de la viscoelasticidad en el cartílago articular: El primero es flujo-dependiente y el segundo es flujo-independiente. El mecanismo flujo-dependiente es debido al líquido intersticial y la resistencia de fricción asociada al movimiento de este [31]. El componente flujo-independiente es el producido por el movimiento macromolecular, especialmente por el comportamiento viscoelástico intrínseco del colágeno-proteoglicano. La presión aplicada sobre el componente líquido da un soporte que reduce la presión sobre el componente sólido de la MEC.

1.3.- El camino hacia la artrosis de rodilla.

1.3.1.- Fisiopatología de la artrosis.

A pesar de que clásicamente la artrosis de rodilla no se ha encuadrado dentro de las enfermedades inflamatorias, por no tener presentes leucocitos en el líquido sinovial, sabemos que existe un grado de inflamación suficiente como

para promover los síntomas que ésta asocia y acelerar el proceso degenerativo [32-34]. Nos encontramos ante un proceso complejo que implica tanto al sistema inmune innato como al adaptativo, detectándose elevados niveles de citoquinas y factores de la inflamación en el líquido sinovial [34].

La artrosis tiene una influencia genética no desdeñable. Son numerosos los genes que han sido descritos en la enfermedad, llegando incluso a definir una influencia de estos hasta de un 70% para desarrollar una artrosis sintomática.

El análisis del genoma ha llevado a identificar polimorfismos o mutaciones en genes implicados en la artrosis, que influyen y participan tanto en la síntesis de la matriz extracelular como las señales de las vías de inflamación. Los principales genes identificados en el desarrollo del proceso degenerativo son metaloproteinasa con motivo trombospondina 12 (ADAMTS-12), proteína de la capa intermedia del cartílago (CILP), el receptor de la vitamina D (VDR), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la asporina (ASPN), el factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5) y el receptor de la IL4. El polimorfismo rs20417 situado en el promotor del gen de la COX-2, se relaciona con al riesgo genético de desarrollar artrosis de cadera y rodilla. Sin embargo, la correlación con la expresión de los niveles de PGE2 en el líquido sinovial no han sido bien demostradas [35].

Los productos catabólicos derivados de la matriz extracelular del cartílago parecen tener un papel importante en la activación de los macrófagos y células de la inmunidad innata, presentes en la sinovial con componente inflamatorio, para comenzar a liberar citoquinas, las cuales van a promover la progresión en el daño del cartílago y la alteración de la función de los condrocitos [36]. El

grado de sinovitis observado en pacientes con artrosis es menor que el observado en pacientes afectados de artritis reumatoide, pero los primeros contienen una mayor cantidad de citoquinas. La membrana sinovial de los pacientes afectados de artrosis de rodilla presenta infiltrado celular asociado a la expresión de citoquinas proinflamatorias, que incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-22. Esa activación del sistema innato inmune, contribuye a la persistencia del grado de inflamación.

No está bien definido el mecanismo por el cual interactúa el cartílago con el sistema inmunitario en la fase más aguda del proceso, pero parece que existe una influencia tanto de la vía del complemento como de la ruta de la coagulación en el líquido sinovial [37].

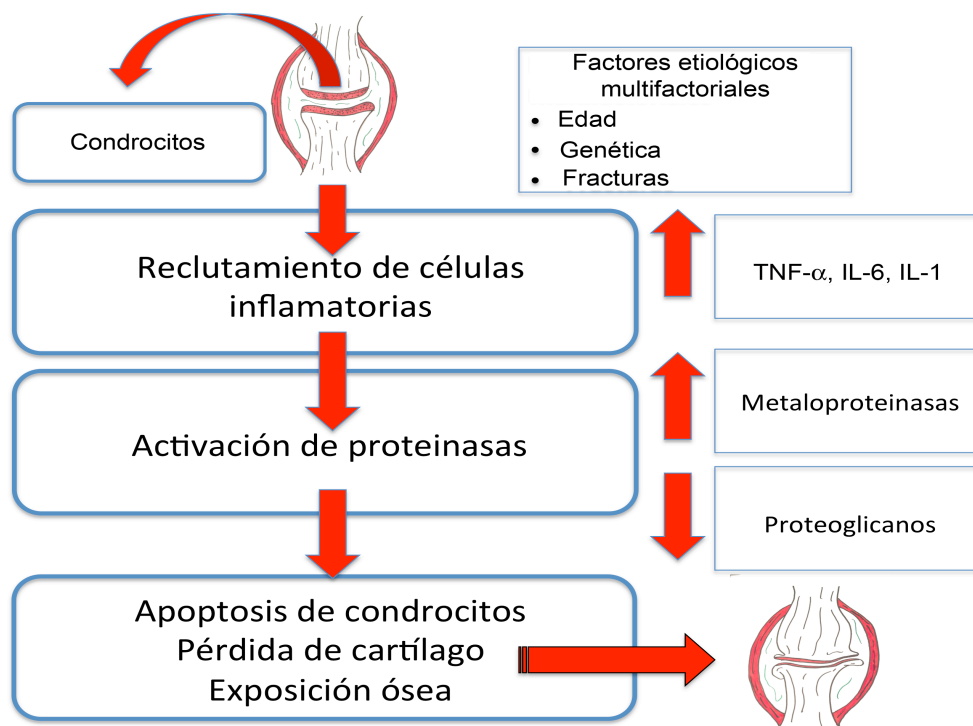


Figura 1. Patogénesis de la artrosis. Múltiples factores etiológicos participan en la artrosis y degradación del cartílago. Está presente una respuesta inflamatoria con aumento de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-1, activación de proteinasas, lo que lleva hacia un aumento del anabolismo de los condrocitos y a la pérdida gradual del mismo con la subsecuente exposición del hueso subcondral. (Modificada de Gupta *et al.* 2012).

Se ha aceptado que el primer daño del cartílago y matriz extracelular viene marcado por microtraumas repetidos que sobrepasarían el umbral que son capaces de tolerar los condrocitos en estado quiescente. Ese estrés inducido, lleva al aumento de los niveles de los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, Damage-associated Molecular Patterns) las cuales son capaces de activar el sistema inmune a través de los receptores tipo Toll (TLR, Toll-like receptors) [38]. Los DAMPs son moléculas que incluyen proteoglicanos, proteínas intracelulares y ADN. Los DAMPs son capaces de activar la liberación de alarminas (high mobility group box protein 1 S100A8 y S100A9) por parte de los monocitos, contribuyendo a la continuar la cascada de la inflamación. Ese proceso inflamatorio va a llevar a los condrocitos y monocitos a liberar enzimas que incrementaran el metabolismo catabólico. Estas enzimas liberadas incluyen Disintegrina A y la familia de las ADAMTS y las MMPs las cuales son directamente responsables del remodelamiento de la MEC. Debemos remarcar en este sentido que existen células MSCs en el líquido sinovial, cuyo papel en la artrosis no está claro, pudiendo ser únicamente productos de la degradación del tejido articular.

1.3.2.- El papel del hueso subcondral.

Junto con el cartílago articular, el hueso subcondral forma parte de la llamada unidad osteocondral. Cada vez se le da más importancia al papel que juega el hueso subcondral en el desarrollo de la artrosis, dándole un papel fundamental en la cronología inicial de la misma.

El hueso subcondral se puede dividir en dos partes, la zona cortical y la

esponjosa. La zona cortical, altamente mineralizada, está compuesta por osteonas, los cuales, a su vez se componen de un canal de Havers central conteniendo nervios y capilares, comunicándose entre sí por medio de los canales de Volkmann. El hueso trabecular, por su parte, se compone de grandes cavidades con un nivel de mineralización del hueso total alrededor del 15-25% con respecto al cortical. Las cavidades son irregulares, variando en cuanto a forma y volumen en referencia a su posición con respecto a la articulación, siendo mayores en regiones más profundas, conformando la conocida como esponjosa subarticular [39]. Por lo tanto, la cortical subcondral y el hueso esponjoso son arquitectónicamente, fisiológica y mecánicamente diferentes, respondiendo de manera diferente en el desarrollo de la artrosis [40].

En los años 70 Radin identificó por primera vez al hueso subcondral como factor clave en la iniciación y progresión de la artrosis, teorizando que la carga articular repetitiva provocaría microfracturas trabeculares en el hueso subcondral [41, 42]. Se creía que la reparación de estas microfracturas aumentaba la rigidez del hueso subcondral, lo cual variaría la mecánica en la absorción del impacto sobre el cartílago, llevando a acelerar el proceso degenerativo. Sin embargo, con el tiempo se ha revelado que el hueso subcondral, en la artrosis, disminuye su rigidez en los momentos iniciales [43, 44].

Actualmente se acepta una división del proceso fisiopatológico de la artrosis en 2 fases, la fase temprana y la fase final, que permiten comprender mejor los cambios que sufre el hueso subcondral. La artrosis temprana se define

clínicamente con la aparición del dolor. El estudio radiográfico muestra cambios menores, y las alteraciones en el cartílago y hueso subcondral solo se aprecian mediante resonancia magnética y/o artroscopia de rodilla [45, 46]. En apoyo de estos hallazgos se encuadrarían los estudios por gammagrafía o estudios longitudinales en artrosis por rotura del ligamento cruzado, los cuales sugieren que los cambios en el hueso subcondral preceden a la degeneración del cartílago articular en el comienzo de la artrosis [47, 48] .

Los procesos de remodelación juegan un papel crucial en la patogénesis de la artrosis temprana y el desarrollo de los cambios en el hueso subcondral. La activación de los centros de osificación secundarios, por ejemplo, debido a microfracturas subcondrales, dan como resultado la resorción ósea protagonizada por los osteoclastos seguida por la formación de hueso por los osteoblastos. Mientras que esta secuencia de remodelación es equilibrada bajo condiciones normales, la tasa de recambio óseo aumenta de tres a cinco veces en la fase inicial de la artrosis. Las causas del aumento del remodelado óseo incluyen procesos de señalización celular para la reparación de estas lesiones, la invasión vascular secundaria al aumento de factores angiogénicos y la alteración de la estructura de las comunicaciones fisiológicas hueso-cartílago o microfracturas [49-52]. Estas altas tasas de recambio óseo, con un aumento de la resorción con respecto a la osteoformación, resultan en una disminución final de la rigidez ósea [53]. Además, el aumento de la vascularización del hueso subcondral disminuye el depósito óseo y reduce el grosor final del hueso subcondral [54].

De manera relacionada, datos experimentales recientes sugieren que los

condrocitos hipertróficos del cartílago artrósico pueden diferenciarse a osteoblastos, obteniendo así directamente la capacidad de formación de hueso [55, 56]. Tal osificación da como resultado un aumento del grosor de la línea calcificada (tidemark). Este proceso contribuye a aumentar la tensión mecánica en las zonas profundas del cartílago hialino articular, lo que contribuye a la aceleración del proceso artrósico [53].

En el estadio tardío de la artrosis, el recambio óseo disminuye. Esto permite un aumento en la depósito óseo, dando como resultado un aumento del grosor y densidad de la placa ósea subcondral, lo que se objetivará en la radiografía como esclerosis subcondral [57]. En esta fase, los osteoblastos producen colágeno de tipo I $\alpha 1$ homotrímico, el cual es distinto al heterotrímico $\alpha 1/\alpha 2$ de las rodillas no artrósicas [58, 59]. Este colágeno de tipo I $\alpha 1$ homotrímico tiene menor afinidad para la captación de calcio [60]. Este hecho podría resolver la paradoja del aumento de grosor y del hueso subcondral asociada a la disminución de la mineralización ósea y de la rigidez en las fases finales de la artrosis. En condiciones normales el hueso subcondral absorbe entre 30 a 50% de la carga y el cartílago sólo del 1 al 3%. Cuando el hueso subcondral se esclerosa disminuye su capacidad de absorber esta energía en un 50%. Por lo tanto, la energía de la carga se disipa a otras partes del hueso y al cartílago, deteriorando aun más este tejido.

Durante el proceso artrósico se han descrito cambios fenotípicos en los osteoblastos. Además del ya referido colágeno tipo I homotrímico, los osteoblastos producen mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8 y PGE-2 así como numerosos factores de crecimiento asociados al desarrollo

de la artrosis [61]. Los factores más importantes descritos en este sentido son TGF- β , IGF-I, HGF y leptina, con efecto sobre los condrocitos del cartílago articular [62-65]. El TGF- β actúa activando (vía señal p-Smad 1/5/8) e inhibiendo (vía p-Smad 2/3) la diferenciación terminal del condrocito. Se ha sugerido que un cambio en la señal del TGF- β desde la vía p-Smad 2/3 a la vía de p-Smad 1/5/8 juega un papel importante al alterar el comportamiento del condrocito articular, con el consiguiente desarrollo de artrosis [66]. El HGF aumenta la producción de colagenasa 3, enzima que actúa directamente sobre el colágeno de tipo II [67, 68].

La leptina sérica se encuentra elevada en pacientes obesos con artrosis sintomática [69]. La leptina realiza su efecto proinflamatorio mediante la activación de los linfocitos T, el aumento de TNF- α , precediendo a la activación de las células NK y los neutrófilos [70].

El papel *in vivo* de IGF-I en la artrosis no está todavía claro. Sus niveles se encuentran elevados en el líquido sinovial de los pacientes afectados de artrosis de rodilla y parece que su influencia proartrósica se basa en su actuación sobre el osteoblasto artrósico, el cual presenta una respuesta anormal al IGF-I, aumentando el remodelado óseo [71].

1.3.3.- El papel de la Membrana sinovial.

Inicialmente se pensaba que la membrana sinovial tenía un papel menor, si es que jugaba algún papel, en la patogenia de la artrosis. Hoy en día, sin embargo, es evidente que la membrana sinovial juega un papel relevante en la patogenia de esta enfermedad. Especialmente en etapas tardías, se puede

observar una clara inflamación de la misma (sinovitis) y la producción de mediadores inflamatorios, los cuales influirían en el desarrollo de la enfermedad. Existe una buena correlación entre la presencia de sinovitis, la progresión de la enfermedad y el daño al cartílago. Conaghan *et al.* mostraron que la presencia de derrame articular era un buen predictor de artroplastia de rodilla en los siguientes tres años [72].

La membrana sinovial normal se compone de 1 a 4 capas de células adheridas a una capa profunda de fibrocolágeno, la cual contiene además de fibroblastos, adipocitos, mastocitos y macrófagos. La membrana sinovial presenta una rica vascularización e inervación.

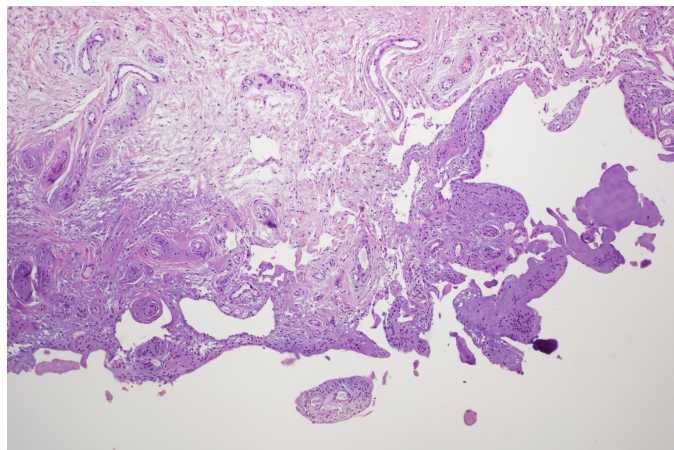


Figura 2. Aspecto histológico de membrana sinovial de rodilla de paciente artrósico. En ella se aprecia la presencia de sinovitis.

A partir de biopsias de la membrana sinovial de rodillas artrósicas se han demostrado varios cambios que, aunque más pronunciadas en la artrosis avanzada, están presentes desde las primeras etapas del proceso artrósico. Estos cambios incluyen el engrosamiento de la capa superficial, el aumento de la vascularización y la infiltración por células inflamatorias [73-75].

El estándar de oro para el diagnóstico de sinovitis es la histología. La histología de la membrana sinovial en la artrosis de rodilla muestra un menor grado de inflamación que en la artritis reumatoide, pero con un gran espectro de variación que va desde una hiperplasia de la sinovial, a lo más frecuente, la sinovitis difusa [73, 76]. El trabajo de Blom *et al.* del año 2007 en modelo de ratón con artrosis, un modelo de silenciamiento génico de MMP-3 (knockout), nos puso en aviso en el papel esencial de la activación de los macrófagos en la sinovial para el daño del cartílago a través de la producción de metaloproteinasas (MMPs), lo que sugiere que la inflamación dentro de la membrana sinovial puede ser crucial para el daño del cartílago [77].

Los mecanismos responsables de la sinovitis en la artrosis involucran algunas rutas de la inflamación semejantes a las que participan en la artritis reumatoide. En especial la inmunidad innata. Recientes datos han mostrado que fragmentos de matriz extracelular son reconocidos por receptores de la inmunidad innata, los denominados Toll-Like receptors (TLR), los cuales reconocen patrones (pattern recognition). La activación celular mediada por este proceso termina entre otros y de forma preponderante con la activación del Factor Nuclear Kappa-B (NF- κ B), el cual es un estimulador de la secreción de citoquinas inflamatorias, responsables de producir daño tisular. Muchas de las MMPs son dependientes de la actividad del NF- κ B.

Las principales citoquinas inflamatorias involucradas como producto de la sinovitis que pueden alterar al cartílago son:

- La IL-1 puede inducir destrucción articular *in vitro*. La estimulación de la vía IL-1 β suprime la síntesis de agreganos y colágeno por los condrocitos y

estimula la producción de enzimas proteolíticas como MMP-13 y ADAMTS-4. Sin embargo, no se ha mostrado consistentemente una elevación de IL-1 β en pacientes con artrosis. En este sentido, se ha mostrado que en la artrosis están elevados los niveles de un antagonista natural de esta IL-1, el antagonista del receptor de IL-1.

- El TNF- α es detectable en líquido sinovial de pacientes con artrosis. Al igual que la IL-1, el TNF- α puede activar un proceso catabólico mediado por proteasas producidas por el condrocito. Sin embargo, al igual que con IL-1, los estudios clínicos con inhibidores de estas citoquinas han producido resultados poco alentadores.

1.3.4.- Cambios moleculares en la artrosis.

En ausencia de lesión articular, los condrocitos se encuentran en un estado quiescente, en reposo, manteniendo una baja tasa de renovación de las proteínas que componen la MEC [78, 79]. Con la aparición de la artrosis, los condrocitos comienzan a agruparse, “clusters”, acompañados de un aumento de la prevalencia de la actividad catabólica de las enzimas que degradan la matriz extracelular sobre la actividad anabólica [33, 80, 81]. La expresión de las enzimas que degradan la matriz es alimentada además por un aumento en la expresión de factores de crecimiento y la aparición de la inflamación [53, 80]. Las principales enzimas implicadas en esta actividad catabólica son las metaloproteinasas de matriz (MMP), una familia de nueve o más endopeptidasas capaces de escindir la mayor parte de los componentes de MEC [82]. Es conocido que, en condiciones normales, estas enzimas se expresan en un nivel bajo en condrocitos y células sinoviales [83]. Sin

embargo, en el cartílago artrósico, existe un aumento en la cantidad de MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13 y MMP-14, las cuales actúan en la degradación de un amplio espectro de sustratos como son el colágeno de tipos I, II, III, V, VI, VII, X y XI, fibronectina, elastina y proteoglicanos, los principales componentes que mantienen la integridad del cartílago articular [79, 82, 84].

Estudios en humanos y animales han demostrado que la MMP-13 tiene un papel fundamental en la degradación del colágeno tipo II [85]. La expresión anormal de MMP-13 se ha demostrado aumentada entre un 4% y un 20% en grupos de pacientes artrósicos [86]. Estudios de expresión génica mediante microarrays y RT-PCR han puesto de relieve el papel de la MMP-13 como una colagenasa importante, con aumento moderado de su expresión en las primeras etapas de la artrosis y que se sobre-expresa en etapas avanzadas [86, 87].

En las primeras etapas de la artrosis, la degradación de los proteoglicanos, fundamentalmente el agregano, es causada por otras proteasas, las agreganasas, tales como la A-Disintegrinas y las ADAMTS [88]. Dos miembros de la familia de ADAMTS (ADAMTS-4 y ADAMTS-5) tienen un papel reconocido en la artrosis [89]. Se ha demostrado que ambas enzimas escinden agreganos, aunque con mayor prevalencia de ADAMTS-4 [88]. Sin embargo, en modelos quirúrgicos de artrosis en ratones “*knockout*” para ADAMTS-4, sin expresión global de la ADAMTS-4, no se observó diferencia significativa en la progresión y la gravedad de la artrosis después de ser inducida [78].

