

Laura Barrachina Porcar

Medicina regenerativa aplicada al
tratamiento de patologías
articulares equinas: capacidad
inmunomoduladora in vitro e in
vivo de las células madre
mesenquimales de médula ósea
(BM-MSCs) en un modelo de
artritis inducida

Departamento

Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es

Rodellar Penella, Clementina
Vázquez Bringas, Francisco José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**MEDICINA REGENERATIVA APLICADA
AL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS
ARTICULARES EQUINAS: CAPACIDAD
INMUNOMODULADORA IN VITRO E IN
VIVO DE LAS CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA
(BM-MSCs) EN UN MODELO DE
ARTRITIS INDUCIDA**

Autor

Laura Barrachina Porcar

Director/es

Rodellar Penella, Clementina

Vázquez Bringas, Francisco José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2017

Tesis Doctoral

Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de patologías

articulares equinas:

capacidad inmunomoduladora in vitro e in vivo de las células madre
mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en un modelo de artritis
inducida.

Autor

Laura Barrachina Porcar

Director/es

Clementina Rodellar Penella
Francisco José Vázquez Bringas

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

2017



**Universidad
Zaragoza**

**MEDICINA REGENERATIVA APLICADA AL TRATAMIENTO
DE PATOLOGÍAS ARTICULARES EQUINAS:
CAPACIDAD INMUNOMODULADORA IN VITRO E IN VIVO DE
LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA
EN UN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA**

Tesis Doctoral

Laura Barrachina Porcar

Zaragoza, 2017





**Universidad
Zaragoza**

LABORATORIO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA (LAGENBIO)

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

Facultad de Veterinaria

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

**Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de patologías
articulares equinas:
capacidad inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* de las células
madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en un
modelo de artritis inducida.**

Memoria presentada por:

Laura Barrachina Porcar

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Director/es:

**Clementina Rodellar Penella
Francisco José Vázquez Bringas**

ZARAGOZA, 2017



**Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal
Universidad Zaragoza**



**Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza**

Doña Clementina Rodellar Penella, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, y Francisco José Vázquez Bringas, Profesor Asociado del Departamento de Patología Animal,

CERTIFICAN

La Tesis Doctoral titulada “Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de patologías articulares equinas: capacidad inmunomoduladora in vitro e in vivo de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en un modelo de artritis inducida” que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora Doña Laura Barrachina Porcar, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se corresponde con el Plan de Investigación aprobado el quince de mayo de 2015. La Memoria presentada cumple todos los requisitos por lo que los directores del trabajo autorizan su presentación para que su autora pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza en la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones y con la mención de “Doctor Internacional”.

Lo que suscribimos como directores del trabajo en Zaragoza a 20 de marzo de 2017.

Fdo. Clementina Rodellar Penella

Fdo. Francisco José Vázquez Bringas

Este trabajo ha sido financiado mediante una subvención destinada a la formación y contratación de personal investigador para la realización de una Tesis Doctoral concedida por el Gobierno de Aragón, y por los siguientes organismos y proyectos:

- *Terapia celular en el tratamiento de la artritis inducida en caballos: capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria "in vitro" e "in vivo" de las MSCs de médula ósea.* Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2011-28609). 2012 – 2015.
- *Grupo Consolidado de Investigación de Aragón.* Financiado por el Gobierno de Aragón (LAGENBIO-A-17). 2013 - 2016.

*A mis padres, Loli y Jose,
y a Adrián,
Porque sois el viento que
Siempre sopla en mi espalda,
Empujándome hacia delante.*

*“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas
otras montañas por escalar”*

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos de la tesis es un momento emocionante para mí, puesto que tengo la fortuna de contar con muchas personas a las que daros las gracias por acompañarme en este recorrido. Recuerdo lo que me dijo Paco cuando hablé por primera vez con él sobre hacer la tesis: “hacer la tesis es como empezar otra carrera”. Esa frase me ha venido muchas veces a la cabeza, no sólo en el sentido académico por todo lo que he aprendido estos años, sino también en el sentido literal de la palabra, y es que la tesis, para mí al menos, se parece bastante a una carrera. Hay fases más duras (como una cuesta arriba) y otras más agradecidas (como una ligera pendiente hacia abajo). Pero sobre todo, la tesis se parece a una carrera por toda la gente que te acompaña, corriendo contigo y animándote a lo largo del camino.

Me gustaría comenzar dando las gracias a mis dos directores, Clemen y Paco, gracias a los cuales he aprendido tanto. Clemen, hace cuatro años que fui a hablar contigo sobre la posibilidad de hacer la tesis sobre células madre en caballo. Aunque me entusiasmaba el tema, no sabía mucho sobre él. Aun así confiaste en mí y, cuatro años después, aquí estamos casi acabando. Gracias por tu confianza, por darme la oportunidad de aprender tantísimo, por tu apoyo en estos años y por haber estado al frente en esta carrera incluso cuando venían cuestas arriba. Paco, tú me animaste a coger este camino, a empezar esta carrera, y me has guiado en ella más allá del recorrido académico. Me has enseñado muchísimas cosas, ya desde antes de empezar la tesis, sobre caballos y sobre investigación, pero sobre todo te agradezco que me hayas enseñado a esforzarme y a tener dedicación por lo que hago. Gracias a los dos por darme la oportunidad de empezar la carrera investigadora y ayudarme a descubrir la pasión por ella, y gracias por guiarme codo con codo en este recorrido.