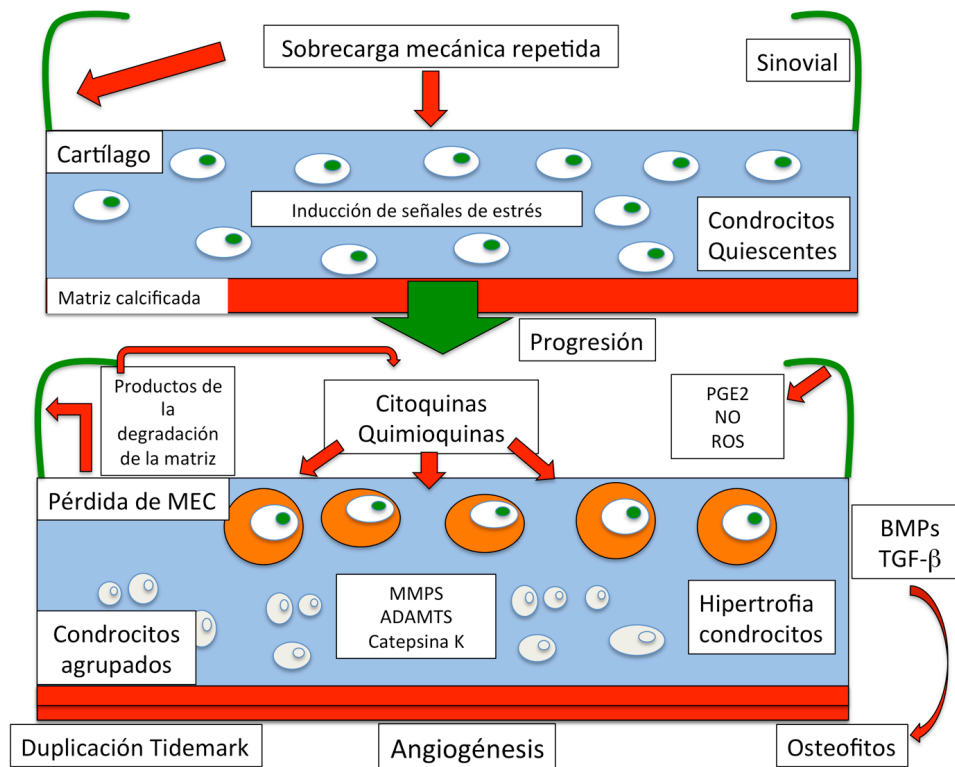


Figura 3. Los condrocitos (en estado quiescente) y células sinoviales responden al estrés inducido por la sobrecarga mecánica, aumentando la producción de citoquinas, mediadores de la inflamación y de la degradación del cartílago (proteinasas), fruto de la activación de las señales de estrés inducidas. Esos productos de la degradación de la matriz extracelular producen un “feedback” positivo para el aumento de factores anabólicos (BMPs y TGF- β), los cuales participan en la formación de osteofitos. De la misma manera, se producen de manera paralela cambios en los condrocitos con aumento de la proliferación (clustering, agrupaciones de condrocitos), cambios del fenotipo (hipertrofia), aumento de la línea calcificada y la aparición de microfracturas las cuales llevarán de manera secundaria a un aumento de la vascularización (angiogénesis) en el espacio subcondral. (Modificada de Goldring *et al.* 2007).

Por el contrario, los ratones *knockout* para ADAMTS-5 mostraron una reducción significativa en la severidad de la destrucción del cartílago en comparación con ratones de tipo salvaje [90]. Estudios recientes han puesto de relieve la contribución de ambas enzimas en la degradación del cartílago, de manera individual y combinada [91]. Aunque ambas enzimas parecen estar implicadas en la destrucción del cartílago, con prevalencia de la ADAMTS-5 su contribución todavía sigue no está bien establecida (Figura 3) [87].

1.3.5- La artrosis como enfermedad inflamatoria.

Durante mucho tiempo, se ha aceptado que la inflamación está ausente o débilmente presente en la artrosis [92]. Sin embargo, muchos estudios han confirmado la presencia de células inmunes y citocinas proinflamatorias en los tejidos sinoviales de pacientes con artrosis [93-97]. Tal es la importancia de esta inflamación, que en un estudio prospectivo sobre 600 pacientes, la presencia de hidrops se mostró como predictor independiente de artroplastia de rodilla en los siguientes tres años [72]. No se ha explicado claramente el porqué de la presencia de esta inflamación de la sinovial. La hipótesis más aceptada es que, una vez degradados, los fragmentos de cartílago flotan en la articulación, tomando contacto con la membrana sinovial. Al entrar en contacto con estos fragmentos, las células sinoviales reaccionan mediante la producción de mediadores inflamatorios (Prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS)), que conducen a la activación adicional de los condrocitos por MMPs, con el aumento de la degradación del cartílago [92]. Se ha determinado un aumento en la producción de IL-1 β y TNF- α en la artrosis, cuando lo comparamos con articulaciones sanas. Además, cuando se realiza la inyección intraarticular de IL-1 β y TNF- α se induce la pérdida de proteoglicanos [98]. La alta densidad de los receptores de interleukina-1 (IL-1R) en el cartílago artrósico aumenta la sensibilidad de los condrocitos de este tipo de rodillas a esta citocina [99]. La terapia génica que utiliza un antagonista del IL-1R reduce la expresión de Colagenasa 1 y previene el desarrollo y progresión de la enfermedad [100-102]. Debemos remarcar que bajo una mayor expresión de IL-1 los niveles de prostaglandina E2 aumentan [103].

En contraste con IL-1, se ha descrito que PGE2 participa de manera positiva en la expresión de colágeno de tipo II, jugando un papel importante en la recuperación de la MEC [104]. Otra vía de retroalimentación se produce a través de un aumento de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) [105, 106]. Las BMPs son factores de crecimiento de la superfamilia de TGF- β , que juegan un papel crucial tanto en la condrogénesis como en la inducción de la síntesis de proteoglicanos [107, 108]. Las BMPs estimulan tanto la síntesis de matriz por parte de los condrocitos como la posterior diferenciación terminal. Esta diferenciación terminal de los condrocitos es seguida por la expresión de MMP-13 y, por lo tanto, la degeneración de la matriz [108].

La función principal de las BMPs en la artrosis no está bien establecida. Uno de los principales factores de transcripción, SOX9, implicado en la regulación de la condrogénesis mesenquimal, la expresión de colágeno tipo II y agregano está regulada en parte por las BMPs y TGF- β [80]. El principal inhibidor de la expresión SOX9 es NF- κ B, el cual está regulado principalmente por el TNF- α y la IL-1 β [109]. Es decir, en un ambiente rico en TNF- α e IL-1, la expresión de SOX9 quedaría disminuida.

Se requiere la activación de NF- κ B y de la proteína quinasa mitogénica (MAPK) para que los condrocitos expresen MMPs, ADAMTSs así como el resto de citocinas inflamatorias ya descritas [110, 111]. Los estudios *in vitro* sugieren que NF- κ B es el inductor de Factor Inducible por Hipoxia 2 alfa (HIF-2 α), el cual es un activador de los genes implicados en la hipertrofia de los condrocitos, entre los que se encuentran *COL10A1*, *MMP13* y *VEGF* [112].

En resumen, el equilibrio anabólico-catabólico está bajo la influencia de una red compleja de señales que regulan la homeostasis del tejido cartilaginoso [80]. La actividad catabólica se incrementa drásticamente en presencia de la inflamación derivada de la degeneración del cartílago artrósico [113]. Debido a su baja tasa de renovación, los condrocitos no son capaces de responder y sustituir la pérdida de la MEC [114].

1.4.- Tratamientos actuales en la artrosis de rodilla.

Aunque la artrosis afecta a gran proporción de la población, no existe todavía una terapia médica que permita modificar claramente el curso natural de la enfermedad.

El tratamiento debe ser global, individualizado, iniciarse por medidas no farmacológicas orientadas a eliminar o disminuir la causa desencadenante (modificación de actividades), así como en el tratamiento de las enfermedades metabólicas o endocrinológicas que exacerban la artrosis.

Las opciones de tratamiento farmacológico son limitadas y paliativas e incluyen analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos, fármacos denominados “condroprotectores” (glucosamina, condroitín sulfato, diacereína) y las inyecciones intraarticulares de corticoides, ácido hialurónico (AH) o plasma rico en plaquetas. Todos ellos tienen un objetivo analgésico y antiinflamatorio [115-118].

1.4.1.- Ejercicio y órtesis.

El deporte de bajo impacto y el ejercicio aeróbico podría tener su valor en la reducción del dolor y mejora de la función en pacientes con artrosis incipiente

de la rodilla. Más específicamente, parece que los ejercicios de fortalecimiento parecen tener un efecto superior en el dolor que el ejercicio aeróbico en los resultados funcionales a largo plazo [119].

Existen en el mercado órtesis enfocadas a la transmisión controlada de las fuerzas, que podrían tener su función en artrosis unicompartmentales mediales, las órtesis en valgo. Estas órtesis reducen el momento en varo y con ello la carga que debe soportar el compartimento medial. Son más efectivas que cuando las comparamos con las rodilleras de compresión con o sin barras laterales [120]. Dicho esto, existe una limitada evidencia respecto a su efectividad cuando la comparamos con placebo [120, 121].

El uso de plantillas de soporte del arco longitudinal y valguizantes con cuña externa, podrían tener su valor en las artrosis mediales, con grado de evidencia B.

1.4.2.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y derivados opioides.

El tratamiento farmacológico antiinflamatorio es actualmente pieza fundamental para el tratamiento de la artrosis sintomática. Los antiinflamatorios no esteroideos reducen de manera estadísticamente significativa el dolor cuando es comparado con el placebo y paracetamol, aunque en muchas ocasiones su magnitud clínica no es importante [119]. Otras opciones ampliamente utilizadas incluyen a los inhibidores de la COX-2. EL uso de analgésicos opioides quedaría restringido para pacientes con artrosis avanzada y dolorosa, no candidatos a intervención quirúrgica, y cuyo dolor no ha mejorado con las mediadas descritas [122].

1.4.3.- Condroprotectores.

Los fármacos llamados condroprotectores tienen una eficacia relativa y muy variable. Su empleo sigue siendo controvertido [123-126].

Los condroprotectores se consideran fármacos de acción lenta cuyo objetivo primordial es la de frenar en las etapas iniciales la progresión de la artrosis. Entre las sustancias condroprotectoras se encuentran la glucosamina, el condroitín sulfato y la diacereína. La glucosamina es un amino-azúcar, precursor de uno de los principales componentes de la matriz extracelular del cartílago [122]. El efecto que parece tener en la artrosis esta asociado a la diferencia de los resultados entre los estudios financiados por la industria y los que no lo están, haciendo su uso controvertido [127]. Lo mismo ocurre con el condroitín sulfato, que es también un componente importante de la matriz extracelular [122, 127]. Parece que la eficacia de estos tratamientos se relacionaría con el producto, su dosis y el grado de artrosis en el momento del tratamiento, sugiriendo que sería más eficaz en grados incipientes de artrosis (Kellgren-Lawrence II) [128].

Una reciente revisión Cochrane, apoyó algunos efectos positivos del condroitín a corto plazo, resultados que parecen optimizarse con la asociación de condroitín con glucosamina, que proporcionaría resultados incluso comparables a los AINEs, con menos efectos adversos a los descritos en el tratamiento continuo de estos [45, 129, 130]. La OARSI (Osteoarthritis Research Society International) indica en sus guías, elaboradas con la evidencia publicada, que el tratamiento con glucosamina y/o condroitín sulfato puede proporcionar un beneficio sintomático en pacientes con artrosis de rodilla. En caso de no haber

respuesta evidente dentro de los 6 meses de tratamiento debe interrumpirse [131].

1.4.4.- Infiltración corticoanestésica.

Los corticoides intraarticulares han sido utilizados desde el año 1951 y su eficacia está basada en la acción anti-inflamatoria local, minimizando los posibles efectos que se pudieran presentar al usarlos de manera sistémica. A pesar de presentar una buena eficacia a corto plazo, su uso repetido es controvertido [122]. Las dosis terapéuticas eficaces podrían contribuir a la degeneración del cartílago, sobre todo cuando es usado en combinación con lidocaína, habiéndose sido descrita citotoxicidad contra los condrocitos *in vitro* [132].

La indicación ideal pudiera ser en pacientes en los que la primera línea de tratamiento ha fallado, y existe inflamación o sinovitis [133].

Su uso en pacientes diabéticos, en presencia de lesiones cutáneas o en caso de sospecha de infección queda restringido [134].

Respecto al tipo de corticoide utilizado parece que la Triamcinolona es más eficaz que la Betametasona con mejores resultados respecto al placebo en la reducción del dolor y la evaluación global del paciente [122]. En estudios recientes parece que su efecto sería de menos duración a los publicados con PRP y la viscosuplementación, aunque en este punto la controversia de los resultados es todavía mayor [135-137].

En los últimos años existe una corriente positiva en su uso, como respuesta a la inflamación aguda postraumática en rodillas artrósicas, en estadios iniciales

de artrosis para disminuir la concentración de MMPs y citocinas inflamatorias implicadas en el desarrollo inicial del daño articular. Se abre, por lo tanto, el paradigma del uso de los corticoides [138, 139].

1.4.5.- Viscosuplementación.

El ácido hialurónico (AH) fue por primera vez usado en 1960 y aplicado en el primer ensayo en humanos para el tratamiento de la artrosis en 1974, siendo el concepto de viscosuplementación aprobado por la “Food and Drug Administration” para el tratamiento de la artrosis de rodilla en 1997 [140].

El AH intraarticular se emplea habitualmente como un tratamiento seguro y fácilmente disponible para la artrosis de la rodilla, pero su eficacia sigue siendo discutida.

Se han propuesto dos mecanismos de acción:

1) Mecánico-Físico: Reemplaza el líquido articular artrósico con una mayor concentración de ácido hialurónico, mejorando la viscosidad, restableciendo la capacidad de absorción de impactos y de lubricación que se ve reducida en el líquido sinovial y mantiene una capa como límite en torno a los nociceptores, reduciendo la inducción de dolor.

2) Fisiológico: Induce la biosíntesis de ácido hialurónico y otros componentes de la matriz extracelular, reduce la pérdida de proteoglicanos en el cartílago y la apoptosis de condrocitos. Disminuye la actividad celular inflamatoria y disminuye los mediadores del dolor.

La administración exógena de AH podría reducir la producción y actividad pro-inflamatoria de mediadores y MMPs, favoreciendo la producción de AH por los

condrocitos así como la síntesis de proteoglicanos, incluso actuando sobre el comportamiento de las células inmunes presentes. El AH juega un papel importante en la modulación de la hidratación y balance osmótico del cartílago articular, aunque su efecto *in vivo* no sea tan claro [141].

En adultos con rodillas no artrósicas, la concentración de AH varía desde 2.5 a 4.0 mg/ml, decreciendo en rodillas artrósicas un 33-50% [122]. Existen numerosas formulaciones en el mercado, que difieren tanto en peso molecular, método de preparación y dosis, no existiendo una conclusión clara de superioridad de unos respecto a otros [122].

En general, se piensa que formulaciones con pesos moleculares menores de 500 kDa no son eficaces en el control del dolor y mejoría de la actividad, mientras que pesos moleculares entre 500-4000 kDa podrían actuar sobre los receptores de membrana celulares. Esto explica que las formulaciones actuales van desde 500 hasta 6000 kDa de peso molecular. A pesar de todo, no se ha demostrado que el aumento de peso molecular se relacione con mayor eficacia clínica [122]. Del mismo modo, no existe evidencia que apoye claramente que la viscosuplementación influya en la progresión natural de la artrosis. Existen tanto estudios favorables como desfavorables en este sentido, basándose en métodos cuantitativos de biomarcadores de la degradación del cartílago [142, 143].

Independientemente del mecanismo de acción y la controvertida acción modificadora de la enfermedad, el AH se utiliza actualmente en la práctica clínica habitual con el objeto de disminuir el dolor y mejorar la función.

La revisión Cochrane en 2006 ha mostrado efectos beneficiosos sobre el dolor y función de la rodilla concluyendo que en circunstancias específicas puede ser eficaz, con mejores resultados a largo plazo que la inyección intraarticular de corticoides [144, 145]. Una revisión sistemática de los metaanálisis publicados hasta la fecha comparó el tratamiento de la artrosis de rodilla con la inyección intraarticular de AH frente a los AINEs orales, inyección intraarticular de corticosteroides, inyección intraarticular de plasma rico en plaquetas (PRP) e inyección intraarticular de placebo llegando a la conclusión de que la inyección intraarticular de AH es una opción correcta para la artrosis de rodilla, con mejoras en el dolor y la función de la rodilla que pueden persistir durante un máximo de 26 semanas [135]. En contra, en otro metaanálisis reciente, los beneficios clínicos de la administración intraarticular de AH eran mínimos o inexistentes, desaconsejando su uso por el mayor riesgo de eventos adversos graves que beneficio [146]. La viscosuplementación está contraindicada durante el embarazo o lactancia, en pacientes pediátricos, en casos de infección articular, bacteriemia y enfermedades de la piel. Además, se han descrito reacciones alérgicas y tóxicas derivadas de las principales fuentes de obtención (marisco y cresta de gallo) [122].

Por lo tanto existe actualmente una situación de contradicción. Aunque en las guías de 2010 la OARSI la denominaba potencialmente útil en pacientes con artrosis de rodilla y cadera, en las directrices del año 2016 se sugiere que los datos de los ensayos más rigurosos no mostraron una diferencia significativa frente al placebo, por lo tanto, no recomienda su uso en articulaciones artrósicas. La Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS)

determinó un grado de evidencia C, lo que lleva a no poder realizar una recomendación a favor o en contra del uso de éste. En la misma línea, el Colegio Americano de Reumatología (ACR, American College of Rheumatology) no aboga por el uso del AH para el tratamiento inicial de la artrosis de rodilla. Sin embargo, recoge un supuesto condicionado para su uso: pacientes que no han presentado una respuesta satisfactoria al paracetamol o AINES. En estos casos contemplan el uso de tramadol, duloxetina o la inyección intraarticular de AH [147].

1.4.6.- Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto autólogo derivado de la sangre, con una concentración plaquetaria superior a la de la sangre periférica y preparada mediante centrifugación de la misma. Se han descrito más de 500 factores de crecimiento presentes en el producto final, entre otros el factor de crecimiento endotelial (VEGF), TGF- β , IGF-I o PDGF, pero son como decimos, muchos más los factores y citocinas presentes en el producto final. El alto número de indicaciones y su uso extendido llevó a la administración a considerarlo desde el año 2013 como medicamento de uso humano en España. No siendo aplicables a ellos ni los aspectos regulatorios de un medicamento de fabricación industrial ni el de los medicamentos de terapia avanzada, como son las células madre mesenquimales cultivadas (*Resolución AEMPS por la que se establece el uso terapéutico no sustitutivo del plasma autólogo y sus fracciones, componentes o derivados como medicamento de uso humano; 23 de Mayo 2013*).

La evidencia actual sugiere que el PRP favorece la condrogénesis y por lo tanto la regeneración al tiempo que aumenta la producción de AH [148]. Las inyecciones de PRP en la rodilla parecen obtener mejores resultados que el AH y el placebo en el control del dolor y la mejoría funcional durante los primeros 6 meses [149-151]. Su influencia en la historia natural de la artrosis no está determinada, siendo más probable el efecto anti-inflamatorio el que puede explicar la mejoría sintomática, aunque ni siquiera esta está bien demostrada [149].

La multiplicidad de procedimientos (abiertos/cerrados, con o sin leucocitos, mayor o menor contenido plaquetario), el modo de aplicación y los pocos ensayos clínicos publicados, y el pequeño tamaño de la muestra de los que han sido publicados, hace que sea difícil obtener conclusiones sobre ellos.

La Agencia Española del Medicamento anima a los investigadores a realizar estudios de calidad metodológica alta con el objetivo de garantizar su eficacia (*Informe de la AEMPS sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas; 23 de Mayo 2013*).

1.4.7.- Otros tratamientos no quirúrgicos de la artrosis.

La diacereína es un inhibidor de la IL-1, citoquina proinflamatoria que juega un papel fundamental para el desarrollo de la artrosis, como hemos explicado previamente. La Cochrane publicó un beneficio sintomático mínimo en la reducción del dolor, con poca o nula actividad en la progresión de la enfermedad [127]. Los efectos secundarios, tales como problemas

gastrointestinales son comunes, lo que llevó a la EMA (Asociación Europea del Medicamento) a recomendar su suspensión en Europa [152].

Los bifosfonatos se han sugerido recientemente como agentes modificadores de la enfermedad [153]. En particular, el Risedronato ha demostrado reducir el marcador de la degradación del cartílago tipo II, CTX-II. Sin embargo, aún no existe una recomendación para su uso [127].

La vitamina D también se ha postulado como tratamiento válido para la artrosis. Basado en la influencia conocida de la vitamina D en el metabolismo óseo, estudios epidemiológicos han sugerido un ritmo más lento en progresión de la artrosis [154]. Estudios futuros deben clarificar el papel de esta vitamina, la dosis efectiva y su influencia en los marcadores.

Varios suplementos dietéticos (S-adenosilmetionina, lípido insaponificable de aguacate, vitaminas B, C, E, mejillón de labios verdes y Metilsulfonilmetano), así como productos de herboristería (polvo de rosa mosqueta, jengibre, extractos de corteza de sauce del diablo y gugal salai), se han estudiado y algunos de ellos se utilizan clínicamente en el tratamiento de la artrosis de rodilla, pero su evidencia médica es insuficiente para ser recomendado [122, 155].