Mucha gente hace referencia en este apartado a su “otra” familia, la académica, de la que tenemos la suerte de empezar a formar parte en estos años de tesis y a la que siempre vamos a seguir perteneciendo. En este caso, yo soy doblemente afortunada, porque tengo dos familias académicas.

Tengo a mi familia del laboratorio, y no importa si algunos miembros siguen en el laboratorio o no, porque todos somos parte de la familia LAGENBIO. Gracias a Don Isaías Zarazaga, cuya pasión por la ciencia es todo un ejemplo a seguir. Gracias a Pilar Zaragoza, por brindarme la oportunidad de ser parte de este grupo y de iniciarme en algo tan bonito como es la investigación. Gracias Charo e Inma por vuestros consejos y por echarme siempre una mano con el doctorado (¡y la gran cantidad de papeles!). Ana Cris, Ana Solana, Arianne, Carmen, Janne, Laura M., Óscar, os agradezco enormemente vuestra disposición a ayudar en todo momento. Gracias por todo lo que me habéis enseñado desde que puse un pie en el laboratorio, y gracias por amenizar tantos ratos en la poyata. Ana, no puedo contar todas las horas que hemos pasado trabajando juntas, codo con codo en la campana o en la poyata, gracias por todo lo que me has enseñado y ayudado en estos años, dentro y fuera del laboratorio; Amaya y Bea, gracias por vuestros buenos consejos; David y Diego, gracias por ser capaces de poner siempre un toque de humor; Miriam, ¿qué haría sin nuestros ratitos “de vivo”?; Samanta y Sara, gracias por tantas y tan buenas conversaciones; a todos, muchas gracias por tan buenos momentos, trabajando y también desconectando. Gracias a mis amigos doctorandos, Ángel, Dani, Marta, que aunque en departamentos distintos también hemos coincidido en esta carrera. A todos, gracias infinitas por todas las horas en el laboratorio pero

AGRADECIMIENTOS

también fuera de él, por poner todos vuestro empeño en este camino que compartimos y ayudarme a recorrerlo. Un placer haber hecho este trayecto con todos vosotros.

Como decía antes, soy doblemente afortunada, porque también tengo a mi familia de caballos, a la que llegué hace más de siete años, con la que he pasado tan buenos momentos y en la que siempre he encontrado apoyo. Son muchísimas las cosas que hemos compartido, dentro y fuera del hospital, y todos los que habéis pasado en estos años habéis puesto vuestro granito de arena para que hoy esté a punto de cruzar la meta. Antonio, gracias por todo lo que me has enseñado dentro y fuera de la tesis, gracias por todas las horas que te has pasado conmigo “agachando el lomo”, y siempre encantado de ayudar. Arantza y Sara, siempre dispuestas a ayudarme en todo, enseñarme, escucharme, aconsejarme. Neka, gracias por ayudarme a iniciar este camino y por todo lo que me has enseñado. Gracias a Joaquín e Ysabel por prestar vuestra ayuda siempre que lo he necesitado. Mil gracias a todos los internos y residentes con los que en estos años hemos compartido grandes momentos domando fieras, haciendo rodeos y trotando bajo todas las condiciones climatológicas posibles (en especial a Kathe, por tantas “tardes de ponis”). Os agradezco vuestra ayuda de todo corazón a todos y cada uno de vosotros. Gracias a toda la familia “caballil” por tan buenos momentos (y más que vendrán) y por poder contar siempre con vosotros.

Durante la tesis he tenido además la oportunidad de conocer a investigadores de otras áreas y de poder colaborar con ellos. Gracias a Fermín Lampreave, María Ángeles Álava, Lourdes Soler y Natalia García, de la Facultad de Ciencias. Gracias a Jaime Gosálvez, Rosa Roy y Carmen López, de la Universidad Autónoma de Madrid. Gracias por toda la ayuda prestada, por vuestro entusiasmo y por la grata experiencia que siempre resulta de combinar esfuerzos.

Thank you to Dr. Lauren Schnabel and her wonderful research group, Alix Berglund, Jessica Gilbertie, Julie Long, Alex and Gavin. It was a huge pleasure to meet you all, thank you so much for the opportunity of visiting your lab and for the terrific time that I had with all of you during my stay at the NC State University.

Gracias a todos mis “Raleighnesians”, ha sido increíble conocerlos y compartir un tiempo tan bonito con vosotros, no me hubiera podido imaginar tener tanta suerte de encontrar a gente como vosotros.

Agradecer también a los servicios científico-técnicos del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, en especial al de Citometría, así como al Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, por los servicios prestados durante todo el desarrollo de este trabajo. Gracias además al Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza, por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos para el desarrollo de este trabajo, y a los propietarios que amablemente han cedido el uso de muestras de sus animales para llevar a cabo parte de esta investigación. Gracias a Nacho de Blas por resolverme tantas dudas “existencialestadísticas”. Gracias a todos los compañeros de otros departamentos, sobre todo Cirugía y Parasitarias, por echar una mano en tantos momentos.

Y llega el momento de hablar de mi familia, de darles las gracias no sólo por estos años sino por toda una vida de confianza y apoyo. Gracias a mis padres, Loli y Jose, por ser los mejores, por apoyarme en todos los pasos de mi vida y por darme alas para volar a cualquier

AGRADECIMIENTOS

parte. Gracias por vuestro apoyo sin límites, porque sin vosotros no sería la persona que soy hoy. Gracias por creer en mí desde que siendo una “renacuaja” dije que quería ser veterinaria de caballos. Sois un ejemplo a seguir de esfuerzo y bondad y para mí no hay mayor logro que el que os sintáis orgullosos de mí.

Gracias a mis abuelos, que aun sin entender muy bien “de que va eso de la tesis”, siempre me preguntáis por como la llevo, me dais vuestro cariño y me hacéis olvidarme de todo un rato escuchando embelesada vuestras “batallitas”. Gracias, abuelo Pepe, por ser el que me ha inculcado el amor por los animales y sobre todo por los caballos; sé que estos años me has estado acompañando desde arriba.

Gracias a toda mi familia y a mis amigos, por interesaros siempre por mí, escucharme y dejarme aburriros con la tesis. Gracias en especial a Ángela F., Ángela H., Alejandro, Juan, María y Mónica, por ser mis mejores amigos todos estos años y estar siempre conmigo en las duras y en las maduras, también en esta etapa de mi vida. No hace falta que os diga todo lo que sois para mí.

Adrián, me has apoyado en esta carrera hasta el infinito y más allá. Si estaba muy cansada de correr, si sentía que todo era demasiado cuesta arriba, tú siempre estabas ahí animándome a seguir hacia delante. Gracias por tu apoyo incondicional, por hacerme ver siempre el lado bueno de las cosas y por estar ahí día tras día. Cruzar la meta te lo debo en buena parte a ti.

Y aunque sea un poco sentimental, no quiero terminar sin darles las gracias a los animales; prometo seguir trabajando y esforzándome por vosotros.

Y si he empezado con la analogía de la carrera, me gustaría terminar de la misma forma. Ahora que la meta se ve ya muy próxima, si algo tengo claro es que el final de esta carrera es sólo el principio de la siguiente. Y si me preguntaran qué me gustaría llevarme para la nueva etapa, sin duda sería a todos vosotros como compañeros de trotes y andanzas. Gracias y mil veces gracias, a todos y a todas, de todo corazón.

La presente Tesis Doctoral está constituida por un compendio de trabajos de investigación previamente publicados e indexados en distintas revistas científicas de carácter internacional cuyo índice de impacto está incluido en el *Journal Citation Reports* (JCR). A continuación se indican las referencias completas de las cuatro publicaciones que forman parte de esta Tesis Doctoral por de compendio de publicaciones, de acuerdo a la normativa de esta modalidad:

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties.** *Veterinary immunology and immunopathology.* 171, pp. 57-65. 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.007

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments.** *Journal of veterinary science.* 18 (1), pp.39-49. 2017 DOI:10.4142/jvs.2017.18.1.1

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Gosálvez, Jaime; Roy, Rosa; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential.** *Stem cells and development.* 26 (1), pp. 15-24. 2017. DOI: 10.1089/scd.2016.0209

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Soler, Lourdes; García, Natalia; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Vitoria, Arantza; Álava, María Ángeles; Lampreave, Fermín; Rodellar, Clementina. **Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis.** *Veterinary immunology and immunopathology.* 182, pp. 74-78. 2016. ISSN 0165-2427 DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.10.005

Además de los cuatro artículos ya publicados que se requieren para presentar la Tesis Doctoral en modalidad de compendio de publicaciones, se ha incluido un quinto manuscrito que se encuentra en fase de preparación. Este manuscrito incluye el estudio *in vivo* llevado a cabo en la Tesis Doctoral. El análisis histopatológico de las muestras de cartílago y membrana sinovial derivadas de dicho estudio fue encargado a un servicio externo al no disponer el grupo de investigación de la capacidad para realizar esta tarea y no ha sido posible contar con estos resultados en el momento de presentar la Tesis Doctoral. Pese a que los autores consideran que el análisis histopatológico es un aspecto fundamental en este tipo de estudios, debido a la relevancia del resto de datos disponibles se ha incluido dicho manuscrito en la presente Tesis Doctoral, quedando pendiente la parte correspondiente a la histopatología. Tan pronto como estos datos estén disponibles, el citado manuscrito será enviado para su publicación en una revista del JCR bajo el título:

Proinflammatory priming of mesenchymal stem cells as strategy to improve their therapeutic potential: assessment of effectiveness and safety in an equine osteoarthritis model.

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vitoria, Arantza; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Roca, Mercedes; Zaragoza, Pilar; Vázquez, Francisco José; Rodellar, Clementina.

Así mismo, por su participación en los procesos de desarrollo y publicación, la doctoranda también figura como autora de otros dos trabajos realizados con anterioridad que no se incluyen como parte de la Tesis Doctoral pero que están directamente relacionados con tema central de la misma. La participación en estos trabajos, además de haber contribuido a la formación de la doctoranda en el campo de investigación de su Tesis, permitió la obtención de resultados que contribuyeron sustancialmente al consiguiente desarrollo de la investigación recogida en la presente Tesis Doctoral. Estos trabajos también están publicados e indexados en revistas incluidas en el JCR y las referencias completas de los mismos son las siguientes:

Remacha, Ana Rosa¹; Barrachina, Laura¹; Álvarez-Arguedas, Samuel; Ranera, Beatriz; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José.; Zaragoza, Pilar; Yáñez, Rosa; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs.** *Veterinary immunology and immunopathology.* 165 (3-4), pp. 107 - 118. 2015. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.04.004