1.4.8.- Tratamiento Quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico en la artrosis de rodilla viene determinado por los síntomas específicos del paciente y su limitación en la vida diaria, sus características basales, una adecuada exploración física y una correlación en las pruebas por imagen. Mientras que los pacientes jóvenes pueden

beneficiarse de la realización de osteotomías alrededor de la rodilla o prótesis unicompartmentales. En pacientes con grados avanzados de artrosis, mayor edad y mayor deformidad de eje, la prótesis total de rodilla es la medida más adecuada. En el tratamiento de la artrosis de rodilla la realización de desbridamientos o lavados articulares en pacientes con grados avanzados de artrosis no se ha mostrado superior al tratamiento con placebo, como se ha descrito en diferentes estudios aleatorizados. En el mejor de los casos, el lavado artroscópico conseguirá una mejoría temporal [149].

En definitiva, en estadios avanzados, la prótesis total de rodilla sigue siendo el tratamiento más efectivo para la artrosis de rodilla.

1.5.- Células Troncales o Células Madre Mesenquimales.

1.5.1.- Definición e Historia.

Las MSCs son células multipotentes, capaces de diferenciarse a estirpes celulares de la misma capa embrionaria. Identificadas por primera vez en la médula ósea por Friedenstein *et al.* (1966), fueron denominadas en ese momento células clonogénicas precursoras de fibroblastos (CFU-f) [156]. En el año 1973 Caplan obtuvo la primera evidencia de la capacidad que tenían para diferenciarse a cartílago, hueso, músculo y grasa, introduciendo el término célula madre mesenquimal al inicio de los años 90 [157].

La Sociedad Internacional de terapia celular ha caracterizado y definido los criterios que definen a las MSCs [158, 159] :

1. Deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones estándares de cultivo.

2. Deben expresar los marcadores CD105, CD73, y CD90 y ser negativos para CD45, CD34, CD14 (o CD11b), CD79a (o CD19), y HLA-DR.
3. Deben ser capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos *in vitro*.

Atendiendo a esta definición, sólo un 0,001% de las células mononucleares presentes en la médula ósea se pueden considerar células madre mesenquimales, por lo que el número de células que podemos encontrar en un aspirado de médula ósea es muy limitado en comparación con las que podemos obtener tras el cultivo de las mismas [158, 160-162].

La aplicación experimental y clínica de estas células se ha extendido en el campo de la medicina regenerativa y de la bioingeniería [163]. Su capacidad de adhesión al plástico facilita que puedan ser aisladas y expandidas en cultivo lo que favorece su utilización.

En un principio, estas células sin especialidad conocida, son consideradas quiescentes, pero con capacidad de renovarse. Su división asimétrica produce una célula troncal idéntica y una segunda progenitora encomendada en dar lugar a una línea celular diferenciada específica [164].

1.5.2.- Propiedades de las célula madre mesenquimales.

1.5.2.1- Actividad Inmunomoduladora.

Las MSCs están involucradas en el mantenimiento y regeneración del tejido conectivo, teniendo capacidad para la migración a los tejidos lesionados o con proceso inflamatorio activo, donde pueden participar en la reparación de los mismos [165-167].

La capacidad anti-inflamatoria viene definida por su capacidad inmunomoduladora sobre las células que participan en la inflamación. La administración endovenosa de las MSCs mejora la función renal, la lesión neuronal y pulmonar en modelos animales experimentales con lesión en esos tejidos, principalmente a través de efectos paracrinicos con un cambio de la producción de citoquinas anti-inflamatorias en el lugar de la lesión [168-170].

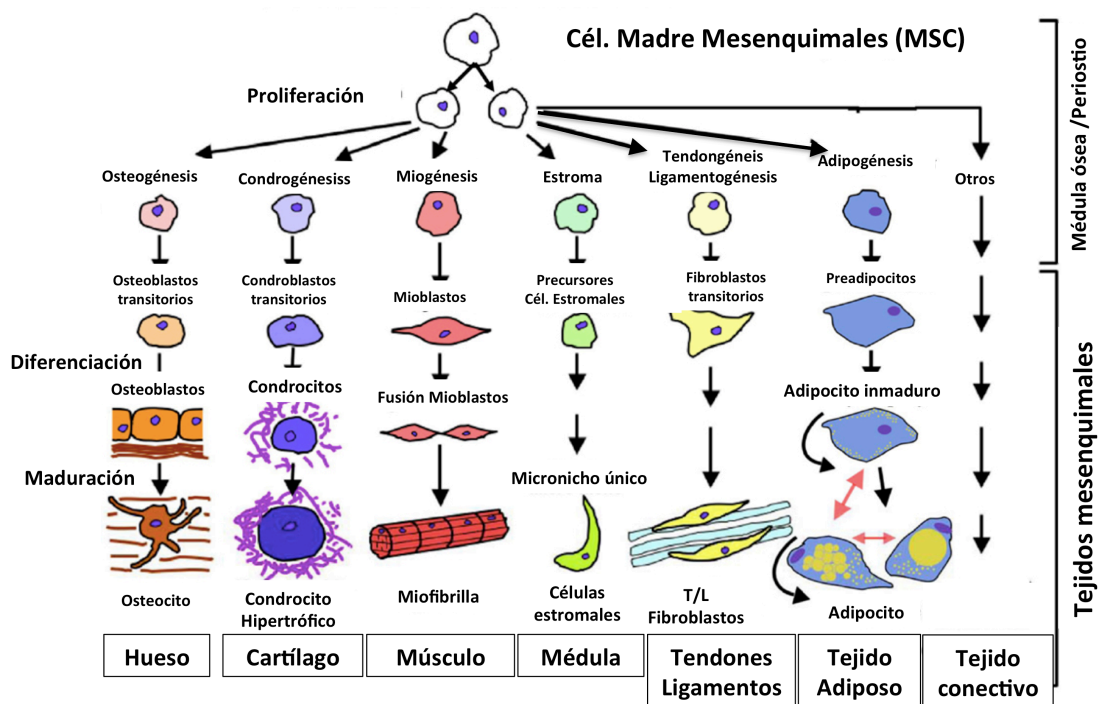


Figura 4. Las MSCs son células multipotentes, capaces de diferenciarse a estirpes celulares dentro de la misma capa embrionaria (mesodérmica). (Modificada de Caplan AI 2007)

Las MSCs son capaces de producir gran número de citoquinas con poder anti-inflamatorio, incluyendo, PGE2, GM-CSF, IL-1RA, IL-7, IL-8, IL-10 y IL-11, así como SDF-1 y factores de crecimiento [171-174]. A través de esa función paracrina inmunomoduladora, las MSCs desarrollan su capacidad para inhibir

la proliferación de linfocitos T CD4+ y T CD8+, así como linfocitos B y células NK “natural killer” [175]. Esa capacidad de actuación sobre los linfocitos T y macrófagos podría ser la clave en la reducción de la inflamación, suprimiendo su actividad. Debemos recordar que son células que están presentes en la membrana sinovial de las rodillas artrósicas y que participan de manera importante en perpetuar el proceso [176]. Una de las cuestiones todavía a esclarecer es su hipotética capacidad de frenar el proceso artrósico.

Una característica importante de las MSCs, y que las hacen casi exclusivas, es la propiedad de no expresar el complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH-II), con lo que con su implantación no se provoca una respuesta de los linfocitos T del receptor. De manera adicional, las BM-MSCs no presentan las moléculas de co-estimulación que son requeridos por los linfocitos T para su activación. Con estos datos, podemos sugerir que su uso en el trasplante alogénico puede ser seguro como ya se ha empleado en trabajos previos [164, 177-179].

En ratones la inyección intraarticular de MSCs disminuye la lesión condral en análisis histológicos. Bajos niveles de S100A8 y S100A9 e IL-1 fueron detectados horas después de la inyección de MSCs, sugiriendo una menor activación de los macrófagos [180]. En conejos, Desando *et al.* demostraron que la inyección intraarticular de MSCs inhibe la progresión de la artrosis, asociado a un descenso en la escala Laverty a 16 semanas de su administración, respecto al grupo control con placebo [181]. Una correlación con el descenso en la expresión de TNF- α y MMP-1 se determinó de manera paralela en los grupos de tratamiento a las 16 y 24 semanas. Es interesante

señalar, que en el grupo de dosis baja celulares (2×10^6 células), la reducción de MMPs y TNF- α en menisco y membrana sinovial era más efectivo que en el grupo de dosis alta (6×10^6 células). Esto nos hace pensar, que el efecto de las MSCs no sólo sería interesante por la potencial capacidad de diferenciación condrogénica, sino por sus propiedades anti-inflamatorias y, de manera consecuente, en su actividad en la reducción de la progresión de la artrosis. En cuanto a la dosis efectiva, el efecto paradójico observado plantea dudas en cuanto a la dosis necesaria para ser efectiva.

Esta propiedad inmunomoduladora de las MSCs ha sido investigada en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la enfermedad injerto contra huésped (EICH) [182]. La EICH es la principal complicación de los trasplantes alogénicos de médula ósea y de otros tejidos u órganos que contienen células de estirpe linfoide. Las diferencias antigénicas entre la médula del donante y los tejidos del receptor hacen que con frecuencia las células T de la médula del donante reconozcan los tejidos corporales del receptor como extraños. Cuando esto sucede, los linfocitos T del donante desencadenan una respuesta inmune celular, manifestándose finalmente como un síndrome agudo que afecta a la piel, hígado, tracto gastrointestinal y médula ósea, que puede comprometer la vida del paciente. La co-infusión de MSCs alogénicas junto con HSC ha demostrado reducir la incidencia y gravedad de la EICH [183].

La citoquinas y moléculas implicadas en la actividad antiinflamatoria de las MSCs están resumidas en la Figura 5.

1.5.2.2.- Autorrenovación y regeneración tisular.

El proceso de autorrenovación se refiere a la ruta biológica y mecanismos que preservan las células troncales indiferenciadas. Todo el aparato genómico ha sido usado para identificar las posibles moléculas que mantienen a las células troncales, incluyendo las MSCs. Entre los factores definidos se encuentran: LIF, EGF, HGF, PDGF [184].

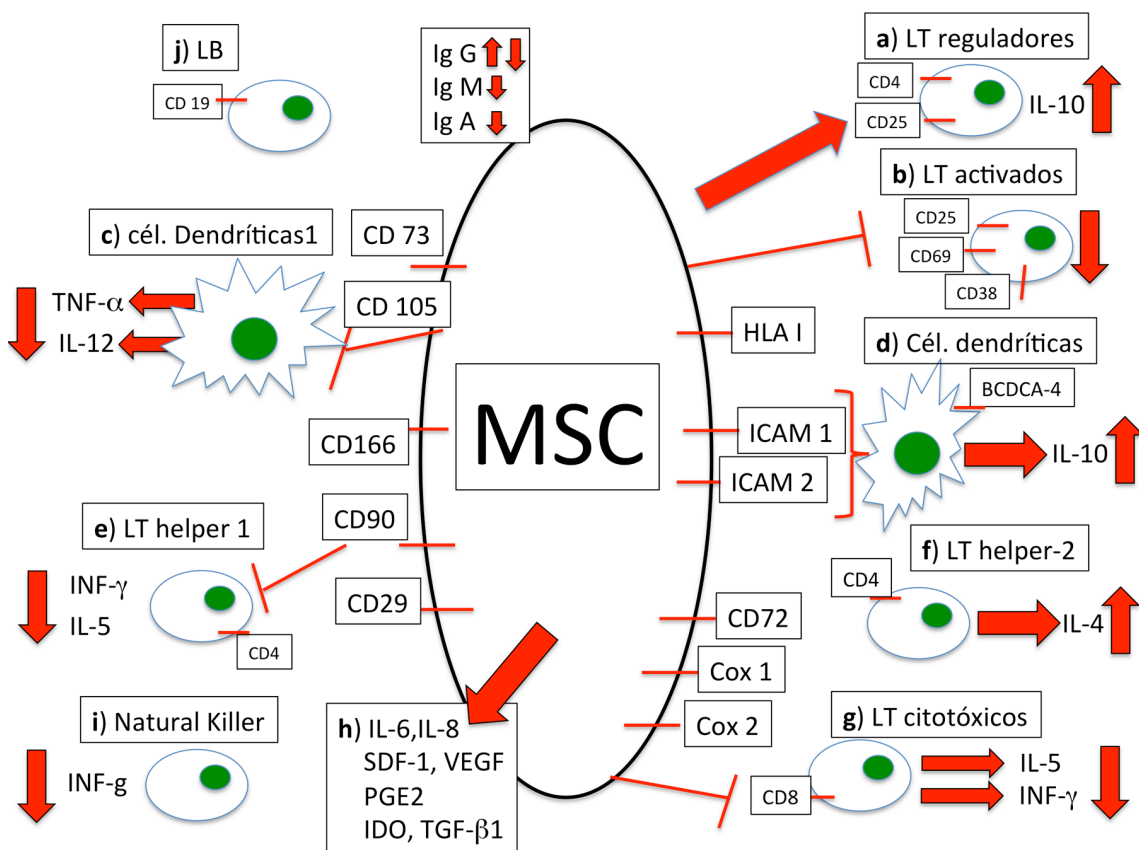


Figura 5. Citoquinas y moléculas implicadas en la actividad antiinflamatoria de las MSCs. LB, linfocitos B; LT, Linfocitos T (Modificada de Le Blac *et al* 2007).

Se ha sugerido que el envejecimiento es básicamente una alteración en este proceso de autorrenovación. Ocurre por una serie de cambios regulados por la información genética del organismo. Los cambios fenotípicos producidos en una célula progenitora es una secuencia de transición del desarrollo

dependiente del tiempo, la cual define su línea celular. Una vez que la célula muere es reemplazada por una segunda célula. De esta forma todos los animales permanecen en su estado vital y constantemente rejuvenecen sus tejidos. En el adulto esta secuencia de recambio requiere la existencia de células progenitoras con posibilidad de madurar en varios tipos celulares. Una de las funciones de estas células es por tanto la renovación las células que mueren. Estos cambios a través de la edad es lo que se denomina envejecimiento. Por ejemplo, en el adulto, las MSCs son responsables de la sustitución de los osteoblastos que tienen una vida media de 8-10 días en el humano [163].

En ratas se ha observado que el número y el potencial proliferativo de las MSCs declinan con la edad y esto se manifiesta por la menor capacidad en producir osteoblastos así como en la función de los mismos [185]. Aunque ese potencial proliferativo desciende con la edad, y los títulos de MSCs también cambien, parece que la capacidad en cultivo de diferenciarse en cartílago y hueso de las MSCs extraídas de médula ósea es independiente de la edad del donante [163]. El número de MSCs de médula ósea humana tomados por el número de colonias formadoras de unidades de fibroblastos (CFU-f), son máximas en el recién nacido (1/10.000), descienden en los jóvenes (1/100.000), decrecen progresivamente a partir de los 30 años (1/250.000), 50 años (1/400.000), 80 años (1/2.000.000) [163]. Aún no se conocen los factores que controlan los títulos de MSCs en médula ósea humana y por qué cambian con la edad (Figura 6).

Las MSCs derivadas de médula ósea tienen capacidad de diferenciarse a la línea condrogénica *in vitro*. La diferenciación condral de las BM-MSCs es una interacción compleja entre señales de transducción, factores de transcripción y citoquinas [186, 187]. Dentro de los más importantes condroinductores, debemos incluir a los factores de transcripción SOX9 y RUNX2, mientras que los factores solubles implicados serían el TGF- β , en especial el TGF- β 3, así como las BMPs [186, 188].

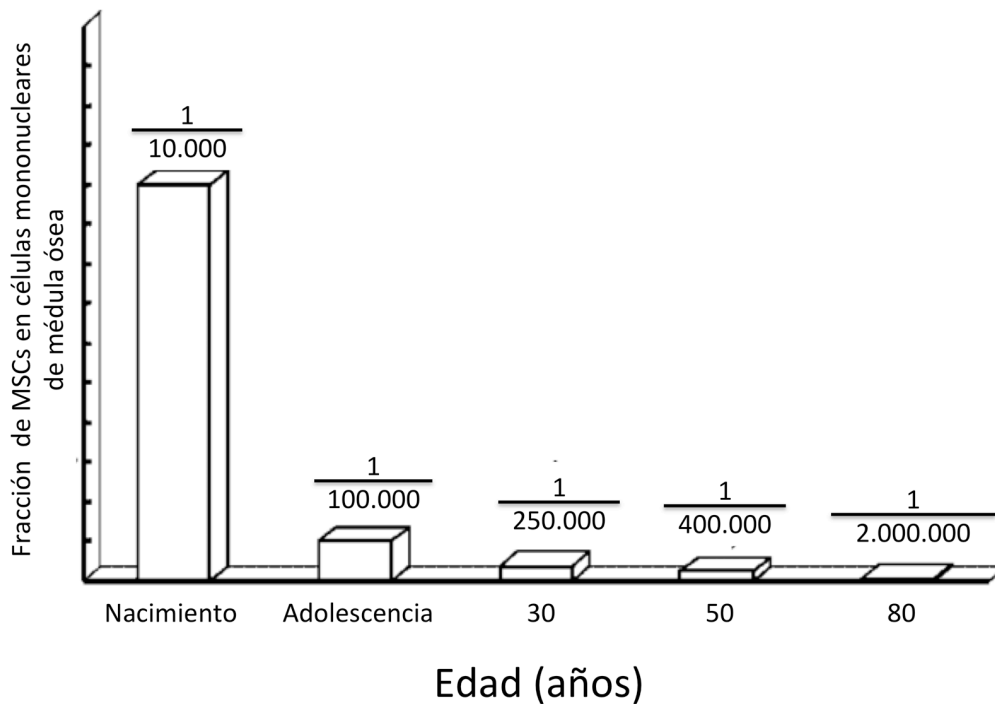


Figura 6. El número de MSCs presentes en médula ósea decrece con la edad (Modificada de Caplan AI 2007).

1.5.3.- Células madre mesenquimales como medicamento.

Las MSCs cultivadas son consideradas como medicamento de terapia avanzada en España desde el año 2004, quedando reguladas bajo la supervisión de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) sobre Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) y su producción debe realizarse bajo condiciones de buenas practicas de manufactura (Good Manufacturing Practices, GMP), siguiendo todas ellas directrices de la Agencia Europea del Medicamento (EMA). La EMA ha seguido las líneas marcadas previamente en Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA) que definió a los productos con células humanas como producto más que mínimamente manipulado [161]. Como cualquier medicamento con potencial uso en humanos, estos deben pasar por una fase preclínica, antes de ser utilizados en humanos en ensayos clínicos regulados.

La producción GMP requiere de un proceso claro y definido de manufacturación, documentado en cada uno de sus pasos, con un proceso de validación en cada uno de ellos, que definen que tipos celulares contienen los cultivos, la detección de agentes infecciosos o elementos extraños en él, productos de la contaminación cruzada con otras estirpes celulares, manteniendo un control del origen de las células así como de los donantes de las mismas [162].

1.5.4.- Fuentes de obtención.

Las MSCs se encuentran presentes, entre otros tejidos, en médula ósea, grasa, periostio y membrana sinovial del paciente.

1.5.4.1.- Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM- MSCs).

La frecuencia en la que encontramos MSCs en la médula ósea de un esqueleto maduro es de entre 1 de cada 50000 a 1 de cada 100000 células, lo que corresponde a unos pocos cientos de células consideradas como MSCs en un mililitro de médula ósea [160].

La médula ósea tiene la ventaja de ser accesible mediante biopsia (espina iliaca posterosuperior), siendo las que más experiencia clínica y preclínica se ha recogido en los últimos años, demostrándose seguridad y eficiencia del procedimiento [189].

Existen dos opciones de uso de estas células, como aspirado o expandidas en cultivo, que muestran dos productos completamente diferentes y difícilmente equiparables de acuerdo a su composición final [190]. La presencia de varios tipos celulares en el aspirado, podrían tener una influencia en la regeneración tisular, hecho que no podríamos observar en el uso por cultivo. De manera contraria, un número pequeño de MSCs presentes en el aspirado, podrían no ser suficientes para hablar de un efecto de las MSCs. Se han descrito algunos riesgos que pueden aparecer durante el cultivo celular, como las infecciones bacterianas, aneuploidías o la transformación celular [191].

1.7.4.2.- Células madre mesenquimales derivas de tejido adiposo.

Es tal vez la fuente más rentable de obtención de MSCs por poseer mayor número de MSCs y por su fácil acceso [192]. Se estima que por cada gramo de grasa se pueden obtener mil veces más MSCs en comparación con la médula ósea [193]. Fraser *et al.* definieron que 1 de cada 100 células de tejido adiposo se consideraba MSCs, 500 veces más rendimiento que el observado en el aislamiento a partir de médula ósea.

En contra, se ha descrito un menor potencial condrogénico de las MSCs de tejido adiposo en comparación con las MSCs obtenidas de la médula ósea. Esta desventaja parece compensarse con la adición de una combinación de TGF- β 2 y BMPs y/o dosis alta de TGF- β 2 y IGF-I [194].

1.5.4.3.- Células madre mesenquimales derivadas de membrana sinovial.

Se ha sugerido que las MSCs aisladas de membrana sinovial son las que tienen mayor poder condrogénico y menor potencial osteogénico, cuando se comparan con MSCs derivadas de médula ósea o periostio [195]. La dificultad de obtención de las mismas, con mal acceso a la membrana sinovial hacen de esta una fuente que tenga poca perspectiva en uso clínico en humanos.