(¹ These authors contributed equally to this work)

Ardanaz, Nekane; Vázquez, Francisco José; Romero, Antonio; Remacha, Ana Rosa; Barrachina, Laura; Sanz, Arianne; Ranera, Beatriz; Vitoria, Arantza; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints.** *BMC Veterinary research.* 12 (1), 2016. DOI: 10.1186/s12917-016-0692-x

ABREVIATURAS



A

ACS: suero autólogo condicionado

ADAMTS-4: Agrecanasa 1

ADAMTS-5: Agrecanasa 2

AINE: antiinflamatorios no esteroideo

ALP: fosfatasa alcalina

APC: alofocianina

AT-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

B

B2M: beta-2 microglobulina

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico

BM-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea

BMP: proteína morfogenética ósea

BP: bisfosfonato

C

CCL: ligando de quimiocina

CCR: quimiocina receptora

CD: clúster de diferenciación

CD: número de doblajes celulares

cDNA: DNA complementario

CFU-F: unidades formadoras de colonias con morfología fibroblástica

COMP: proteína oligomérica de matriz

COX: ciclo-oxigenasa

CPA: célula presentadora de antígeno

CPII: carboxipeptido del colágeno tipo II

CRF: factor de liberación de corticotropina

CRP: proteína C reactiva

CS: condroitín sulfato

CXCL: quimioquina CXC ligando

CXCR: quimioquina CXC receptor

D

DC: célula dendrítica

DJD: *degenerative joint disease*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMOAD: fármaco modificador de estructura para la osteoartritis

DMSO: dimetil sulfóxido

DT: tiempo de doblaje celular

E

ECM: matriz extracelular

EDA: enfermedad degenerativa articular

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento endotelial

ELA: antígeno leucocitario equino

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

F

FBS: suero fetal bovino

FC: frecuencia cardiaca

FDA: *Food and Drug Administration*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FR: frecuencia respiratoria

FSC vs SSC: *Forward Scatter (eje X) versus Side Scatter (eje Y)*

G

GAG: glicosaminoglicano

GAGS: glicosaminoglicano sulfatado

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

GvHD: enfermedad de injerto contra huésped

H

HA: ácido hialurónico

HGF: factor de crecimiento hepatocítico

HLA: antígeno leucocitario humano

HV-UZ: Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza

I

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IDO: indoleamina 2,3- dioxigenasa

IFD: interfalangiana distal

IFN γ : interferón gamma

IFP: interfalangiana proximal

Ig: inmunoglobulina

IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1

IL: interleuquina

IL-1Ra: antagonista del receptor de la interleuquina 1

IL-1 β : interleuquina 1 beta

iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible

iPSCs: células madre pluripotentes inducidas

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

IV: intravenoso

L

LIF: Factor Inhibidor de Leucemia

M

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos

MFI: *mean fluorescence intensity*

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MLR: reacción mixta de leucocitos

MMP: metaloproteinasa de matriz

MRI: imagen por resonancia magnética

mRNA: RNA mensajero

MSCs: células madre mesenquimales

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

N

Nf: número final de células

Ni: número inicial de células

NK: *natural killer*, células

NO: óxido nítrico

O

OA: osteoartritis

OARSI: Sociedad Internacional de Investigación en Osteoartritis

OC: osteocondrosis

OCD: osteocondritis disecante

ODFR: radicales libres derivados del oxígeno

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORVA: obstrucción recurrente de vías aéreas

P

PAAG: hidrogel de poliacrilamida

PBS: tampón fosfato salino

PDGF: factor de crecimiento plaquetario

PE: ficoeritrina

PFA: proteína de fase aguda

PG: proteoglicano

PGE2: prostaglandina E2

PIGF: factor de crecimiento placentario

Poly (I:C): ácido poliinosínico-policitidílico

PPAR γ : receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma

PRE: Pura Raza Español, caballo

PRP: plasma rico en plaquetas

PSGAG: gliocosaminoglicano polisulfatado

Q

QOSC: lesiones quísticas del hueso subcondral

R

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

RUNX2: factor de transcripción de diferenciación de los osteoblastos 2

S

SAA: amiloide sérico A

SCF: *stem cell factor*

SDF-1 (CXCL12): factor derivado del estroma 1

SDMOADs: fármacos modificadores de estructura de acción lenta

SLRPs: pequeños proteoglicanos ricos en leucina

SMOAD: fármaco modificador de los síntomas para la osteoartritis

T

T reg: T reguladoras, células

TCR: *T-cell receptor*

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th: T efectoras (*helper*), células

TIMP: inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz

TLR: *toll like receptor*

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TR: temperatura rectal

TSG-6: proteína inducida por TNF α 6

U

UCB-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de sangre del cordón umbilical

UCT-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical

V

VCAM-1 (CD106): molécula de adhesión celular vascular 1

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

ÍNDICE



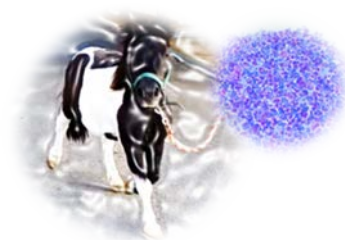
RESUMEN / SUMMARY	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. IMPORTANCIA DEL APARATO LOCOMOTOR DEL CABALLO Y SU RELEVANCIA COMO MODELO ANIMAL	9
2. LA ARTICULACIÓN	10
2.1. Estructura y función	10
2.2. Articulaciones sinoviales en el caballo	11
2.2.1. Cartílago articular.....	13
2.2.1.1. <i>Componente celular del cartílago articular</i>	14
2.2.1.2. <i>Principales componentes de la matriz extracelular del cartílago articular</i>	14
2.2.2. Hueso subcondral.....	15
2.2.3. Cápsula articular y líquido sinovial.....	16
2.2.4. Estructuras intra-articulares.....	17
2.3. La articulación radio-carpal	17
2.3.1. Recuerdo anatómico	17
2.3.2. Principales patologías.....	18
2.3.3. Diagnóstico	19
2.3.3.1. <i>Historia clínica y examen físico</i>	19
2.3.3.2. <i>Anestias diagnósticas</i>	19
2.3.3.3. <i>Examen radiológico</i>	20
2.3.3.4. <i>Resonancia magnética</i>	21
2.3.3.5. <i>Ecografía</i>	211
2.3.3.6. <i>Otras técnicas de imagen</i>	22
3. PRINCIPALES PATOLOGÍAS ARTICULARES EQUINAS	222
3.1. Alteraciones del desarrollo	222
3.1.1. Osteocondrosis y osteocondritis disecante	222
3.1.2. Lesiones quísticas del hueso subcondral	233
3.2. Artritis séptica	244
3.3. Artritis traumáticas y degenerativas	255
3.4. Otras patologías articulares	277
3.4.1. Artritis auto-inmune y artritis inmuno-mediada.....	277
3.4.2. Sinovitis reactiva y sinovitis eosinofílica	288
4. LA OSTEOARTRITIS O ENFERMEDAD DEGENERATIVA ARTICULAR	288
4.1. Definición	288
4.2. Fisiopatología de la osteoartritis.....	29

4.2.1. Mediadores proinflamatorios y catabólicos	300
4.2.2. Mediadores antiinflamatorios y anabólicos.....	322
4.2.3. Otros mediadores.....	333
4.3. Sintomatología y diagnóstico de la osteoartritis.....	344
4.3.1. Biomarcadores en osteoartritis.....	366
4.3.1.1. <i>Proteínas de fase aguda</i>	377
4.3. Tratamiento de la osteoartritis	377
4.3.1. Tratamientos médicos convencionales.....	38
4.3.2. Abordaje quirúrgico	411
4.3.3. Terapias físicas	422
4.3.4. Nuevas terapias en la osteoartritis equina	433
4.3.4.1. <i>Terapia génica</i>	433
4.3.4.2. <i>Productos ortobiológicos</i>	433
5. CÉLULAS MADRE	455
5.1. Células madre mesenquimales	477
5.1.1. Caracterización de las células madre mesenquimales.....	48
5.1.1.1. <i>Inmunofenotipo</i>	48
5.1.1.2. <i>Multipotencia</i>	490
5.1.2. Mecanismos de acción terapéuticos de las células madre mesenquimales.....	500
5.1.2.1. <i>Capacidad de migración, integración y diferenciación</i>	501
5.1.2.2. <i>Acción paracrina: secreción de mediadores</i>	512
5.1.2.2.1. Efectos tróficos.....	523
5.1.2.2.2. Efecto anti-fibrótico (anti-cicatricial)	533
5.1.2.2.3. Quimioatracción.....	533
6. PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.	533
6.1. Aspectos fundamentales de la respuesta inmune	544
6.1.1. El complejo mayor de histocompatibilidad.....	555
6.1.2. Células <i>natural killer</i>	555
6.1.3. Macrófagos.....	566
6.1.4. Células dendríticas	566
6.1.5. Células T	566
6.1.6. Células B	57
6.2. Mecanismos de contacto directo célula-célula en la inmunorregulación de las células madre mesenquimales.....	57

6.3. Mecanismos paracrinicos en la inmunorregulación de las células madre mesenquimales	58
6.3.1. Acción de las células madre mesenquimales sobre los distintos tipos celulares del sistema inmune	600
7. PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EQUINAS	622
8. ACTIVACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNORREGULADORA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	633
8.1. Estímulos activadores de las células madre mesenquimales.....	644
8.2. Posibles efectos no deseables derivados de la activación de las células madre mesenquimales	666
9. INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	667
9.1. Interés de la terapia celular alogénica	667
9.2. El concepto de inmuno-evasión	667
9.3. Mecanismos de inmuno-evasión de las células madre mesenquimales	69
9.3.1. Interacción de las células madre mesenquimales con la respuesta inmune celular	69
9.3.2. Interacción de las células madre mesenquimales con la respuesta inmune humoral	71
9.4. Propiedades inmunológicas de las células madre mesenquimales después de su diferenciación.....	71
10. USO TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PATOLOGÍAS ARTICULARES	73
10.1. Potencial de las células madre mesenquimales en el tratamiento de la osteoartritis	73
10.2. Uso de las células madre mesenquimales en patologías articulares equinas	74
10.3. Futuro en la investigación de las células madre mesenquimales como tratamiento para la osteoartritis	78
II. HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS	79
III. MATERIAL Y MÉTODOS	833
1. Animales	855
2. Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales equinas de médula ósea	86
3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real	87
4. Citometría de flujo.....	900
5. Ensayo de proliferación.....	900
6. Ensayos de diferenciación	911