2.- HIPÓTESIS

Como hemos visto las MSCs son células adultas multipotentes no hematopoyéticas con capacidad de diferenciación en tejidos mesenquimales. Se ha demostrado su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia cartílago, hueso, grasa, mioblastos y, en determinadas circunstancias, a otras líneas celulares [123, 196-198]. Las MSCs tienen interés clínico por su facilidad de obtención mediante un aspirado de médula ósea, manteniendo su multipotencialidad, incluso después de varios pases, lo que permite una considerable expansión en cultivo [184].

Aunque todavía hay muchos aspectos desconocidos en su actividad y caracterización, ya han sido empleadas en terapia regenerativa [199].

La administración combinada de AH y MSCs tendría como objetivo aumentar la retención intraarticular de las MSCs y de esta manera incrementar su posible beneficio. Al proveer a las células de una matriz extracelular, el AH aumentaría la supervivencia celular. Igualmente, al ser el AH uno de los tratamientos loco-regionales más frecuentemente administrado en pacientes con artrosis, posibilitaría la comparación con los tratamientos experimentales.

El estudio propuesto se fundamenta en la **hipótesis** de que la inyección intraarticular de células madre mesenquimales puede prevenir o al menos retrasar los cambios degenerativos progresivos que se producen en la rodilla artrósica. Esto supondría una modificación de la historia natural de la artrosis a la vez que mejora la sintomatología derivada de esta patología, resultando por tanto un tratamiento adecuado en el abordaje terapéutico de la artrosis de rodilla. Estos efectos podrían ser debidos a dos mecanismos diferentes:

1) La contribución directa de las células trasplantadas a la producción de cartílago articular gracias a su potencial condrogénico.

2) Su capacidad anti-inflamatoria secundaria a la liberación de citoquinas que modifican el proceso inflamatorio crónico que se produce en la articulación.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo Principal.

El objetivo principal de este ensayo clínico es determinar la seguridad y viabilidad del tratamiento de la artrosis de rodilla mediante la administración intraarticular de BM-MSCs autólogas junto con ácido hialurónico (AH).

3.2.- Objetivos Secundarios.

Como objetivo secundario queremos determinar la eficacia terapéutica del tratamiento intraarticular con BM-MSCs autólogas en combinación con AH en pacientes con artrosis de rodilla, mediante la utilización de dos dosis celulares diferentes y comparándolo con el tratamiento aislado de AH. La determinación de la eficacia se realizará utilizando como variables principales del estudio:

- 1) Escalas clínicas de dolor y funcionalidad.
- 2) Valoración radiológica utilizando radiología simple y resonancia magnética.

Las técnicas y escalas se detallan en la metodología del ensayo.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo clínico, aleatorizado (aleatorización por bloques) fase I-II, multicéntrico con dos centros implicados Clínica Universidad de Navarra (Pamplona, España) e IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España), llevado a cabo entre Agosto de 2012 y Octubre de 2014 con tres ramas de tratamiento, 10 pacientes en cada grupo, cuyos objetivos son determinar la seguridad y eficacia de la administración intraarticular de BM-MSCs autólogas en pacientes con artrosis de rodilla. Todos los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Navarra y la Agencia Española del Medicamento. Todos los participantes dieron su consentimiento firmado previo a la inclusión en el estudio. (nº EudraCT: 2009-017624-72, Clinical Trials. gov identifier: NCT02123368).

Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión y exclusión se recogen en la Tabla 1.

4.1.- Grupos de tratamiento.

Los grupos fueron asignados por aleatorización en bloque. Comparamos la administración aislada de AH con la administración de dos dosis distintas de MSCs, junto a AH según el siguiente esquema:

1. Grupo A: Inyección intraarticular de Ácido Hialurónico (HyalOne®).
Dosis única de 4 ml.
2. Grupo B: Dosis Baja. Inyección intraarticular de 10 millones de BM-
MSCs autólogas cultivadas *ex vivo*. Suspensión celular estéril de

pequeño volumen, 1,5 ml, en un vehículo apto para inyección intraarticular, seguida de una inyección intraarticular de ácido hialurónico (HyalOne®, 4 ml).

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Hombres y Mujeres entre 50-80 años	Artrosis bilateral de rodilla que requiera tratamiento en ambas rodillas
Diagnóstico de artrosis de rodilla de acuerdo con los criterios de American College of Rheumatology (ANEXO I)	Diagnóstico previo de enfermedad poliarticular
Dolor articular igual o mayor a 2,5 puntos en la escala visual analógica (EVA)	Deformidad mecánica severa (Varo/Valgo de 15°)
Grado radiológico de artrosis según la escala de Kellgren-Lawrence igual o mayor a 2 (ANEXO II)	Artroscopia en esa misma rodilla en los 6 meses anteriores a la inclusión en el ensayo
Índice de Masa Corporal (IMC) entre 20 y 35 kg/m ²	Infiltración en esa misma rodilla en los 6 meses anteriores a la inclusión en el ensayo
Capacidad de seguimiento durante el ensayo	Enfermedad autoinmune o de carácter reumático
	Mal control de la Diabetes (Hb glicosilada >9%)
	Discrasia sanguínea
	Tratamiento inmunosupresor o anticoagulante
	Tratamiento con corticoides en los 3 meses previos a la inclusión en el estudio
	Consumo de AINES durante los 15 días previos a la inclusión en el ensayo
	Intolerancia al AH o proteínas de ave

3. Grupo C: Dosis alta. Inyección intraarticular de 100 millones de BM-MSCs autólogas cultivadas *ex vivo*, suspensión celular estéril de pequeño volumen (3 ml) en un vehículo apto para inyección intraarticular, seguida de una inyección intraarticular de ácido hialurónico (HyalOne®, 4 ml).

4.2.- Fases del ensayo clínico.

Las fases del ensayo, el calendario de visitas durante la fase de seguimiento y las variables estudiadas durante las mismas están resumidas en el ANEXO III.

1.- Fase de Selección (Mayo 2012-Octubre 2013). Reclutamiento de pacientes en cada uno de los centros participantes por parte de los especialistas en Cirugía Ortopédica y Traumatología y/o Reumatología participantes en el proyecto, obteniendo el consentimiento informado y confirmando los criterios de inclusión.

Una vez que se confirmó que el paciente cumple los criterios de inclusión y no los de exclusión, se realizó extracción de MO del propio paciente si este pertenecía a uno de los dos grupos celulares. Posteriormente, con el aspirado medular se procederá al aislamiento, cultivo y expansión de las BM-MSCs en los laboratorios GMP acreditados.

2.- Fase de Tratamiento (Agosto 2012-Octubre 2013). Una vez generada la dosis adecuada de células se procede a la infusión de las BM-MSCs por vía intraarticular en dosis única al paciente correspondiente, en los pacientes aleatorizados a estas ramas de tratamiento. En aquellos pacientes que no

recibieron células, se realizó en los días siguientes a su inclusión la administración de AH.

3.- Fase de Seguimiento (Agosto 2012-Octubre 2014). El seguimiento de cada paciente se estableció en 12 meses. La valoración se realizó tras las 24 horas siguientes a la administración, una semana tras la administración del tratamiento y a los 1, 3, 6 y 12 meses del tratamiento.

4.3.- Variables principales de valoración.

4.3.1- Seguridad y viabilidad.

La variable principal del estudio fue la seguridad. La existencia de complicaciones y/o efectos adversos durante el procedimiento fueron registrados durante todo el ensayo clínico en cada una de las visitas y de manera constante en todo el tiempo que duró el seguimiento. A los pacientes se les hizo entrega de una tarjeta con un número de teléfono directo al cual podían llamar las 24 horas del día para comunicar algún evento o complicación o cambio en la medicación concomitante.

4.3.2- Valoración clínica.

La valoración clínica se realizó antes del tratamiento y al mes 3, 6 y 12 después del mismo.

El dolor, calidad de vida, funcionalidad fueron evaluados utilizando las escalas VAS, WOMAC, KOOS, EuroQol 5-D; Lequesne y SF-16, que determinan el dolor articular, la capacidad funcional y la evolución de la calidad de vida [200].

Para determinar el rango de articular de flexo-extensión, se realizaron mediciones del rango articular antes del tratamiento, al mes, a los 3, 6 y 12 meses después del mismo. Se realizan 3 medidas, anotando la media de ellas. El rango articular es el alcanzado por el paciente de manera activa.

4.3.3- Valoración Radiológica.

La interlínea articular fue valorada mediante proyección de Rosenberg antes del tratamiento y a los 6 y 12 meses del mismo. Para la obtención de proyecciones comparables en el tiempo diseñamos un molde de metacrilato para el posicionamiento de los pacientes en el momento de la realización de las radiografías (Figura 8).

El estudio por resonancia magnética se realizó antes del tratamiento y a lo 6 y 12 meses tras haber recibido el tratamiento. Dos radiólogos experimentados, dedicados en exclusividad a la patología musculo esquelética valoraron de manera ciega cada una de las resonancias de los pacientes, describiendo el número, localización de las lesiones, el grosor del cartílago y su intensidad de señal, las estructuras meniscales, la membrana sinovial y hueso subcondral, obteniendo un número final definido por el protocolo Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS), en el cual un valor más alto hace referencia a mayor daño articular [201].

El equipo utilizado fue el 3T Magnetom TRIO (3 Teslas, Siemens, Erlangen, Alemania) incluyendo una secuencia axial potenciada en T1 (WI) con cortes de 5 mm, secuencia coronal T1 WI (4 mm), secuencia sagital T1 WI (4 mm),

sagital T2 FS WI (4 mm) y sagital en ECHO de gradiente 3D (DESS) (2 mm)
esta última para la valoración tridimensional del cartílago.

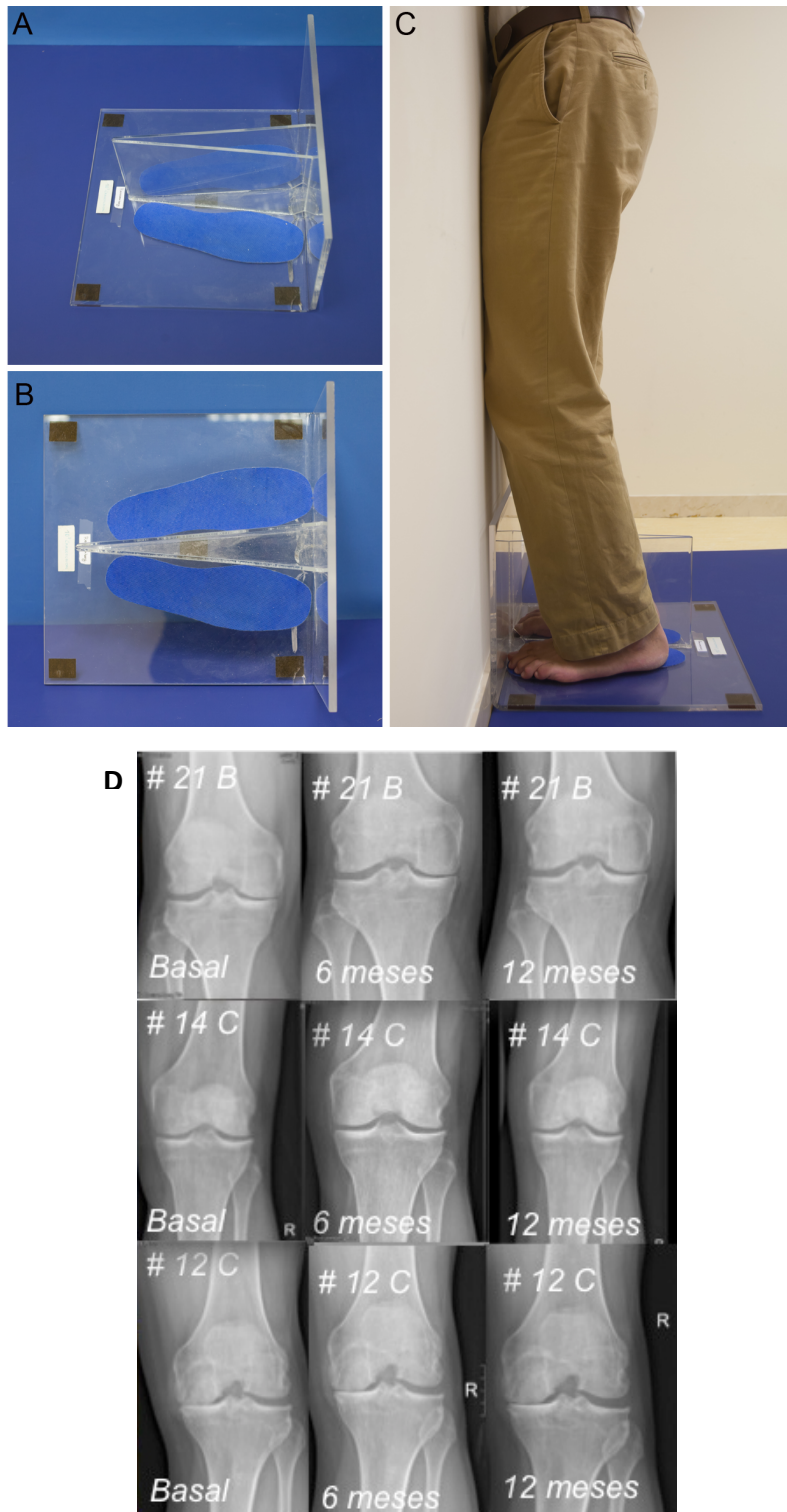


Figura 8.- Posición de Rosenberg. **A-C**, Para la obtención de proyecciones comparables en el tiempo diseñamos un molde de metacrilato para el posicionamiento de los pacientes en el momento de la realización de las radiografías. **D**, Muestra el resultado de las proyecciones a diferentes tiempos (basal, 6 meses y 12 meses) y cómo son comparables cada una de ellas.

4.4.- Cultivo celular.

Las BM-MSCs fueron tratadas bajo condiciones GMP utilizando procedimientos estandarizados. La médula ósea es obtenida de una única punción de la cresta iliaca (volumen de 100 ml) bajo condiciones estériles. La fracción mononuclear es aislada mediante centrifugación y densidad de gradiente en Ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las células mononucleares obtenidas en un rango de entre 20×10^6 y 60×10^6 se siembran en frascos de 175 cm^2 en medio de cultivo, el cual consiste en MEM α sin ribonucleosidos (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 5% de lisado de plaquetas, 2 unidades/ml de heparina, penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco) y 1 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico humano (bFGF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Los frascos son mantenidos en cultivo a una temperatura de 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo es renovado cada 3-5 días. Alrededor del día 10-15 las colonias celulares están formadas, separándolas con TrypLE Select™ (Life Technologies) y sembradas en una cantidad de 3000-5000 células/cm². Una vez que se alcanza el 70-80% de confluencia, las células se siembran de nuevo y se cultivan hasta que se obtiene las cantidades requeridas para ser administrada a los pacientes. Por ultimo, se recogieron las células con TrypLE Select™, se lavan tres veces con PBS y se suspenden en tampón lactato de Ringer (Grifols, Barcelona, España) que contiene 1% de albúmina humana (Grifols). Las células quedan preparadas para ser administradas dentro de las primeras 24 horas desde la obtención.

Las células se caracterizan de acuerdo a criterios ISCT, siendo analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) con los anticuerpos apropiados (BD Biosciences) para confirmar la expresión de los marcadores CD90, CD73 y CD44, así como la ausencia de CD34 y CD45.

4.5.- Administración del tratamiento.

En pacientes de grupos celulares, la inyección intraarticular se realizó vía parapatelar usando una aguja de 19 g, 3-4 semanas después de que se hubiera realizado la biopsia de cresta ilíaca (Figura 9). El tiempo entre la biopsia y el tratamiento viene determinado por el ritmo de expansión celular. Una vez obtenido el medicamento la administración se debe realizar en las primeras 24 horas. En el 90% de los pacientes, la administración se produjo dentro de la primera hora después de la obtención del producto final en el laboratorio de GMP. El orden de administración fue primero las células, 10×10^6 (dosis baja) o 100×10^6 (dosis alta) BM-MSCs en 1,5 ó 3 ml respectivamente. Posteriormente, se inyectaron 4 ml de HA (Hyalone®) utilizando la misma vía.

4.6.- Cálculo del tamaño de la muestra.

Estimamos que 10 pacientes eran necesarios por grupo para obtener un efecto del 0,6 en la escala WOMAC con una potencia del 80% asumiendo una aleatorización balanceada entre los grupos, asumiendo una probabilidad del 5% en error tipo I.

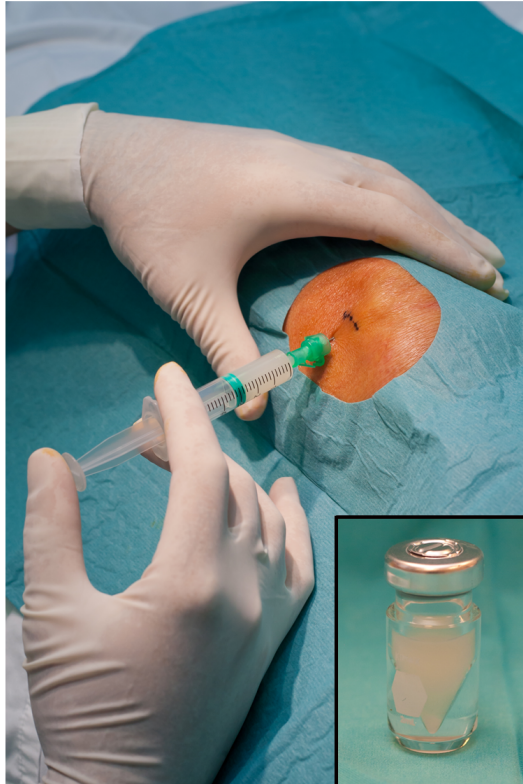


Figura 9. La inyección intraarticular de los tratamientos se realizó por vía parapatelar externa, según se muestra en la imagen.

4.7.- Análisis estadístico

El análisis fue realizado de acuerdo al tratamiento asignado y todos los datos obtenidos de los pacientes fueron incluidos en el análisis, siguiendo el principio de intención de tratar. Los datos descriptivos son presentados con la mediana [rango intercuartílico (IQR)] o porcentajes. En cada grupo, la comparación de cada criterio de valoración clínica y radiológica entre los valores obtenidos a los 6 ó 12 meses y el valor de referencia, es decir, la obtenida inmediatamente antes de la administración del tratamiento, se realizó mediante el test de U Mann-Whitney. Los cambios en los mismos puntos finales con el tiempo se determinaron calculando las diferencias entre las mediciones recogidas en la visita de seguimiento de 6 o 12 meses y la visita basal. Los cambios a lo largo

del tiempo fueron determinados calculando la diferencia entre las medidas obtenidas durante el seguimiento y la medida de la variable antes del tratamiento. Finalmente, la comparación entre los grupos de tratamiento se llevó a cabo usando el test Kruskal-Wallis y el test U Mann-Whitney. Todos los test se realizaron a 2 colas. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo sin ajuste multivariable. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Stata 14 (StataCorp. 2015. Windows, Versión 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP) y 279 IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics).

5. RESULTADOS

5.1.- Datos demográficos.

Treinta y dos pacientes fueron reclutados y consecutivamente aleatorizados a los 3 grupos (Figura 10).

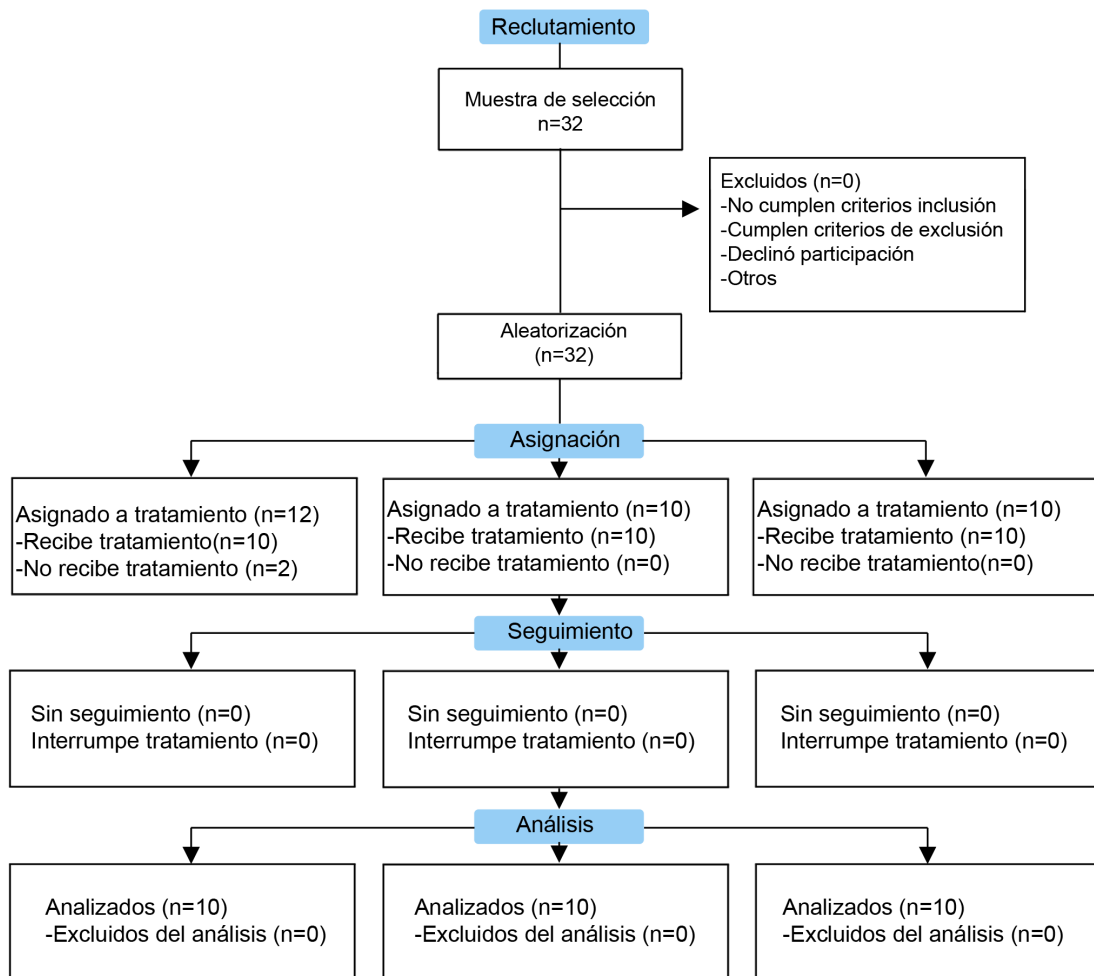


Figura 10. Diagrama de flujo del ensayo clínico.