6.1. Diferenciación osteogénica	911
6.2. Diferenciación adipogénica	911
6.3. Diferenciación condrogénica.....	911
7. Técnica de la dispersión de la cromatina.....	922
8. Inducción de lesión articular en los caballos	922
9. Valoración clínica de los animales en el ensayo <i>in vivo</i>	933
10. Recogida y análisis de muestras de líquido sinovial y sangre.....	933
11. Determinación de la proteína de fase aguda haptoglobina	944
12. Valoración ecográfica y radiológica de los animales en el estudio <i>in vivo</i>.....	944
13. Examen <i>post-mortem</i> por resonancia magnética	955
14. Valoración macroscópica del cartílago articular	96
15. Toma de muestras de cartílago y membrana sinovial	97
16. Análisis histopatológico	97
17. Herramientas bioinformáticas	99
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	1011
PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA.....	1033
MANUSCRITO I.....	10707
MANUSCRITO II.....	13737
MANUSCRITO III.....	15151
MANUSCRITO IV	17777
MANUSCRITO V	19191
DISCUSIÓN GENERAL.....	233
V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	237
VI. ANEXOS.....	24141
ANEXO 1: Renuncia de los coautores no doctores a la inclusión en otra tesis doctoral de los trabajos incluidos en la presente Tesis.	24343
ANEXO 2: Factor de impacto y áreas temáticas de las revistas en las que se encuentra publicado el trabajo realizado.....	24545
ANEXO 3: Aportaciones del doctorando.....	24949
ANEXO 4: Informe de aprobación de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza	25151
ANEXO 5: Índice de Tablas.....	25353
ANEXO 6: Índice de Figuras.....	25757
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26161

RESUMEN / SUMMARY



RESUMEN

Las patologías articulares como la osteoartritis (OA) suponen un considerable impacto económico y sobre la salud tanto en las personas como en los caballos. Su valor como paciente y como modelo animal ha hecho del caballo una especie de enorme interés para el estudio de terapias aplicadas a esta patología. No existe actualmente ningún tratamiento totalmente efectivo para la OA, lo que ha despertado el interés por la medicina regenerativa y, en concreto, por las células madre mesenquimales (MSCs), cuya aplicación está mostrando resultados prometedores. El poder terapéutico de las MSCs se atribuye principalmente a sus propiedades anti-inflamatorias e inmunorreguladoras, las cuales son estimuladas por la exposición a citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ y TNF α , sugiriendo que el desarrollo completo del potencial regulador de las MSCs requiere de activación. Sin embargo, la exposición a ambientes inflamatorios también puede conllevar efectos no deseables sobre las MSCs, como la disminución de su viabilidad y de su capacidad de diferenciación, o el aumento en la expresión de moléculas inmunogénicas, lo cual puede tener repercusiones en su uso alogénico. Las MSCs alogénicas son susceptibles de ser reconocidas por el sistema inmune del receptor, pero la baja expresión de MHC y sus propiedades inmunorreguladoras les confieren potencial para evitar ser detectadas. La inflamación influye sobre el equilibrio entre la expresión de factores inmunomoduladores e inmunogénicos, el cual es crucial para que las MSCs sean capaces de evadir al sistema inmune y puedan desempeñar sus efectos terapéuticos.

La presente Tesis Doctoral parte de la hipótesis de que aplicando un estímulo inflamatorio adecuado *in vitro* podría incrementarse el potencial terapéutico *in vivo* las MSCs equinas al aumentar sus propiedades inmunorreguladoras. Dado que este tipo de estimulación podría ir asociada a efectos no deseables, éstos también deben ser considerados. Por ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es estudiar el efecto *in vitro* de distintos estímulos inflamatorios sobre las MSCs equinas y analizar posteriormente *in vivo* la seguridad y eficacia de estas células, estimuladas y sin estimular, aplicadas en un modelo de OA equina. Al presentarse esta Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones, el trabajo desarrollado para alcanzar este objetivo se recoge en cuatro artículos indexados ya publicados en revistas incluidas en el *Journal Citation Reports*, y en un quinto manuscrito pendiente de publicación.

Puesto que el líquido sinovial de la articulación inflamada contiene moléculas inflamatorias, en primer lugar se estudió el efecto *in vitro* sobre las propiedades de las MSCs equinas del cultivo en presencia de líquido sinovial inflamatorio. Esta condición fue bien tolerada por las MSCs en términos de viabilidad y capacidad de diferenciación, pero fue insuficiente para inducir su perfil inmunorregulador. Además, dado que los niveles y tipos de moléculas presentes en el líquido sinovial son heterogéneos incluso dentro del mismo tipo de patología, se planteó la estimulación *in vitro* de las MSCs con dosis concretas de citoquinas pro-inflamatorias como potencial estrategia para aumentar su efecto terapéutico mediante la inducción de su perfil inmunorregulador. Con este fin, se testó la exposición a las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ (20ng/ml y 50ng/ml durante 72h), encontrando que estas condiciones eran capaces de inducir la expresión de moléculas relacionadas con los mecanismos inmunomoduladores de las MSCs. Sin embargo, estas condiciones también

indujeron la expresión de moléculas inmunogénicas y disminuyeron la viabilidad y el potencial de diferenciación de las MSCs.