Dos pacientes asignados al grupo control fueron excluidos del ensayo al no estar de acuerdo con el tratamiento asignado. Todos los grupos mostraron una distribución similar en cuanto a edad, índice de masa corporal y edad. No

encontramos diferencias en los grados de artrosis según la escala de Kellgren-Lawrence ($p=0.585$, Tabla 2).

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes

	Control	BM-MSCs	
		Dosis baja	Dosis alta
N	10	10	10
Edad (años)	60.3 (55.1, 61.1)	65.9 (59.5, 70.6)	57.8 (55.0, 60.8)
Hombre, n (%)	7 (70)	4 (40)	8 (80)
IMC (kg/m^2)	29.6 (26.2, 30.8)	27.1 (24.4, 31.2)	28.5 (25.8, 31.0)
Tiempo desde el diagnóstico de artrosis (años)	6 (2, 8)	9 (4, 12)	10 (7, 15)
K-L 2, n (%)	4 (40)	1 (10)	3 (30)
K-L 3, n (%)	2 (20)	2 (20)	3 (30)
K-L 4, n (%)	4 (40)	7 (70)	4 (40)

Los datos expresados son las medianas de cada una de las variables [Rango intercuartílico (IQR)]. K-L, Escala radiológica de Kellgren and Lawrence para la artrosis de rodilla.

5.2.- Seguridad.

No hemos encontrado ningún evento adverso grave o complicación derivado del procedimiento o tratamiento a lo largo del ensayo. Tampoco hemos encontrado diferencias significativas en las constantes vitales ni en los estudios de laboratorio durante el estudio.

La inyección intraarticular produjo un dolor articular que requirió de AINES en 1, 3 y 6 pacientes en el grupo control, dosis baja y dosis alta respectivamente. Todos los pacientes afectados de este dolor, mejoraron sin secuelas. No se encontraron diferencias entre los grupos respecto a la toma de anti-inflamatorios requeridos hasta la recuperación.

5.3.- Valoración clínica.

La valoración clínica se realizó antes del tratamiento y tras el mismo al mes, 3, 6 y 12 meses.

Los pacientes que únicamente recibieron AH no mostraron cambios durante el seguimiento en el estatus del dolor de acuerdo con la escala EVA. Encontramos diferencias significativas en ambos grupos celulares con respecto al grupo control al final del seguimiento en la escala EVA (dosis baja vs grupo control $p=0,005$ y de dosis alta vs grupo control $p<0,009$) (Figura 11).

A pesar de que los pacientes del grupo control mostraron inicialmente una mejoría en la subescala del dolor y función de la escala WOMAC y rango articular, este cambio no se sostuvo de manera significativa a largo plazo. La inyección intraarticular de BM-MSCs, especialmente cuando se usaron dosis celulares altas, con el tiempo permitió a los pacientes percibir una mejora en el dolor y en la facilidad para realizar las actividades de su actividad diaria.

La inyección de dosis celulares altas (100×10^6) se asoció con una mejoría en todas las subescalas del WOMAC a los 12 meses (Tabla 3). Este hecho sólo se observó en este grupo de pacientes. Creemos importante remarcar que cuando medimos la diferencia del WOMAC a los 12 meses con respecto a la medición previa al tratamiento, la diferencia es notablemente mayor en los grupos que recibieron células [-6.5 (-19, 4), -14 (-27, 4), and -14 (-15, -8), mediana (IQR), para el grupo control, dosis baja y dosis alta de BM-MSCs respectivamente]. Estos datos acompañados con que solo en el grupo de dosis alta los resultados de todos los ítems fueron significativos a los 12 meses en la escala WOMAC, define que solo los pacientes tratados con dosis alta de células se pueden

considerar como respondedores al tratamiento en la escala WOMAC.

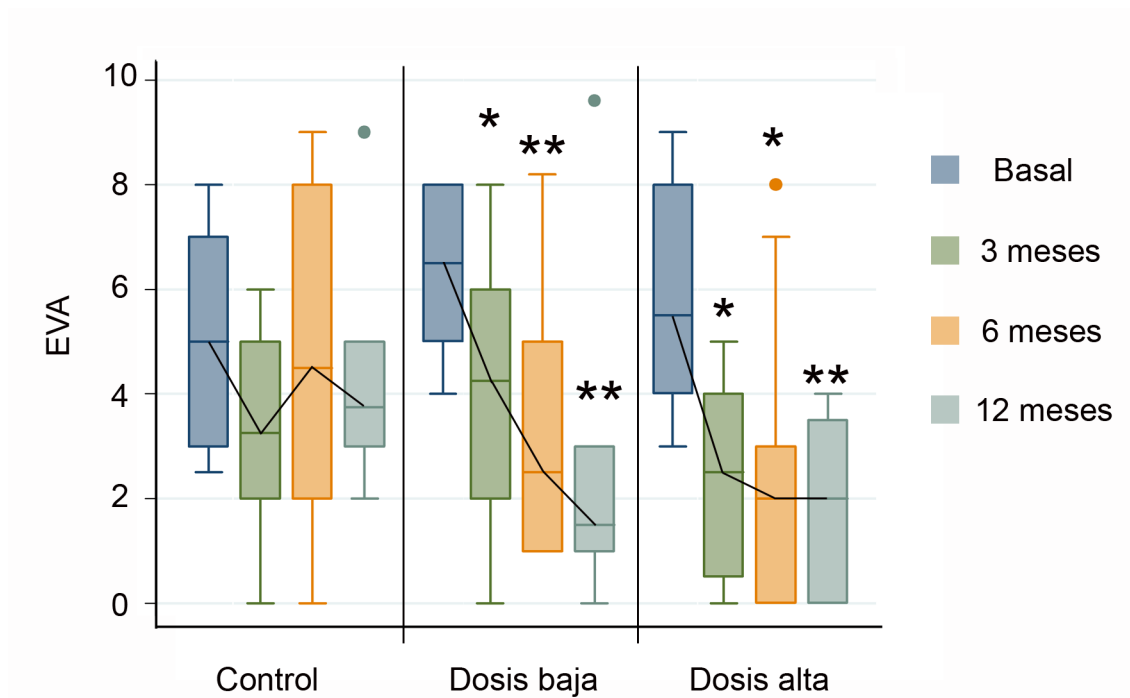


Figura 11.- Evolución de la escala EVA a lo largo del seguimiento. Los valores basales y a los 3, 6 y 12 meses se representan. A los 12 meses las comparaciones con respecto al grupo control resultaron significativas. (Dosis baja vs grupo control $p=0,005$ y de dosis alta vs grupo control $p < 0,009$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ con respecto al mismo grupo.

En la escala Lequesne sólo los resultados obtenidos en el grupo de dosis alta de células fueron mejores respecto al valor basal (Tabla 4). A pesar de esa mejoría, el resultado no fue significativo.

La Calidad de Vida evaluada con las escalas EuroQuol-5D (Tabla 5) y SF-36v2 no mostró cambios significativos, a pesar de que más del 50% de los pacientes del grupo de dosis alta tuvo la sensación de tener un mejor estado de salud al final del seguimiento con respecto al año previo, hecho que es comparable en el 20% de los pacientes del grupo control y 40% del grupo de dosis baja de BM-MSCs (Fig. 12).

Tabla 3. Escala WOMAC en la que mostramos los resultados antes del tratamiento, a los 3, 6 y 12 meses tras el tratamiento.

WOMAC	Tiempo	Control	BM-MSCs	
			Dosis baja	Dosis alta
Dolor	Basal	5.5 (5, 6)	7.5 (5, 9)	4.5 (4, 5)
	3 meses	3 (1, 3)*	3.5 (3, 7)	3 (2, 5)
	6 meses	2.5 (1, 5)*	3.5 (3, 7)	3.5 (2, 5)
	12 meses	2 (1, 6)	3.5 (3, 5)	2.5 (2, 4)*
Rigidez	Basal	2 (1, 3)	4 (2, 5)	2.5 (2, 4)
	3 meses	2 (1, 2)	2 (0, 4)	2 (1, 2)
	6 meses	0.5 (0, 2)	1.5 (1, 3)*	2 (1, 3)
	12 meses	2 (1, 2)	2 (1, 2)*	2 (1, 2)*
Función	Basal	21 (13, 24)	26.5 (23, 32)	19 (12, 25)
	3 meses	9 (7, 11)*	17.5 (8, 26)	10 (7, 18)
	6 meses	7.5 (2, 13)*	18 (10, 23)	14.5 (8, 17)
	12 meses	9.5 (5, 23)	17 (10, 20)	11 (9, 14)*
Total	Basal	29 (19, 38)	37 (32, 42)	28 (16, 34)
	3 meses	12 (11, 14)*	25.5 (11, 37)	13 (11, 26)*
	6 meses	10 (4, 20)*	24 (13, 31)	20 (13, 23)
	12 meses	13.5 (8, 33)	21.5 (15, 26)	16.5 (12, 19)**

Los valores para cada uno de los ítems de la escala son presentados como medianas (IQR). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ son valores respecto al valor basal del mismo grupo. Los datos se presentan con la mediana (IQR)

Tabla 4. Escala Lequesne.

Lequesne	Control	BM-MSCs	
		Dosis baja	Dosis alta
Basal	8 (8; 9)	7,5 (6, 8)	8,5 (7, 9)
1 mes	8,5 (6;9)	8 (8; 9)	9 (7, 10)
3 meses	8 (7; 9)	9,5 (9;1 0)	9 (6, 10)
6 meses	7,5 (7; 9)	7 (5; 9)	7 (6, 10)
12 meses	8,5 (7,;9)	8 (7; 9)	7.5 (7, 9)

Se expresan los valores de la mediana en la escala de Lequesne. No se observaron diferencias significativas en ningún grupo. Los datos se presentan con la mediana (IQR)

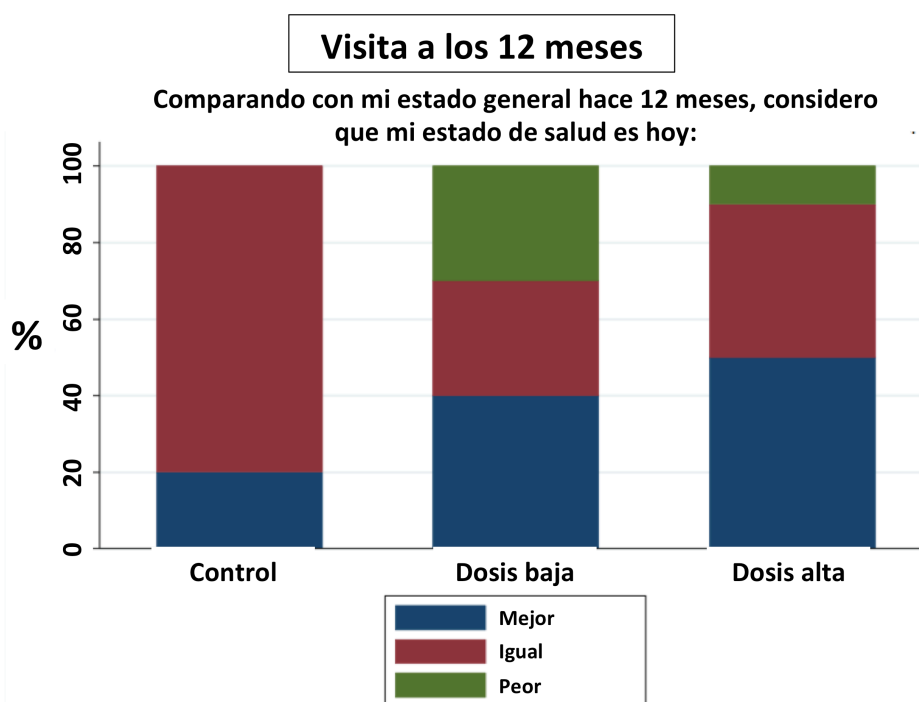


Figura 12. A la pregunta de cómo evaluarían su estado de salud actual comparado con el año anterior más del 50% de los pacientes del grupo de dosis alta tuvo la sensación de tener un mejor estado de salud al final del seguimiento con respecto al año previo, hecho que es comparable en el 20% de los pacientes del grupo control y 40% del grupo de dosis baja de BM-MSCs.

Tabla 5. Eficacia del tratamiento basado en la calidad de vida (EQ-5D).

	Control	Dosis baja	Dosis alta	p
Basal	0.72 (0.54, 0.79)	0.57 (0.49, 0.68)	0.7 (0.65, 0.74)	0.169
12 meses	0.79 (0.74, 1)	0.74 (0.59, 0.79)	0.79 (0.74, 1)	

Resumimos los resultados obtenidos a los 12 meses. No encontramos diferencias significativas en las escalas de calidad de vida, KOOS (ANEXO IV) y EQ-5D a los 12 meses. Los datos se presentan con la mediana (IQR)

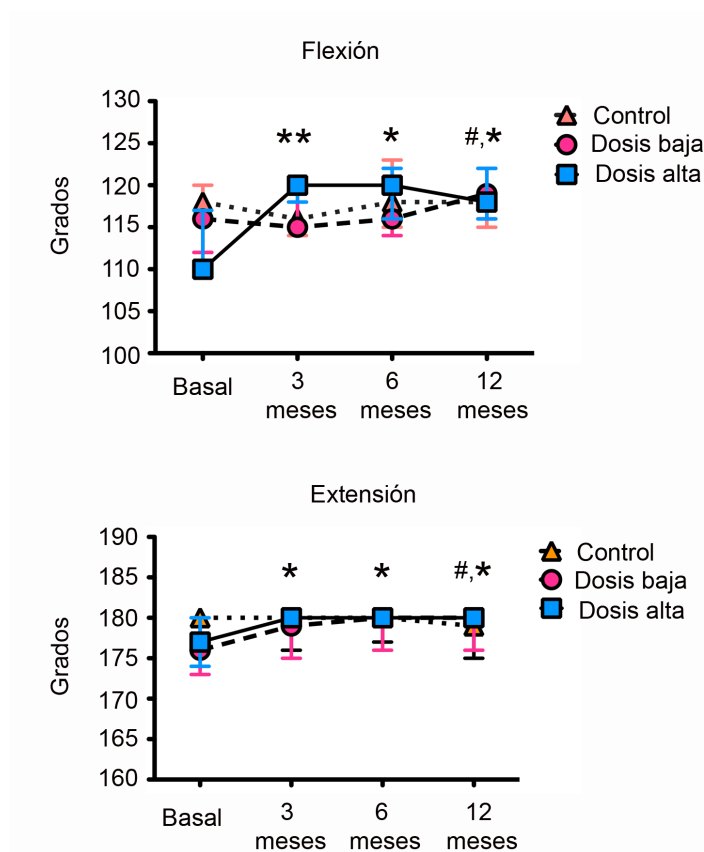


Figura 13.- Rango articular de la rodilla. Los valores son expresados en la mediana de los grados medidos con goniómetro a lo largo del estudio. En la figura superior se muestran los resultados de la flexión y en la figura inferior los resultados de la extensión. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ resultados con respecto al valor basal en el grupo de dosis alta. #, $p < 0.05$ con respecto al valor basal en el grupo de dosis baja.

5.4.- Rango articular de la rodilla.

Los grados de flexión y extensión mejoraron de manera significativa en los pacientes que fueron tratados con BM-MSCs, siendo el efecto más rápidamente visible en aquellos pacientes que recibieron la dosis más alta de

células. No se obtuvo una mejoría en los pacientes pertenecientes al grupo de ácido hialurónico. (Figura 13).

5.5- Resultados Radiológicos: interlínea articular y Resonancia Magnética (Protocolo WORMS).

El análisis de la interlínea articular en las proyecciones de Rosenberg durante el seguimiento no mostraron diferencias significativas. Si bien es cierto que se ha observado un descenso de la interlínea en el grupo control, estas diferencias han estado al borde de la significación a los 12 meses ($p=0.05$ a los 12 meses) (Tabla 6, Tabla 7). La evaluación del grupo de dosis baja no fue posible, porque el 50% de los pacientes pertenecían a un grado de K-L de IV, cuyo valor de interlínea ya era de 0 al inicio.

Tabla 6. Diferencias en la interlínea medida en la radiografía simple, comparando a los 6 y 12 meses tras la administración de los tratamientos.

Tiempo	Control	BM-MSCs	
		Dosis baja	Dosis alta
6 meses	-3 (-6, 0)	0 (-1, 0)	0 (-1, 1)
12 meses	-4 (-18, 0)	0 (0, 3)	0 (-1, 2)

Los datos han sido medidos en milímetros (mm) y cada valor mediante la sustracción del valor a los 6 y 12 meses con el obtenido basal. Los datos se presentan con la mediana (IQR).

De manera consistente con los resultados obtenidos en la radiografía simple, la doble lectura de la resonancia magnética siguiendo el protocolo WORMS mostró una ligera reducción de la magnitud de la escala WORMS en aquellos pacientes que recibieron un mayor número de células durante el seguimiento, aunque esta no fue significativa (Tabla 8). Los pacientes tratados con 100

millones de células mostraron una mejoría de 4 puntos a los 12 meses, con una mejoría en el 25% de los casos de 22 puntos, hecho que no se observó en aquellos pacientes que recibieron menor número de células o AH aislado.

Tabla 7. Valores de la interlínea articular durante el ensayo clínico.

Tiempo	Control	BM-MSCs	
		Dosis baja	Dosis alta
Basal	25.5 (20, 40)	10 (0, 42)	33.5 (13, 52)
6 meses	24 (15, 29)	9 (0, 45)	30 (15, 53)
12 meses	22 (0, 26)	10 (0, 48)	32 (15, 52)

Los valores, en mm, corresponden a los valores de la interlínea articular basal, a los 6 y 12 meses. Los datos se presentan con la mediana (IQR)

Tabla 8. Valores de la escala WORMS antes de la administración, a los 6 y 12 meses desde el tratamiento.

Tiempo	Control	BM-MSCs	
		Dosis baja	Dosis alta
Basal	79 (41, 94)	75 (64, 107)	60 (53, 84)
6 meses	78 (34, 107)	70 (57, 126)	53 (51, 90)
12 meses	83 (25, 95)	90 (67, 140)	53 (46, 82)
12 meses de evolución	-0.5 (-16, 15)	2.5 (-3, 25)	-4 (-22, 2)

Los valores son expresados en mediana (IQR). La evolución en cada grupo fue calculado mediante la sustracción del valor a los 12 meses con el basal, expresadas en mediana (IQR). El análisis completo del protocolo WORMS se encuentra detallado en el ANEXO V.

6.- DISCUSIÓN

El interés por el uso clínico de las MSCs para el tratamiento de la artrosis ha crecido en la última década. Sin embargo, la dosis óptima, la fuente de obtención, así como el uso de coadyuvantes, no han sido establecidos. Con tal premisa, en el presente ensayo clínico hemos comparado la administración aislada de ácido hialurónico con la administración de dos dosis diferentes de BM-MSCs autólogas, 10 y 100 millones, coadministradas con ácido hialurónico.

6.1.- MSCs vs Implantación de condrocitos autólogos.

Durante las pasadas 2 décadas los defectos focales del cartílago han sido objeto de interés de tratamiento por parte de la terapia celular y la ingeniería tisular. En este sentido las técnicas de implantación de condrocitos autólogos, con o sin matriz (ACI o MACI), han sido utilizadas con prometedores resultados. A diferencia de los defectos focales, en la artrosis nos encontramos con grandes extensiones de cartílago lesionado asociadas a una diferente fisiopatogénesis. Esto nos lleva a que las técnicas nombradas (ACI y/o MACI) no puedan ser utilizadas [202-204]. Como ya hemos explicado antes, la propia base genética y fisiopatológica de las lesiones artrósicas, las diferencian de una lesión puramente condral, con una mayor participación de las estructuras circundantes al cartílago (hueso subcondral y membrana sinovial). Por tanto, el uso en la artrosis de las BM-MSCs autólogas mediante inyección intraarticular puede presentar algunas ventajas con respecto al uso de condrocitos. La primera hace referencia a su capacidad de autorenovación (self-renewal), lo que permite que el número de células que se pueden obtener en cultivo sea

mucho mayor a las que somos capaces de obtener en el cultivo de condrocitos. Además, sin requerir una zona donante de cartílago, que en grados muy avanzados puede no ser accesible y que en aquellos casos en que sea posible, puede presentar una morbilidad asociada [203-205]. Las MSCs son las responsables de la renovación y mantenimiento de los tejidos mesenquimales adultos, incluido el cartílago. Las MSCs cultivadas *in vitro*, tienen una actividad condroinductora que se objetiva con la proliferación condral que inducen y en la producción de las proteínas de las que forma parte la matriz extracelular, incluyendo el agregano y el colágeno de tipo II, el cual tiene un papel fundamental en la reparación del cartílago [164-166, 206].