En vista de los efectos no deseables asociados a estas condiciones, se pasó a estudiar el efecto de dosis más bajas y tiempos de estimulación más cortos con las mismas citoquinas, encontrando que la exposición a 5ng/ml de TNF α e IFN γ durante 12h era capaz de inducir el perfil inmunorregulador de las MSCs sin afectar a su viabilidad y plasticidad. Aunque estas condiciones indujeron la expresión de MHC-II y CD40, no afectaron a la expresión de MHC-I ni de otras moléculas coestimuladoras, por lo que se determinó que esta estimulación podría ser apropiada para aplicarla *in vivo* como estrategia terapéutica en un modelo equino de patología articular.

Debido al papel central de la inflamación en la OA y a los efectos beneficiosos de las MSCs atribuidos a sus propiedades antiinflamatorias y reguladoras, se planteó la necesidad de monitorizar adecuadamente la progresión de la inflamación articular durante el ensayo *in vivo*. Esto condujo al interés de estudiar la haptoglobina como marcador inflamatorio en esta patología. El aumento significativo y prolongado de la haptoglobina tanto en suero como en líquido sinovial en el modelo equino de OA utilizado en el ensayo *in vivo* sugirió su potencial para detectar y monitorizar la inflamación en patologías articulares equinas.

El estudio *in vivo* utilizando administraciones repetidas de un pool alogénico de MSCs, tanto estimuladas como sin estimular con las condiciones previamente definidas, mostró la utilidad potencial de la activación *ex vivo* de las MSCs equinas como estrategia terapéutica para patologías articulares. La respuesta inflamatoria ligera y transitoria observada en las 24 horas siguientes a la segunda administración de MSCs estimuladas sugiere que la activación de las MSCs podría aumentar su inmunogenicidad, por lo que este aspecto debe ser tenido en cuenta en su uso alogénico. La administración de MSCs, ya fueran estimuladas o no, mostró efectos beneficiosos en la articulación, los cuales fueron más evidentes a corto plazo. Aunque no se encontraron diferencias muy marcadas entre el uso de MSCs estimuladas o sin estimular, las MSCs estimuladas mostraron un mayor efecto antiinflamatorio y regulador, pese a la leve reacción observada tras su segunda administración.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran el potencial beneficio de la estimulación de las MSCs equinas con citoquinas proinflamatorias y contribuyen a comprender mejor el efecto de la inflamación sobre el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs y sus posibles implicaciones terapéuticas, cuya investigación es clave para avanzar hacia la consecución de terapias celulares alogénicas seguras y más eficaces.

SUMMARY

Joint pathologies such as osteoarthritis (OA) have great economic and health impact in both human and horses. In addition to its role as a patient, the horse is a valuable animal model for the study of OA therapies. Truly effective therapeutic options for this pathology are not currently available. This fact has led to the interest in the regenerative medicine, particularly in mesenchymal stem cells (MSCs), which investigation has provided promising results in the OA field. The therapeutic benefit of MSCs is mainly attributed to their anti-inflammatory and immune regulatory functions. These MSC properties are induced by proinflammatory cytokines such as IFN γ and TNF α , suggesting that the full MSC regulatory potential requires previous activation. However, the exposure of MSCs to inflammatory stimuli could also lead to deleterious effects on these cells, such as decreased viability and differentiation ability or increased expression of immunogenic markers, with possible implications for their allogeneic use. Allogeneic MSCs could be detected by the immune system of the receptor, but their recognition could be avoided because of their low MHC expression and immunomodulatory properties. Inflammation influences the balance between immunomodulatory and immunogenic factors, which is key in the potential ability of MSCs to evade the immune system and to elicit their therapeutic effects.

The initial hypothesis of this is Doctoral thesis is that the *in vitro* application of an appropriate inflammatory stimulus could increase the *in vivo* therapeutic potential of equine MSCs through the induction of their immune regulatory properties. The possible detrimental effects of the inflammatory exposure on other MSC properties must also be taken into account. Therefore, the aim of this Doctoral thesis is to study the *in vitro* effect of different inflammatory stimuli on equine MSCs and the subsequent *in vivo* assessment of the safety and effectivity of the stimulated and unstimulated cells in an equine OA model. As this Doctoral thesis is presented as a collection of publications, the research developed in order to reach the proposed objective is collected in four indexed articles published in journals included in the Journal Citations Reports, and in a fifth unpublished manuscript.

Since the synovial fluid in an inflamed joint contains inflammatory molecules, the effect of the *in vitro* exposure of equine MSCs to synovial fluid from naturally occurring articular inflammation was firstly investigated. This condition was well tolerated by equine MSCs in terms of viability and differentiation ability, but was insufficient to induce their immune regulatory profile. In addition, the inflammatory level of the synovial fluid could be heterogeneous even within the same pathology group. Therefore, it was proposed the *in vitro* stimulation of equine MSC with definite concentrations of proinflammatory cytokines as potential strategy to increase their therapeutic benefits through the induction of their immunomodulatory properties. For this purpose, TNF α and IFN γ were added to the culture medium (20ng/ml and 50ng/ml during 72h) and it was found that these conditions induced the expression of molecules related to the MSC immunomodulatory mechanisms. However, these conditions also induced the expression of immunogenic markers and negatively affected the viability and plasticity of equine MSCs.