Se ha sugerido que el número de MSCs presentes en el hueso subcondral decrece con la edad y con el grado de artrosis, sugiriendo que existe un déficit de MSC que prima para el desarrollo del proceso degenerativo [163, 207, 208]. De la misma manera, se ha propuesto, que durante la lesión tisular, existe una migración de las MSCs para participar en el proceso reparativo, lo que daría un valor a su administración exógena [165, 166]. Por todo ello, las MSCs tienen mayor base teórica para ser efectivas.

En un estudio de cohortes publicado en 2010, Nejadnik *et al.* compararon el uso de condrocitos autólogos con BM-MSCs autólogas, producidos en condiciones de GMP. Este estudio estaba compuesto por una muestra de 72 pacientes, de los cuales, 36 recibían técnica ACI (15 rodillas artrósicas) y otros 36 BM-MSCs junto a una matriz (20 rodillas artrósicas, pero con lesiones continentales). En este estudio los 2 tratamientos fueron efectivos en mejorar el dolor y la calidad de vida, pero el tratamiento con BM-MSCs presentaba más

ventajas al requerir una intervención quirúrgica menos, menor morbilidad asociada y todo ello asociado a un menor coste hospitalario. Estas ventajas, unidas a que no existían diferencias clínicas entre los grupos, aconsejaban su uso en estos casos. Bien es cierto que no existe en el estudio ninguna referencia especial a los pacientes afectos de artrosis [205].

6.2.- Seguridad: reacciones adversas vistas en la administración de las MSCs.

La seguridad es uno de los objetivos primarios definidos en el ensayo clínico. En una revisión sistemática sobre la seguridad de la inyección intraarticular de BM-MSCs autólogas, de 844 procedimientos, correspondientes a 8 estudios, se encontraron 22 eventos adversos y 4 eventos adversos graves. La media de seguimiento de estos pacientes fue de 21 meses [209]. Dos de los eventos adversos graves fueron referentes al procedimiento, el primero hace referencia a un caso de embolismo pulmonar e infección de la cresta iliaca y el segundo no estaba relacionado con el procedimiento (tumor en área no implicada ni en la zona de implantación ni en la zona de extracción). El resto de reacciones adversas leves, hacen referencia al dolor e inflamación de la articulación tras la infiltración.

El dolor e inflamación de la inyección intraarticular de AH de alta viscosidad fue motivo de estudio en un metaanálisis publicado en 2007. En el, de 890 infiltraciones, 50 (7,7%) desarrollaron estas reacciones [210]. En nuestro trabajo, con un número mucho más pequeño de muestra hemos encontrado un número mayor de pacientes que requirieron de tratamiento con AINES en las

primeras 24 horas tras la inyección de células, siendo mayor el porcentaje en el grupo que recibió mayor dosis celular. Si bien es cierto que todos recuperaron sin secuelas, es un acontecimiento adverso que por su frecuencia debemos reconocer. Dos son las razones fundamentales a las que podemos atribuir este dolor. La primera es al mayor volumen inyectado entre los grupos de células y el control. La segunda razón sería más teórica, y haría referencia a una posible lisis celular. Los resultados son similares a los obtenidos por otros grupos. con la inyección de 40 millones de células autólogas y alogénicas [177, 211].

A pesar de que existe un riesgo potencial de contaminación bacteriana, transformación a un tipo celular no deseado, transformación maligna o la diferenciación prematura durante el cultivo, no hemos detectado este tipo de problemas durante el estudio [212]. Esto es consistente con los problemas descritos por otros grupos que han utilizado este tipo celular en estudios con mayor o menor tamaño de la muestra, siendo extensible al uso alogénico de este tipo de células. El poco tiempo de cultivo de este tipo de células, y su limitada capacidad para la división, se asocia a ese bajo riesgo de transformación maligna, disminuyendo el riesgo potencial de producir neoplasias tras la implantación tanto en animales como en estudios en humanos [206, 213-218]. Cabe mencionar en este sentido 2 casos de desarrollo neoplásico en el sitio de implantación, el primero en ratón; los autores se retractaron posteriormente. Mientras que en el segundo caso parece haber sido producto de la contaminación cruzada con líneas de osteosarcoma o fibrosarcoma [219, 220].

En este mismo sentido, Agung *et al.* tras la inyección intraarticular de 10×10^7

células observaron la generación de cuerpos libres articulares en estudios preclínicos en ratas [213]. No hemos encontrado reacciones adversas en este sentido en el presente ensayo.

Respecto al cultivo, debemos tener en cuenta que el medio de cultivo puede también afectar a la población y fenotipo celular y consecuentemente al comportamiento de las mismas. Minimizar el contacto de los suplementos animales con las MSCs aumenta el nivel de seguridad que evitaría el potencial riesgo a la contaminación bacteriana o respuesta inmunológica a los mismos [221-224]. Existen alternativas a estos cultivos como el uso de suero autólogo o de lisado de plaquetas humano.

6.3.- Viabilidad del procedimiento.

La viabilidad del procedimiento es el segundo de los objetivos primarios definidos. Existe controversia respecto a la calidad y la cantidad de MSCs que se pueden obtener de pacientes de edad avanzada y con grado de artrosis moderada-severa. Por una parte, en el año 2002, Murphy *et al.* mostraron que la reserva de MSCs en pacientes con artrosis avanzada de rodilla disminuía con independencia de su edad, la cual también es, de por sí, un factor independiente para el descenso del número de estas. Este grupo realizó la comparación de las BM-MSCs obtenidas de pacientes sometidos a artroplastia de rodilla, con muestras de sujetos con rodillas sanas. Murphy *et al.* concluyeron que las MSCs en pacientes con artrosis avanzada tenían reducida también su capacidad de proliferación *in vitro* así como su capacidad de diferenciación condrogénica, con aumento de la actividad osteogénica. Por lo

tanto, estaríamos hablando no solo de una pérdida cuantitativa sino cualitativa de estas células [208]. Resultados similares se obtuvieron con el uso de tejido adiposo de grasa infrapatelar de pacientes con artrosis y edad avanzada, demostrando que de manera independiente, tanto la edad como la condición artrósica habían reducido de manera significativa la capacidad de diferenciación condrogénica [225].

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el objetivo cuantitativo es factible en este tipo de pacientes, obteniéndose un número suficiente de MSCs con potencial de diferenciación condrogénica independientemente de su edad o grado de artrosis [226, 227]. De la misma forma, Dudics *et al.* demostraron que las MSCs de pacientes con artrosis poseen un potencial condrogénico similar a la de las MSCs de donantes sanos, pudiéndose aislar una cantidad suficiente de MSCs con capacidad condrogénica en pacientes con artrosis de rodilla, con independencia de su edad o de la causa de enfermedad [196, 228]. Estos resultados, junto a otros similares, sugieren que es viable el uso de BM-MSCs autólogas en pacientes con artrosis de rodilla [229].

En la revisión realizada de los ensayos clínicos con células cultivadas de pacientes con edades avanzadas, observamos la viabilidad de la técnica, hecho que es apoyado también por nosotros, al alcanzar la dosis planificada en todos los casos, aunque la velocidad de expansión de las células no haya sido igual en todos los pacientes. Este hecho puede ser objeto de estudios futuros.

6.4.- Dolor y función articular.

La mejoría del dolor en la escala EVA es predictor independiente de la necesidad de prótesis total de rodilla [72]. Con el uso de BM-MSCs, hemos encontrado un resultado positivo en el alivio progresivo del dolor, que se hace permanente hasta el final del seguimiento, donde estas diferencias son mayores. De manera interesante, este efecto en el dolor fue independiente de la dosis celular administrada en la escala EVA, no observándose este efecto en el grupo que sólo recibió AH, siendo el valor de la escala visual analógica a los 12 meses en este grupo similar a la situación previa al tratamiento. De manera paralela, el análisis de los valores de la escala WOMAC mostró un efecto positivo en los grupos que recibieron células para la reducción de los síntomas asociados a la artrosis. Es importante remarcar en este punto que aunque la administración aislada de AH fue eficaz en la escala WOMAC durante los primeros 6 meses, esta diferencia no se sostuvo a largo plazo. Por contra, el efecto positivo si se mantuvo en aquellos grupos que recibieron BM-MSCs. A diferencia de los que observamos en la escala visual analógica, solo el grupo que recibió dosis alta celulares (100 millones) mostró una reducción eficiente en la escala WOMAC, de tal manera que solamente este grupo cumplió los criterios de respuesta al tratamiento (Cambio en 2 subescalas de al menos el 20% y 10 puntos en los valores globales).

El efecto y el mecanismo por el cual las MSCs actúan sobre el dolor en la artrosis de rodilla es controvertido en la literatura. Un metaanálisis y una revisión han sido publicadas recientemente con este objetivo de análisis. Xia *et al.* evaluaron en su metaanálisis el resultado de 7 ensayos clínicos,

concluyendo que las células no eran capaces de reducir las escalas del dolor evaluadas. Desafortunadamente, la heterogeneidad de la metodología de los diferentes estudios incluidos en el análisis, con diferentes métodos de producción (cultivadas vs no cultivadas) y dosis, dificultan la obtención de conclusiones sólidas [230]. Por otra parte, Rodríguez-Merchán en su revisión de 25 trabajos publicados acerca de la inyección intraarticular de MSCs en artrosis de rodilla, encuentra que las MSCs inducen un alivio del dolor y mejoría funcional en tres ensayos clínicos aleatorizados. Al igual que ocurriera con el metaanálisis previamente citado, los ensayos clínicos no son comparables en cuanto metodología al nuestro. El primero de los ensayos utiliza un concentrado de aspirado de médula ósea, el segundo utiliza progenitores de sangre periférica y el tercero células cultivadas asociadas a osteotomía de tibia, la cual es un tratamiento quirúrgico establecido con un impacto importante y conocido en el alivio del dolor [231]. El número de ensayos clínicos aleatorizados comparando diferentes dosis es, por tanto, limitado. En un interesante trabajo, Orozco *et al.* reflejaron un efecto en el alivio del dolor y la mejora en la función en doce pacientes a los que se les administró una inyección intraarticular de 40×10^6 de MSCs cultivadas. Paralelamente, en un reciente estudio del mismo grupo, se refleja una mejoría clínica en pacientes menores de 65 años, que fue significativa tras 6 y 12 meses desde el tratamiento en 15 pacientes. En estos trabajos contaban con un único grupo de seguimiento, sin comparación con grupo control. En un ensayo aleatorizado más comparable al nuestro, utilizando MSCs alogénicas, Vega *et al.* obtuvieron buenos resultados clínicos en el control del dolor y función en la misma dosis

celular (40×10^6) cuando se compararon con la inyección única de ácido hialurónico [177].

La artrosis no ha sido considerada clásicamente dentro de las denominadas artropatías inflamatorias debido a la ausencia de los neutrófilos en el líquido sinovial y la falta de manifestaciones sistémicas de inflamación [33]. Sin embargo, con frecuencia se asocia con signos locales de inflamación y síntomas tales como dolor articular, aumento de volumen de las partes blandas y rigidez, lo que lleva a un deterioro funcional significativo con discapacidad en mayor o menor grado [32]. La mejora del dolor asociado a un efecto leve sobre la función y los resultados en la resonancia magnética nos sugieren que el efecto positivo de BM-MSCs pueden depender de su función paracrina sobre las células implicadas en la artrosis. Apoyando esta idea, las propiedades antiinflamatorias descritas en las MSCs se han correlacionado con la reducción del dolor [171, 173-175]. Esa disminución del dolor, explicarían los cambios positivos en la flexo-extensión de la rodilla. Aunque tales cambios son pequeños, hay que señalar que una limitación de sólo unos pocos grados en la extensión puede comprometer gravemente la marcha. Esta actividad paracrina nos abre una ventana futura a considerar este tipo de tratamientos en pacientes con artrosis en grado leve, en los que las MSCs inyectadas podrían ser más eficaces a través de su función paracrina cuando un cartílago sano todavía está presente, hecho que en el ensayo actual no ha podido ser estudiado.

6.5.- Radiología.

La interlínea articular se correlaciona con el grosor del cartílago y su mantenimiento, con la evolución del proceso degenerativo. En contra de lo que ocurre en el grupo de ácido hialurónico, cuya interlínea sufrió una reducción del espacio articular, en los grupos que recibieron células, esta interlínea se mantuvo a lo largo del ensayo. Debemos ser cautos a la hora de tomar una conclusión de estos datos. Si tenemos en cuenta que el 50% de los pacientes tienen una artrosis de rodilla grado IV, en la que la distancia de la interlínea es 0 y que el 50% de ellos (25% del total), se encuentran en el grupo de dosis baja celulares, lo que impide el seguimiento adecuado. Sin embargo, entre los grupos control y dosis alta, que tenían valores basales comparables, si que la evolución fue diferente. Este hallazgo es consistente con las observaciones de resonancia magnética y está de acuerdo con estudios publicados previamente que también investigaron el papel de las MSCs cultivadas o MSCs en matrices en la artrosis de rodilla.

6.6.- Dosis óptima de MSCs.

La dosis de MSCs requerida para el tratamiento de la artrosis de rodilla no ha sido establecida siendo un tema de investigación activa. A pesar de que hemos mencionado previamente el estudio preclínico en conejos de Deseando *et al.* no encontraron una respuesta dosis dependiente en la disminución de MMPs y TNF- α .

Existen indicios en estudios clínicos para pensar que existe una relación dosis dependiente entre el número de células inyectadas y el efecto producido. En

estudios diferentes, las dosis utilizadas van desde los 8 millones hasta los 100 millones. En el año 2014 Jo *et al.* publicaron un estudio piloto comparando tres dosis de MSCs derivadas de tejido adiposo cultivadas (1×10^6 , $n = 3$; 50×10^6 , $n = 3$; y 100×10^6 , $n=3$). Sólo el grupo de dosis alta de células mostró una reducción significativa del EVA a los 6 meses. Es de destacar que estas diferencias fueron observadas a pesar del pequeño número de pacientes incluidos. Dado estos resultados, aumentaron el número de pacientes en una segunda fase del estudio 100×10^6 ($n=9$), con resultados prometedores [232]. En consonancia con estos resultados, creemos que es preferible administrar 100×10^6 en lugar de 10×10^6 células. Sin embargo, esta conclusión debe ser tomada con precaución puesto que los pacientes que se encontraban en el grupo de dosis baja presentaban un mayor grado de artrosis que el grupo de dosis alta en el momento de ser incluidos en el ensayo, lo que puede dificultar su interpretación.

No existen estudios hasta la fecha que nos puedan informar del valor que pudiera tener la infiltración repetida de estas células, siendo numerosos los estudios que hablan de la necesidad y de la posibilidad, dados los pocos efectos secundarios, de valorar esta opción en ensayos futuros.

Es aceptado que los pacientes afectados de artrosis presentan un déficit de MSCs que conduce al desarrollo y mantenimiento del proceso degenerativo. Ese déficit, asociado no solo al grado de artrosis, sino también a la edad, no es solo cuantitativo (número de MSCs) sino que también afecta a la capacidad de proliferación y diferenciación, como se ha objetivado en estudios *in vitro*. A pesar de esa disminución tanto cualitativa como cuantitativa, hemos sido

capaces de obtener la cantidad celular propuesta de BM-MSCs en pacientes con artrosis, independientemente de su edad o grado de enfermedad [196, 226-228].

El presente estudio no está exento de limitaciones. En primer lugar, por cuestiones éticas no pudimos realizar un ensayo doble ciego. Con el fin de minimizar este inconveniente, las puntuaciones clínicas subjetivas fueron contrastadas con medidas objetivas para minimizar el sesgo. Además, dos radiólogos de manera independiente y ciega llevaron a cabo el análisis de las resonancias magnéticas. En segundo lugar, la relativamente corta duración del estudio no nos permitió analizar la eficacia de los tratamientos más allá de un año después de su administración. Por último, como se había previsto, la avanzada artrosis de una parte importante de los pacientes del grupo de dosis baja puede haber enmascarado los efectos beneficiosos asociados a la inyección de MSCs.

6.7.- Cuestiones futuras sobre el uso de las MSCs en el tratamiento de la artrosis.

Son numerosas las cuestiones acerca del uso en artrosis de las MSCs. Además de la dosis y la fuente que todavía no está bien establecida, futuros estudios serán necesarios para determinar la necesidad de repetir este tipo de infiltraciones, así como el momento adecuado para su infiltración. Si suponemos un efecto paracrino en las células que estamos inyectando, el valor teórico de poder actuar en condrocitos presentes en el cartílago sería alto

pudiendo esperar una acción a ese nivel, que en estadios avanzados de la enfermedad no somos capaces de observar, por la ausencia de los mismos.

En otro orden de cosas, aumentar la capacidad para la implantación de estas células en el lugar deseado, plantearía una mayor eficacia de estas terapias.

En la artrosis de rodilla, con grandes áreas desnudas de cartílago, sería importante el uso de matrices o membranas que las soporten en aquel sitio donde presumiblemente sería más necesario. Hemos intentado utilizar el AH en este sentido, pero debemos pensar que esto es insuficiente para contenerlas.

El intentar llevar a las MSCs a un punto de inducción mayor de condrogénesis *in vitro* y en ese punto implantarlas *in vivo*, podría tener su importancia. En un modelo animal en ovejas, que usaba BM-MSCs fueron cultivadas 3 semanas en medio que contenía 5 ng/ml TGF- β 3 y 50 ng/ml IGF-I, después del cual fueron infiltradas [233]. Las rodillas tratadas con BM-MSCs tratadas en este medio condrogénico mostraron mejorías en el efecto regenerador del cartílago articular.

6.8.- Estudios comparativos de las fuentes.

No existen estudios clínicos que comparen la eficacia de 2 fuentes diferentes de MSCs, no habiéndose establecido la fuente óptima de los mismos [212]. Lo que sí parece por estudios *in vitro* es que las células derivadas de la sinovial son las que tienen mayor potencial condrogénico, seguido en esta línea por las derivadas de médula ósea y periostio. Las derivadas de tejido adiposo y sinovial son las que presentarían mayor capacidad en términos de osteogénesis [234, 235].

En estudios preclínicos, en ratones, en el año 2002 Wakitani *et al.* compararon las MSCs obtenidas de periostio con las obtenidas de médula ósea, colocadas sobre gel de colágeno para el tratamiento de defectos del cartílago articular. Las puntuaciones histológicas de los dos grupos fueron similares, mejorando hasta en las 4 semanas, a partir de la cual, la estructura de cartílago observada en el grupo de BM-MSCs fue más parecida al cartílago original y más ordenado que en el grupo de periostio [236]. Un año más tarde, en conejos, Nathan *et al.* compararon las MSCs derivadas de periostio y las derivadas de tejido adiposo en matriz de fibrina para el tratamiento de defectos condrales. A nivel histológico y biomecánico, los defectos reparados por células derivadas de tejido adiposo parecían ser mejores que los obtenidos por las células derivadas de periostio [237]. En 2006, Park *et al.* utilizaron las MSCs de periostio, médula ósea y grasa de ratas adultas con el objetivo de regenerar defectos del cartílago de la rodilla. Antes de la implantación, las MSCs fueron prediferenciadas a la línea condrogénica través de vectores adenovirales conteniendo ADNc de *BMP-2*. Los resultados fueron consistentes con los nombrados previamente [238]. En 2008, Koga *et al.* obtuvieron resultados también consistentes con esta línea, mostrando la superioridad de las MSCs sinoviales y BM-MSCs para la reparación de defectos condrales en conejos [239].

En modelos de animales grandes, Frisbie *et al.* con inyecciones de ADMSCs y BM-MSCs para el tratamiento de la artrosis, no mostraron diferencias significativas, aunque el seguimiento fue solo de 70 días. Este fue pionero al comenzar a usar células inyectadas y en enfermedad artrósica [214].

Pero no solo debemos tener en cuenta la capacidad condrógena u osteogénica para el tratamiento de pacientes. También juega un papel fundamental la capacidad para el cultivo y la expansión de las mismas, para poder alcanzar la dosis que tenemos planificada. Sakaguchi describió que la facilidad para el cultivo era mayor en células derivadas tanto de médula ósea como de sinovial, siendo las de músculo y tejido adiposo las que perdían antes su potencial de expansión, aguantando menos pases en el cultivo. Por otra parte, el acceso a la sinovial de los pacientes no es sencillo, requiriendo de un método más invasivo para su obtención [235].

La posibilidad de uso de células alogénicas abre una puerta a potenciales mejoras en el tratamiento, cuanto menos interesantes. La ausencia de biopsia, el uso de células madre de donantes jóvenes así como la reducción de costes, podrían estar entre ellas. Vega *et al.* compararon el uso de células alogénicas de 3 donantes distintos, mostrando buenos resultados clínicos, aunque fueron menores a los encontrados con células autólogas [177].

7.- CONCLUSIONES

1. La inyección única intraarticular de células madre mesenquimales cultivadas autólogas derivadas de médula ósea y asociadas a ácido hialurónico es un procedimiento seguro y viable en pacientes con grados moderados-avanzados de artrosis de rodilla.
2. La inyección intraarticular de células madre mesenquimales autólogas cultivadas derivadas de médula ósea se traduce en una mejoría clínica y funcional en grados moderados-avanzados de artrosis de rodilla, especialmente cuando se administran en dosis elevadas (100 millones).
3. Estos resultados abren el camino para la realización de un ensayo clínico fase III.

Referencias

1. Simon, L.S., *Osteoarthritis*. Curr Rheumatol Rep, 1999. 1(1): p. 45-7.
2. Buckwalter, J.A., C. Saltzman, and T. Brown, *The impact of osteoarthritis: implications for research*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S6-15.
3. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. 418(6893): p. 41-9.
4. Leveille, S.G., *Musculoskeletal aging*. Curr Opin Rheumatol, 2004. 16(2): p. 114-8.
5. Gupta, S., et al., *The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(12): p. 1531-7.
6. Peat, G., R. McCarney, and P. Croft, *Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care*. Ann Rheum Dis, 2001. 60(2): p. 91-7.
7. Linn, F.C. and L. Sokoloff, *Movement and Composition of Interstitial Fluid of Cartilage*. Arthritis Rheum, 1965. 8: p. 481-94.
8. Mow, V.C., et al., *Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments*. J Biomech Eng, 1980. 102(1): p. 73-84.
9. Maroudas, A., *Physicochemical properties of articular cartilage*, in *Adult articular cartilage*, M.A.R. Freeman, Editor. 1979, Pitman Medical: Tunbridge Wells, Eng. p. 215-290.

10. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. 33(2): p. 295-306.
11. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. Instr Course Lect, 1998. 47: p. 477-86.
12. Masuda, K., et al., *A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method*. J Orthop Res, 2003. 21(1): p. 139-48.
13. Torzilli, P.A., et al., *Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content*. J Biomech Eng, 1999. 121(5): p. 433-41.
14. Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am, 1982. 64(3): p. 460-6.
15. Howell, D.S., Treadmwell, B.V., Trippel, S.B., *Etiopathogenesis of osteoarthritis*. Osteoarthritis : diagnosis and medical/surgical management, ed. R.W. Moskowitz. 1992, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
16. Maroudas, A., et al., *The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1073(2): p. 285-94.
17. Torzilli, P.A., *Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition*. J Orthop Res, 1985. 3(4): p. 473-83.

18. Ateshian, G.A., et al., *Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments*. J Biomech, 1997. 30(11-12): p. 1157-64.
19. Mow, V.C., G.A. Ateshian, and A. Ratcliffe, *Anatomic Form and Biomechanical Properties of Articular-Cartilage of the Knee-Joint*. Biology and Biomechanics of Traumatized Synovial Joint : The Knee as a Model, 1992: p. 55-81.
20. Mankin, H.J., Mow, V.C., Buckwalter, J.A., Ioannotti, J.P., *Form and function of articular cartilage*. Orthopaedic basic science, ed. S.R. Simon and American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1994, Rosemont, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons. xvi, 704 p.
21. Frank, E.H. and A.J. Grodzinsky, *Cartilage electromechanics--I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength*. J Biomech, 1987. 20(6): p. 615-27.
22. Mow, V.C., Rosenwasser, M., *Articular cartilage: biomechanics*. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues : workshop, Savannah, Georgia, June 1987, ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Symposium (1987 : Savannah Ga.), et al. 1988, Park Ridge, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons. 548 p.
23. Woo, S.L., et al., *Temperature dependent behavior of the canine medial collateral ligament*. J Biomech Eng, 1987. 109(1): p. 68-71.
24. Setton, L.A., H. Tohyama, and V.C. Mow, *Swelling and curling behaviors of articular cartilage*. J Biomech Eng, 1998. 120(3): p. 355-61.

25. Eggli, P.S., et al., *Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats*. Anat Rec, 1985. 211(3): p. 246-57.
26. Guilak, F. and V.C. Mow, *The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage*. J Biomech, 2000. 33(12): p. 1663-73.
27. Muir, H., *The chondrocyte, architect of cartilage*. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays, 1995. 17(12): p. 1039-48.
28. Poole, A.R., *Cartilage in health and disease*. 12th ed. Arthritis and allied conditions : a textbook of rheumatology, ed. D.J. McCarty and W.J. Koopman. 1993, Philadelphia: Lea & Febiger.
29. Szirmai, J.A., *Structure of cartilage*. Aging of connective and skeletal tissue. Symposium 1-3 October, 1968, ed. A. Engel, T. Larsson, and Skandiakoncernen. 1969, Stockholm,: Nordiska bokhandeln. 336 p.
30. Mow, V.C. and X.E. Guo, *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. Annu Rev Biomed Eng, 2002. 4: p. 175-209.
31. Simon, B.R., R.S. Coats, and S.L. Woo, *Relaxation and creep quasilinear viscoelastic models for normal articular cartilage*. J Biomech Eng, 1984. 106(2): p. 159-64.
32. Felson, D.T., *Clinical practice. Osteoarthritis of the knee*. N Engl J Med, 2006. 354(8): p. 841-8.
33. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. J Cell Physiol, 2007. 213(3): p. 626-34.

34. Pers, Y.M., et al., *Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. 23(11): p. 2027-35.
35. Schneider, E.M., et al., *The (-765 G->C) promoter variant of the COX-2/PTGS2 gene is associated with a lower risk for end-stage hip and knee osteoarthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70(8): p. 1458-60.
36. van Lent, P.L., et al., *Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2008. 67(12): p. 1750-8.
37. Ritter, S.Y., et al., *Proteomic analysis of synovial fluid from the osteoarthritic knee: comparison with transcriptome analyses of joint tissues*. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(4): p. 981-92.
38. Jones, E.A., et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 817-27.
39. Orth, P., et al., *Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair--translational data and clinical evidence*. *Eur Cell Mater*, 2013. 25: p. 299-316; discussion 314-6.
40. Burr, D.B. and M.A. Gallant, *Bone remodelling in osteoarthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. 8(11): p. 665-73.
41. Radin, E.L., I.L. Paul, and M.J. Tolkoff, *Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease*. *Arthritis Rheum*, 1970. 13(4): p. 400-5.

42. Radin, E.L., I.L. Paul, and R.M. Rose, *Role of mechanical factors in pathogenesis of primary osteoarthritis*. Lancet, 1972. 1(7749): p. 519-22.
43. Burr, D.B., *Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. 12 Suppl A: p. S20-30.
44. Day, J.S., et al., *A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritis cartilage damage*. J Orthop Res, 2001. 19(5): p. 914-8.
45. Luyten, F.P., et al., *Definition and classification of early osteoarthritis of the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. 20(3): p. 401-6.
46. Madry, H., et al., *Early osteoarthritis of the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2016. 24(6): p. 1753-62.
47. Buckland-Wright, J.C., et al., *Technetium 99m methylene diphosphonate bone scanning in osteoarthritic hands*. Eur J Nucl Med, 1991. 18(1): p. 12-6.
48. Buckland-Wright, J.C., J.A. Lynch, and B. Dave, *Early radiographic features in patients with anterior cruciate ligament rupture*. Ann Rheum Dis, 2000. 59(8): p. 641-6.
49. Burr, D.B. and E.L. Radin, *Microfractures and microcracks in subchondral bone: are they relevant to osteoarthrosis?* Rheum Dis Clin North Am, 2003. 29(4): p. 675-85.
50. Duncan, H., et al., *The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study*. J Bone Joint Surg Am, 1987. 69(8): p. 1212-20.

51. Funck-Brentano, T. and M. Cohen-Solal, *Crosstalk between cartilage and bone: when bone cytokines matter*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. 22(2): p. 91-7.
52. Pesesse, L., C. Sanchez, and Y. Henrotin, *Osteochondral plate angiogenesis: a new treatment target in osteoarthritis*. Joint Bone Spine, 2011. 78(2): p. 144-9.
53. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. 1192: p. 230-7.
54. Intema, F., et al., *Similarities and discrepancies in subchondral bone structure in two differently induced canine models of osteoarthritis*. J Bone Miner Res, 2010. 25(7): p. 1650-7.
55. Yang, L., et al., *Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(33): p. 12097-102.
56. Zhou, X., et al., *Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice*. PLoS Genet, 2014. 10(12): p. e1004820.
57. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. 16(4): p. 494-502.
58. Chan, T.F., et al., *Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2011. 26(7): p. 1399-410.

59. Couchourel, D., et al., *Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production.* Arthritis Rheum, 2009. 60(5): p. 1438-50.
60. Cucchiaroni, M., et al., *Basic science of osteoarthritis.* J Exp Orthop, 2016. 3(1): p. 22.
61. Lavigne, P., et al., *Subchondral and trabecular bone metabolism regulation in canine experimental knee osteoarthritis.* Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(4): p. 310-7.
62. Guevremont, M., et al., *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, 2003. 18(6): p. 1073-81.
63. Hilal, G., et al., *Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis.* Arthritis Rheum, 1998. 41(5): p. 891-9.
64. Mansell, J.P. and A.J. Bailey, *Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis.* J Clin Invest, 1998. 101(8): p. 1596-603.
65. Mutabaruka, M.S., et al., *Local leptin production in osteoarthritis subchondral osteoblasts may be responsible for their abnormal phenotypic expression.* Arthritis Res Ther, 2010. 12(1): p. R20.
66. van der Kraan, P.M., et al., *TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling*

- pathways through receptor-Smads. Osteoarthritis Cartilage*, 2009. 17(12): p. 1539-45.
67. Dumond, H., et al., *Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. Arthritis Rheum*, 2003. 48(11): p. 3118-29.
68. Reboul, P., et al., *Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. Arthritis Rheum*, 2001. 44(1): p. 73-84.
69. Richter, M., et al., *Correlations between serum adipocytokine concentrations, disease stage, radiological status and total body fat content in the patients with primary knee osteoarthritis. Int Orthop*, 2016.
70. Otero, M., et al., *Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. Arthritis Res Ther*, 2005. 7(3): p. R581-91.
71. Massicotte, F., et al., *Abnormal insulin-like growth factor 1 signaling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. Arthritis Res Ther*, 2006. 8(6): p. R177.
72. Conaghan, P.G., et al., *Clinical and ultrasonographic predictors of joint replacement for knee osteoarthritis: results from a large, 3-year, prospective EULAR study. Ann Rheum Dis*, 2010. 69(4): p. 644-7.
73. Loeuille, D., et al., *Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic*

- resonance imaging findings with disease severity. Arthritis Rheum, 2005. 52(11): p. 3492-501.*
74. Myers, S.L., et al., *Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. J Rheumatol, 1990. 17(12): p. 1662-9.*
75. Smith, M.D., et al., *Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. J Rheumatol, 1997. 24(2): p. 365-71.*
76. Ayrál, X., et al., *Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(5): p. 361-7.*
77. Blom, A.B., et al., *Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. Arthritis Rheum, 2007. 56(1): p. 147-57.*
78. Mazor, M., et al., *Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. J Cell Mol Med, 2014. 18(12): p. 2340-50.*
79. Birkedal-Hansen, H., et al., *Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med, 1993. 4(2): p. 197-250.*
80. Mueller, M.B. and R.S. Tuan, *Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. PM R, 2011. 3(6 Suppl 1): p. S3-11.*
81. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther, 2009. 11(3): p. 224.*

82. Murphy, G. and H. Nagase, *Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?* Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. 4(3): p. 128-35.
83. Khan, I.M., et al., *Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review.* Eur Cell Mater, 2008. 16: p. 26-39.
84. Buttner, F.H., et al., *Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in human articular cartilage.* Arthritis Rheum, 1997. 40(4): p. 704-9.
85. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.* Arthritis Res, 2002. 4(3): p. 157-64.
86. Roach, H.I., et al., *Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions.* Arthritis Rheum, 2005. 52(10): p. 3110-24.
87. Fukui, N., et al., *Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage.* Arthritis Rheum, 2008. 58(12): p. 3843-53.
88. Huang, K. and L.D. Wu, *Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review.* J Int Med Res, 2008. 36(6): p. 1149-60.
89. Verma, P. and K. Dalal, *ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis.* J Cell Biochem, 2011. 112(12): p. 3507-14.

90. Glasson, S.S., et al., *Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis*. *Nature*, 2005. 434(7033): p. 644-8.
91. Song, R.H., et al., *Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5*. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(2): p. 575-85.
92. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. 21(1): p. 16-21.
93. Farahat, M.N., et al., *Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Ann Rheum Dis*, 1993. 52(12): p. 870-5.
94. Munoz-Valle, J.F., et al., *High expression of TNF alpha is associated with -308 and -238 TNF alpha polymorphisms in knee osteoarthritis*. *Clin Exp Med*, 2014. 14(1): p. 61-7.
95. Pelletier, J.P. and J. Martel-Pelletier, *Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID*. *J Rheumatol Suppl*, 1989. 18: p. 19-27.
96. Tetlow, L.C., D.J. Adlam, and D.E. Woolley, *Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes*. *Arthritis Rheum*, 2001. 44(3): p. 585-94.
97. Wood, D.D., et al., *Isolation of an interleukin-1-like factor from human joint effusions*. *Arthritis Rheum*, 1983. 26(8): p. 975-83.

98. O'Byrne, E.M., et al., *Elevated substance P and accelerated cartilage degradation in rabbit knees injected with interleukin-1 and tumor necrosis factor*. *Arthritis Rheum*, 1990. 33(7): p. 1023-8.
99. Martel-Pelletier, J., et al., *The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function*. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(5): p. 530-40.
100. Pelletier, J.P., et al., *In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(6): p. 1012-9.
101. Caron, J.P., et al., *Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression*. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(9): p. 1535-44.
102. Fernandes, J., et al., *In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression*. *Am J Pathol*, 1999. 154(4): p. 1159-69.
103. Goldring, M.B. and F. Berenbaum, *Human chondrocyte culture models for studying cyclooxygenase expression and prostaglandin regulation of collagen gene expression*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(4): p. 386-8.
104. Goldring, M.B., et al., *Regulation of Collagen Gene Expression by Prostaglandins and Interleukin-1beta in Cultured Chondrocytes and Fibroblasts*. *Am J Ther*, 1996. 3(1): p. 9-16.

105. Chubinskaya, S., et al., *Effects induced by BMPS in cultures of human articular chondrocytes: comparative studies*. Growth Factors, 2008. 26(5): p. 275-83.
106. Fukui, N., et al., *Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85-A Suppl 3: p. 59-66.
107. Bobinac, D., et al., *Expression of bone morphogenetic proteins, cartilage-derived morphogenetic proteins and related receptors in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Coll Antropol, 2008. 32 Suppl 2: p. 83-7.
108. van der Kraan, P.M., E.N. Blaney Davidson, and W.B. van den Berg, *Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's?* Osteoarthritis Cartilage, 2010. 18(6): p. 735-41.
109. Sitcheran, R., P.C. Cogswell, and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism*. Genes Dev, 2003. 17(19): p. 2368-73.
110. Goldring, M.B., *Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012. 4(4): p. 269-85.
111. Schroepel, J.P., et al., *Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis*. Histol Histopathol, 2011. 26(3): p. 377-94.

112. Yang, S., et al., *Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction*. Nat Med, 2010. 16(6): p. 687-93.
113. Madry, H., F.P. Luyten, and A. Facchini, *Biological aspects of early osteoarthritis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. 20(3): p. 407-22.
114. Wang, M., et al., *Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1240: p. 61-9.
115. Hernandez-Diaz, S., C. Varas-Lorenzo, and L.A. Garcia Rodriguez, *Non-steroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. 98(3): p. 266-74.
116. Jordan, K.M., et al., *EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)*. Ann Rheum Dis, 2003. 62(12): p. 1145-55.
117. Schnitzer, T.J. and R. American College of, *Update of ACR guidelines for osteoarthritis: role of the coxibs*. J Pain Symptom Manage, 2002. 23(4 Suppl): p. S24-30; discussion S31-4.
118. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(9): p. 981-1000.

119. Zhang, W., et al., *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*, 2010. 18(4): p. 476-99.
120. Brouwer, R.W., et al., *Brace treatment for osteoarthritis of the knee: a prospective randomized multi-centre trial*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(8): p. 777-83.
121. Kirkley, A., et al., *The effect of bracing on varus gonarthrosis*. *J Bone Joint Surg Am*, 1999. 81(4): p. 539-48.
122. Kon, E., et al., *Non-surgical management of early knee osteoarthritis*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2012. 20(3): p. 436-49.
123. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(4): p. 568-84.
124. Frech, T.M. and D.O. Clegg, *The utility of nutraceuticals in the treatment of osteoarthritis*. *Curr Rheumatol Rep*, 2007. 9(1): p. 25-30.
125. Hauselmann, H.J., *Nutripharmaceuticals for osteoarthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001. 15(4): p. 595-607.
126. Henrotin, Y., C. Sanchez, and M. Balligand, *Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: present and future perspectives*. *Vet J*, 2005. 170(1): p. 113-23.
127. McAlindon, T.E., et al., *OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014. 22(3): p. 363-88.

128. Sawitzke, A.D., et al., *The effect of glucosamine and/or chondroitin sulfate on the progression of knee osteoarthritis: a report from the glucosamine/chondroitin arthritis intervention trial*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(10): p. 3183-91.
129. Hochberg, M.C., et al., *Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib*. *Ann Rheum Dis*, 2016. 75(1): p. 37-44.
130. Singh, J.A., et al., *Chondroitin for osteoarthritis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015. 1: p. CD005614.
131. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(2): p. 137-62.
132. Sherman, S.L., et al., *In Vitro Toxicity of Local Anesthetics and Corticosteroids on Chondrocyte and Synoviocyte Viability and Metabolism*. *Cartilage*, 2015. 6(4): p. 233-40.
133. Fibel, K.H., H.J. Hillstrom, and B.C. Halpern, *State-of-the-Art management of knee osteoarthritis*. *World J Clin Cases*, 2015. 3(2): p. 89-101.
134. McGarry, J.G. and Z.J. Daruwalla, *The efficacy, accuracy and complications of corticosteroid injections of the knee joint*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011. 19(10): p. 1649-54.
135. Campbell, K.A., et al., *Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the*

- Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. Arthroscopy*, 2015. 31(10): p. 2036-45 e14.
136. Forogh, B., et al., *Effect of single injection of platelet-rich plasma in comparison with corticosteroid on knee osteoarthritis: a double-blind randomized clinical trial. J Sports Med Phys Fitness*, 2016. 56(7-8): p. 901-8.
137. Wang, F. and X. He, *Intra-articular hyaluronic acid and corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A meta-analysis. Exp Ther Med*, 2015. 9(2): p. 493-500.
138. Bodick, N., et al., *An intra-articular, extended-release formulation of triamcinolone acetonide prolongs and amplifies analgesic effect in patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. J Bone Joint Surg Am*, 2015. 97(11): p. 877-88.
139. Heard, B.J., et al., *Single intra-articular dexamethasone injection immediately post-surgery in a rabbit model mitigates early inflammatory responses and post-traumatic osteoarthritis-like alterations. J Orthop Res*, 2015. 33(12): p. 1826-34.
140. Corbett, M.S., et al., *Acupuncture and other physical treatments for the relief of pain due to osteoarthritis of the knee: network meta-analysis. Osteoarthritis Cartilage*, 2013. 21(9): p. 1290-8.
141. Fakhari, A. and C. Berklund, *Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. Acta Biomater*, 2013. 9(7): p. 7081-92.

142. Conrozier, T., et al., *Early effect of hyaluronic acid intra-articular injections on serum and urine biomarkers in patients with knee osteoarthritis: An open-label observational prospective study.* J Orthop Res, 2012. 30(5): p. 679-85.
143. van Tiel, J., et al., *Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) shows no change in cartilage structural composition after viscosupplementation in patients with early-stage knee osteoarthritis.* PLoS One, 2013. 8(11): p. e79785.
144. Bellamy, N., et al., *Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee.* Cochrane Database Syst Rev, 2006(2): p. CD005328.
145. Juni, P., et al., *Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee.* Ann Intern Med, 2013. 158(1): p. 75.
146. Rutjes, A.W., et al., *Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis.* Ann Intern Med, 2012. 157(3): p. 180-91.
147. Hunter, D.J., *Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee.* N Engl J Med, 2015. 372(11): p. 1040-7.
148. Kruger, J.P., et al., *Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells.* J Orthop Res, 2012. 30(6): p. 845-52.
149. Khoshbin, A., et al., *The efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review with quantitative synthesis.* Arthroscopy, 2013. 29(12): p. 2037-48.

150. Spakova, T., et al., *Treatment of knee joint osteoarthritis with autologous platelet-rich plasma in comparison with hyaluronic acid*. Am J Phys Med Rehabil, 2012. 91(5): p. 411-7.
151. Patel, S., et al., *Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial*. Am J Sports Med, 2013. 41(2): p. 356-64.
152. Fidelix, T.S., et al., *Diacerein for osteoarthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(2): p. CD005117.
153. Iwamoto, J., et al., *Effects of risedronate on osteoarthritis of the knee*. Yonsei Med J, 2010. 51(2): p. 164-70.
154. McAlindon, T., et al., *Effect of vitamin D supplementation on progression of knee pain and cartilage volume loss in patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial*. JAMA, 2013. 309(2): p. 155-62.
155. Laev, S.S. and N.F. Salakhutdinov, *Anti-arthritic agents: progress and potential*. Bioorg Med Chem, 2015. 23(13): p. 3059-80.
156. Kirkley, A., et al., *A randomized trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee*. N Engl J Med, 2008. 359(11): p. 1097-107.
157. Friedenstein, A.J., et al., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. Transplantation, 1968. 6(2): p. 230-47.
158. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-7.

159. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2005. 7(5): p. 393-5.
160. Qi, Y., G. Feng, and W. Yan, *Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis*. *Mol Biol Rep*, 2012. 39(5): p. 5683-9.
161. Burger, S.R., *Current regulatory issues in cell and tissue therapy*. *Cytotherapy*, 2003. 5(4): p. 289-98.
162. Fekete, N., et al., *GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC*. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e43255.
163. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2): p. 341-7.
164. Gupta, P.K., et al., *Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis*. *Stem Cell Res Ther*, 2012. 3(4): p. 25.
165. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. *Blood*, 2001. 98(8): p. 2396-402.
166. Karp, J.M. and G.S. Leng Teo, *Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details*. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(3): p. 206-16.
167. Le Blanc, K. and O. Ringden, *Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience*. *J Intern Med*, 2007. 262(5): p. 509-25.
168. Ortiz, L.A., et al., *Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8407-11.

169. Togel, F., et al., *Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. 289(1): p. F31-42.
170. Zappia, E., et al., *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood, 2005. 106(5): p. 1755-61.
171. Doorn, J., et al., *Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements*. Tissue Eng Part B Rev, 2012. 18(2): p. 101-15.
172. Meirelles Lda, S., et al., *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. 20(5-6): p. 419-27.
173. Salgado, A.J., et al., *Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine*. Curr Stem Cell Res Ther, 2010. 5(2): p. 103-10.
174. Abumaree, M., et al., *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Rev, 2012. 8(2): p. 375-92.
175. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(9): p. 726-36.
176. Barry, F. and M. Murphy, *Mesenchymal stem cells in joint disease and repair*. Nat Rev Rheumatol, 2013. 9(10): p. 584-94.
177. Vega, A., et al., *Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial*. Transplantation, 2015. 99(8): p. 1681-90.

178. Orozco, L., et al., *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study*. *Transplantation*, 2013. 95(12): p. 1535-41.
179. Tse, W.T., et al., *Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation*. *Transplantation*, 2003. 75(3): p. 389-97.
180. Liu, J., et al., *Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line*. *Transplant Proc*, 2004. 36(10): p. 3272-5.
181. Desando, G., et al., *Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model*. *Arthritis Res Ther*, 2013. 15(1): p. R22.
182. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes*. *Scand J Immunol*, 2004. 60(3): p. 307-15.
183. Lazarus, H.M., et al., *Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005. 11(5): p. 389-98.
184. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(1): p. 204.

185. Bergman, R.J., et al., *Age-related changes in osteogenic stem cells in mice*. J Bone Miner Res, 1996. 11(5): p. 568-77.
186. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Exp Cell Res, 2001. 268(2): p. 189-200.
187. Grassel, S. and N. Ahmed, *Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation*. Front Biosci, 2007. 12: p. 4946-56.
188. Sekiya, I., et al., *Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma*. Cell Tissue Res, 2005. 320(2): p. 269-76.
189. Mosna, F., L. Sensebe, and M. Krampera, *Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide*. Stem Cells Dev, 2010. 19(10): p. 1449-70.
190. Chang, C.H., et al., *Tissue engineering-based cartilage repair with mesenchymal stem cells in a porcine model*. J Orthop Res, 2011. 29(12): p. 1874-80.
191. Sensebe, L., et al., *Mesenchymal stem cells for clinical application*. Vox Sang, 2010. 98(2): p. 93-107.
192. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells, 2006. 24(5): p. 1294-301.
193. Aust, L., et al., *Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates*. Cytotherapy, 2004. 6(1): p. 7-14.

194. Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol, 2006. 24(4): p. 150-4.
195. De Bari, C., et al., *A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2008. 58(1): p. 240-50.
196. Im, G.I., N.H. Jung, and S.K. Tae, *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors*. Tissue Eng, 2006. 12(3): p. 527-36.
197. Deans, R.J. and A.B. Moseley, *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses*. Exp Hematol, 2000. 28(8): p. 875-84.
198. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. 284(5411): p. 143-7.
199. Prockop, D.J., *Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms*. Mol Ther, 2009. 17(6): p. 939-46.
200. Dougados, M., et al., *Efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, in the treatment of ankylosing spondylitis: a six-week controlled study with comparison against placebo and against a conventional nonsteroidal antiinflammatory drug*. Arthritis Rheum, 2001. 44(1): p. 180-5.
201. Peterfy, C.G., et al., *Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. 12(3): p. 177-90.

202. Steinert, A.F., et al., *Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage*. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9(3): p. 213.
203. Knutsen, G., et al., *A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years*. *J Bone Joint Surg Am*, 2007. 89(10): p. 2105-12.
204. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 889-95.
205. Nejadnik, H., et al., *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study*. *Am J Sports Med*, 2010. 38(6): p. 1110-6.
206. Horie, M., et al., *Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012. 20(10): p. 1197-207.
207. Caplan, A.I., *Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics*. *Tissue Eng*, 2005. 11(7-8): p. 1198-211.
208. Murphy, J.M., et al., *Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(3): p. 704-13.
209. Peeters, C.M., et al., *Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. 21(10): p. 1465-73.

210. Reichenbach, S., et al., *Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis*. *Arthritis Rheum*, 2007. 57(8): p. 1410-8.
211. Orozco, L., et al., *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results*. *Transplantation*, 2014. 97(11): p. e66-8.
212. Filardo, G., et al., *Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2013. 21(8): p. 1717-29.
213. Agung, M., et al., *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*, 2006. 14(12): p. 1307-14.
214. Frisbie, D.D., et al., *In vivo evaluation of autologous cartilage fragment-loaded scaffolds implanted into equine articular defects and compared with autologous chondrocyte implantation*. *Am J Sports Med*, 2009. 37 Suppl 1: p. 71S-80S.
215. Gangji, V., V. De Maertelaer, and J.P. Hauzeur, *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*, 2011. 49(5): p. 1005-9.
216. Lee, K.B., et al., *Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model*. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2964-71.

217. Prockop, D.J., et al., *Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy*. *Cytotherapy*, 2010. 12(5): p. 576-8.
218. Prockop, D.J. and A. Keating, *Relearning the lessons of genomic stability of human cells during expansion in culture: implications for clinical research*. *Stem Cells*, 2012. 30(6): p. 1051-2.
219. Rosland, G.V., et al., *Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation*. *Cancer Res*, 2009. 69(13): p. 5331-9.
220. Torsvik, A., et al., *Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter*. *Cancer Res*, 2010. 70(15): p. 6393-6.
221. Kuznetsov, S.A., M.H. Mankani, and P.G. Robey, *Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation*. *Transplantation*, 2000. 70(12): p. 1780-7.
222. Mackensen, A., et al., *Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. 49(3): p. 152-6.
223. Selvaggi, T.A., R.E. Walker, and T.A. Fleisher, *Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions*. *Blood*, 1997. 89(3): p. 776-9.

224. Tuschong, L., et al., *Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy*. Hum Gene Ther, 2002. 13(13): p. 1605-10.
225. Chua, K.H., et al., *Retropatellar fat pad-derived stem cells from older osteoarthritic patients have lesser differentiation capacity and expression of stemness genes*. Cytotherapy, 2014. 16(5): p. 599-611.
226. Kafienah, W., et al., *Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients*. Arthritis Rheum, 2007. 56(1): p. 177-87.
227. Scharstuhl, A., et al., *Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology*. Stem Cells, 2007. 25(12): p. 3244-51.
228. Dudics, V., et al., *Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system*. Cells Tissues Organs, 2009. 189(5): p. 307-16.
229. Noth, U., A.F. Steinert, and R.S. Tuan, *Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. 4(7): p. 371-80.
230. Xia, P., et al., *Efficacy of mesenchymal stem cells injection for the management of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis*. Int Orthop, 2015. 39(12): p. 2363-72.
231. Rodriguez-Merchan, E.C., *Intra-articular injections of mesenchymal stem cells for knee osteoarthritis*. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2014. 43(12): p. E282-91.

232. Jo, C.H., et al., *Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial.* Stem Cells, 2014. 32(5): p. 1254-66.
233. Alfaqeh, H., et al., *Cell based therapy for osteoarthritis in a sheep model: gross and histological assessment.* Med J Malaysia, 2008. 63 Suppl A: p. 37-8.
234. Chen, F.H. and R.S. Tuan, *Mesenchymal stem cells in arthritic diseases.* Arthritis Res Ther, 2008. 10(5): p. 223.
235. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source.* Arthritis Rheum, 2005. 52(8): p. 2521-9.
236. Wakitani, S., et al., *Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees.* Osteoarthritis Cartilage, 2002. 10(3): p. 199-206.
237. Nathan, S., et al., *Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue.* Tissue Eng, 2003. 9(4): p. 733-44.
238. Park, J., et al., *Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells.* J Gene Med, 2006. 8(1): p. 112-25.
239. Koga, H., et al., *Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.* Cell Tissue Res, 2008. 333(2): p. 207-15.

ANEXO I

CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO DE ARTROSIS (ACR, American College of Rheumatology)

A) Usando historia y examen físico:

Dolor en la rodilla y 5 de los siguientes ítems:

1. Más de 50 años.
2. Rigidez matinal de menos de 30 minutos
3. Crujido a la movilización activa.
4. Sensibilidad ósea.
5. Aumento de volumen óseo.
6. Sin aumento de la temperatura sinovial.
7. VHS < 40 mm/hr
8. Factor reumatoide negativo.
9. Líquido sinovial compatible con artrosis.

Estos criterios tienen una sensibilidad de 92% y especificidad de 75%.

B) Usando datos clínicos y radiológicos:

Dolor en la rodilla más osteofitos y por lo menos 1 de los siguientes ítems:

1. Más de 50 años.
2. Rigidez menor de 30 minutos
3. Crujido a la movilización activa.

Estos criterios tienen una sensibilidad de 91% y especificidad de 86%.

ANEXO II

Clasificación radiográfica de la Artrosis de Kellgren & Lawrence.

Clasificación radiográfica de la Artrosis de Kellgren & Lawrence	
Grado I - OA dudosa	-Osteofitos cuestionables
	-Espacio articular normal
Grado II - OA mínima	-Osteofitos definidos
	-Espacio articular posiblemente disminuido
Grado III - OA moderada	-Osteofitos múltiples
	-Disminución definida del espacio articular
	-Esclerosis ósea subcondral
Grado IV - OA severa	-Osteofitos muy grandes
	-Severa disminución del espacio articular
	-Esclerosis ósea marcada
	-Quistes óseos
	-Deformidad o trastornos de alineación

Anexo III : Calendario de visitas

PROCEDIMIENTO	Selección	Tratamiento	Seguimiento					
		Día 0	24 h	Sem 1	Mes 1	Mes 3	Mes 6	Mes 12
Consentimiento informado	X							
Criterios inclusión/exclusión	X							
Extracción médula ósea	X							
Infusión células mesenquimales		X						
Visita (control Tolerancia)								
Constantes físicas			X	X	X	X	X	X
Síntomas			X	X	X	X	X	X
Parámetros CLINICOS (Dolor y Función)								
Escalas de Dolor	X				X	X	X	X
Escalas de Función	X				X	X	X	X
Balance articular	X				X	X	X	X
Parámetros Radiológicos								
Radiología Simple	X				X			X
Resonancia Magnética	X				X			X
Otros parámetros								
Reacciones adversas		X	X	X	X	X	X	X
Medicación/ tratamiento concomitante	X	X	X	X	X	X	X	X

Anexo IV: Eficacia del tratamiento evaluada por la escala KOOS

Dolor							
	Control		Dosis baja		Dosis alta		
	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	p
Basal	69.4	63.9; 75	48.6	44.4; 52.8	66.7	58.3; 72.2	0.008
1 mes	90.3	80.6;100	65.3	61.1;77.78	80.6	55.6;86.1	0.047
3 meses	83.3	80.6;86.1	72.2	47.2;86.1	73.6	69.4;88.9	0.308
6 meses	87.5	69.4;100	73.6	58.3;80.6	77.8	75;86.1	0.303
12 meses	83.3	72.2;91.7	70.8	55.6;8.3	80.6	69.44;88.9	0.386
Otros síntomas							
	Control		Dosis baja		Dosis alta		
	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	p
Basal	55.4	46.4;67.9	44.6	39.3;60.7	57.1	53.6;71.4	0.249
1 meses	60.7	50.0;71.4	53.6	46.4;60.7	53.6	50;64.3	0.535
3 meses	57.1	50;67.9	60.7	50;71.4	62.5	57.1;64.3	0.921
6 meses	67.9	46.4;71.4	58.9	53.6;60.7	60.7	57.1;64.3	0.307
12 meses	62.5	46.4;71.4	60.7	57.1;67.9	62.5	57.1;67.9	0.982
Actividades de la vida diaria (ADL)							
	Control		Dosis baja		Dosis alta		
	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	p
Basal	69.1	60.3;73.5	52.9	48.5;63.2	66.9	58.8;75	0.066
1 mes	89.0	76.5;94.1	72.1	63.2;86.8	77.2	67.7;85.3	0.172
3 meses	86.7	85.3;88.2	75	47.1;89.7	83.8	72.1;89.7	0.454
6 meses	89.7	64.7;97.1	74.3	66.2;88.3	81.6	76.5;83.8	0.519
12 meses	81.6	66.1;92.7	77.2	72.1;85.3	78.7	76.5;80.9	0.830

Deporte y actividad recreacional (Sport/Rec)

	Control		Dosis baja		Dosis alta		
	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	p
Basal	40.0	25.0;55.0	12.5	0.0;30.0	35.0	15.0;45.0	0.077
1 mes	52.5	40.0;83.3	30.0	20.0;35.0	45.0	35.0;75.0	0.074
3 meses	40.0	15.0;50.0	47.5	15.0;60.	67.5	40.0;85.0	0.261
6 meses	47.5	35.0;80.0	47.5	20.0;75.0	52.5	40.0;80.0	0.741
12 meses	35.0	30.0;75.0	37.5	30.0;60.0	47.5	40.0;65.0	0.766

Calidad de vida (QOL)

	Control		Dosis baja		Dosis alta		
	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	p
Basal	37.5	31.6;62.5	31.6	18.8;37.5	37.5	25.0;43.8	0.354
1 mes	59.4	31.3;68.8	37.5	31.3;62.5	34.4	18.8;68.8	0.542
3 meses	50.0	43.8;68.8	43.8	25.0;62.5	59.4	37.5;75.0	0.486
6 meses	68.8	43.8;87.5	37.5	25.0;75.0	65.7	43.8;75.0	0.251
12 meses	53.1	31.3;75.0	37.5	25.0;62.5	65.6	50.0;68.8	0.305

Anexo V: Resultados de la escala WORMS
(Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score)

Estructura	**Compartimento Rodilla	Visita	Control		Dosis baja		Dosis alta		P
			Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	Mediana	p25; p75	
Cartilago	MFTJ	Basal	16	4; 21	21	19; 25	8	3; 12	0.021
		6 meses	16	4; 22	17	11; 23	5	3; 14	0.104
		12 meses	9	3; 18	22	14; 25	4	2; 19	0.027
	LFTJ	Basal	4	1;11	7	5;10	4	1;7	0.285
		6 meses	3	1;12	7	3;8	5	1;7	0.473
		12 meses	2	1;4	5	2;8	4	1;6	0.352
	PFJ	Basal	10	7;13	9	7;15	8	5;16	0.976
		6 meses	9	3;12	10	7;10	8	5;16	0.910
		12 meses	9	0;11	7	6;11	7	3;15	0.958
	Total	Basal	33	20;38	38	35;49	25	18;35	0.034
		6 meses	31	15;40	28	25;47	21	20;32	0.435
		12 meses	25	11;32	31	22;46	22	12;28	0.212
Médula ósea	MFTJ	Basal	0	0;2	3	1;7	0	0;1	0.092
		6 meses	0	0;5	3	2;6	1	0;2	0.099
		12 meses	0	0;4	4	2;7	1	0;2	0.044
	LFTJ	Basal	0	0;0	0	0;1	0	0;2	0.514
		6 meses	0	0;0	1	0;2	0	0;1	0.352
		12 meses	0	0;0	0	0;1	1	0;1	0.246
	PFJ	Basal	0	0;5	1	0;1	2	0;5	0.227
		6 meses	0	0;1	0	0;1	2	0;4	0.101
		12 meses	0	0;2	1	0;1	1	0;4	0.727
	S Región	Basal	0	0;0	1	0;1	0	0;1	0.344
		6 meses	0	0;1	1	0;1	1	0;1	0.543
		12 meses	0	0;0	0	0;1	0	0;1	0.814
	Total	Basal	3	0;8	4	2;9	5	2;7	0.714
		6 meses	4	0;7	5	2;9	5	2;7	0.520
		12 meses	5	0;7	5	2;9	5	3;7	0.501
Quistes	MFTJ	Basal	0	0;0	0	0;0	0	0;1	0.802
		6 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.727
		12 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.909

	LFTJ	Basal	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.318
		6 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.317
		12 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.596
	PFJ	Basal	0	0;0	0	0;0	1	0;2	0.105
		6 meses	0	0;1	0	0;0	1	0;2	0.132
		12 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;1	0.806
	S Región	Basal	0	0;0	0	0;1	0	0;1	0.284
		6 meses	0	0;0	1	0;1	0	0;1	0.134
		12 meses	0	0;0	0	0;1	0	0;0	0.460
	Total	Basal	0	0;1	0	0;2	2	0;3	0.568
		6 meses	0	0;1	1	0;1	3	0;4	0.233
		12 meses	0	0;1	2	0;2	0	0;2	0.602
Hueso	MFTJ	Basal	1	0;2	1	1;2	0	0;1	0.124
		6 meses	0	0;1	1	0;1	0	0;1	0.873
		12 meses	0	0;1	1	0;1	0	0;0	0.044
	LFTJ	Basal	0	0;0	0	0;1	0	0;0	0.670
		6 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.727
		12 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.796
	PFJ	Basal	1	0;2	0	0;1	1	0;2	0.246
		6 meses	1	0;2	0	0;0	0	0;1	0.414
		12 meses	0	0;1	0	0;0	0	0;1	0.626
	Total	Basal	2	0;4	2	1;5	2	1;4	0.968
		6 meses	2	0;4	1	0;1	1	0;2	0.646
		12 meses	2	0;2	1	0;3	0	0;1	0.310
Osteofitos	MFTJ	Basal	13	6;19	13	10;20	11	6;16	0.804
		6 meses	11	5;18	15	14;22	10	8;14	0.088
		12 meses	11	5;19	15	14;22	9	6;12	0.045
	LFTJ	Basal	8	1;11	8	7;18	7	4;13	0.442
		6 meses	7	2;14	11	6;15	7	4;10	0.518
		12 meses	13	5;28	22	15;32	8	6;15	0.075
	PFJ	Basal	9	2;12	6	3;12	7	5;12	0.941
		6 meses	9	3;12	8	4;12	6	4;9	0.867
		12 meses	10	3;12	8	3;11	7	6;8	0.826
	Total	Basal	34	7;41	26	17;56	27	16;42	0.898
		6 meses	31	7;43	35	21;52	24	17;27	0.431
		12	34	12;61	45	36;65	26	18;30	0.065

		meses							
Compartimento total	MFTJ	Basal	34	15;43	42	30;60	20	13;26	0.120
		6 meses	28	13;40	38	25;51	19	11;29	0.102
		12 meses	22	9;43	42	30;60	15	9;30	0.022
	LFTJ	Basal	13	5;20	18	12;30	14	9;20	0.221
		6 meses	18	2;23	19	11;27	10	8;20	0.534
		12 meses	21	5;31	3	22;42	11	7;23	0.141
	PFJ	Basal	22	11;39	19	11;36	23	12;29	0.982
		6 meses	18	5;38	18	14;22	19	13;27	0.998
		12 meses	22	3;29	18	10;21	15	11;28	0.950
Menisco	MFTJ	Basal	2	0;3	3	2;6	2	1;3	0.278
		6 meses	0	0;3	2	1;6	2	1;3	0.410
		12 meses	1	0;3	4	1;5	2	0;4	0.194
	LFTJ	Basal	0	0;0	0	0;3	0	0;0	0.722
		6 meses	0	0;1	2	0;3	0	0;0	0.107
		12 meses	0	0;1	0	0;2	0	0;0	0.339
	Total	Basal	3	1;3	5	2;6	3	1;3	0.218
		6 meses	3	0;5	5	1;7	2	1;3	0.295
		12 meses	3	0;4	5	2;6	3	0;4	0.275
Ligamentos	Total	Basal	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.757
		6 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.757
		12 meses	0	0;0	0	0;0	0	0;0	0.757
Sinovitis	Total	Basal	1	1;2	1	1;2	1	1;1	0.989
		6 meses	1	1;2	2	1;2	1	1;1	0.415
		12 meses	2	1;2	2	1;2	1	1;2	0.115

**MFTJ: Compartimento Medial; LFTJ: Compartimento Lateral; PFTJ: Compartimento Patelofemoral

Anexo VI: Artículo Publicado