In view of the deleterious effects associated to these conditions, the effect of lower cytokines concentration and shorter times of exposure was assessed and it was shown that the

stimulation of equine MSCs by 5ng/ml of TNF α and IFN γ for 12h increased their immune regulatory profile while not affecting their viability and differentiation ability. Even if this condition induced the expression of MHC-II and CD40, the expression of MHC-I and other costimulatory molecules was not affected. Consequently, it was determined that this stimulus could be suitable as an *in vivo* therapeutic strategy for being tested in an equine model of joint disease.

The central role of the inflammation in the OA and the beneficial effects of MSCs attributed to their anti-inflammatory and regulatory abilities made mandatory to properly monitor the joint inflammation during the *in vivo* assay. This led to the interest on the study of haptoglobin as inflammatory marker in this pathology. A significant and maintained haptoglobin increase was observed in both serum and synovial fluid in the equine OA model used in the *in vivo* investigation, suggesting the potential usefulness of this protein to detect and monitor the inflammation in equine joint pathologies.

The *in vivo* study using repeat administrations of allogeneic MSCs, unstimulated and stimulated with the previously defined conditions, showed the potential usefulness of the *ex vivo* activation of equine MSCs as a strategy for treating joint pathologies. The slight and transient inflammatory response observed within the 24h following the second injection of stimulated MSCs suggests a possible immunogenicity increase associated to the cells stimulation, so their allogeneic use needs further consideration. The administration of both stimulated and unstimulated MSCs provided beneficial effects in the joint, more remarkable at short-term. Even if great differences between the application of stimulated and unstimulated MSCs were not found, stimulated MSCs showed increased anti-inflammatory and regulatory effects despite the slight reaction observed after their second administration.

In conclusion, the results obtained in this Doctoral thesis show the potential benefit of stimulating equine MSCs with proinflammatory cytokines and contribute to the better knowledge of the effect of the inflammation on the MSC immunomodulation-immunogenicity balance and its possible therapeutic implications, which investigation is key in advancing towards the development of safe and effective allogeneic cell therapies.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1. IMPORTANCIA DEL APARATO LOCOMOTOR DEL CABALLO Y SU RELEVANCIA COMO MODELO ANIMAL

Se calcula que el caballo se domesticó unos 3.500 años antes de Cristo, utilizándose al principio sobre todo como fuente de alimentación, antes de comenzar a emplearse como animal de carga y como un valioso medio de transporte, y de jugar un papel crucial en incontables guerras. Este animal ha acompañado al hombre a lo largo de siglos de historia y actualmente, aunque el caballo y otros équidos siguen utilizándose en algunas regiones como medio de trabajo y transporte, su papel en los países desarrollados es principalmente deportivo y de ocio. Esto no significa que el inicio del uso deportivo del caballo sea reciente, ya que los juegos hípicas, o deportes ecuestres actuales, comenzaron desde tiempos muy tempranos en la historia del caballo domesticado. Buenos ejemplos de ello son las carreras de cuadrigas, las cacerías reales, o el torneo de justas de la Europa medieval. Sin embargo, el cambio hacia el uso generalizado del caballo con fines deportivos como principal actividad tuvo lugar en los tiempos modernos.

Muchas de las disciplinas hípicas actuales provienen de las tareas que anteriormente desempeñaban estos animales, como el manejo de ganado. Otras, sin embargo, son disciplinas más sofisticadas como el salto, las carreras o la doma clásica, dirigidas a mostrar diversas aptitudes del caballo (Dunlop and Williams, 1996; Deraga, 2007). Algunas de estas disciplinas conforman una fuerte industria que mueve importantes cantidades de dinero. Como ejemplo, en España la industria equina generó unos 5.300 millones de euros en 2012, lo que representa el 0,51% del PIB español (R.F.H.E, 2013).

Independientemente de cual sea la disciplina a la que se dedica el caballo, el buen funcionamiento de su aparato locomotor es imprescindible para el desempeño de la misma. Los caballos, al igual que los deportistas, sufren frecuentemente lesiones músculo-esqueléticas derivadas del sobreesfuerzo de estructuras como tendones, ligamentos o articulaciones. Estas patologías suponen más del 80% de las causas de pérdida de rendimiento del animal e incluso en ocasiones conllevan su completa retirada de la actividad deportiva, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas para la industria equina (Halper et al., 2006). Como problema añadido, todas estas estructuras se recuperan muy lentamente y el tejido reparado no posee las mismas características biomecánicas que el original (Dahlgren, 2007), conllevando una tasa de recaída de aproximadamente el 80% (Halper et al., 2006).

Se estima que la osteoartritis (OA) es la responsable del 60% de las cojeras en el caballo. En un estudio de 2010 realizado en EE. UU., se calculaba que los costes por un caballo que padeciera OA podían ir desde \$3,000 hasta \$15,000 por año, lo que se traduce en millones de dólares en pérdidas, sólo en EE. UU. y sólo debido a la OA (Oke, 2009). Todo esto nos sitúa ante un problema importante tanto en términos económicos como de bienestar animal.

De todo lo expuesto se deduce que la búsqueda de terapias para tratar los problemas músculo-esqueléticos del caballo es un área de investigación de gran importancia. Pero además de su interés como paciente, el caballo tiene una gran relevancia como modelo animal traslacional para la futura aplicación de terapias a patologías locomotoras en pacientes humanos. Muestra de ello es que la Food and Drug Administration (FDA) lo considera como el modelo animal más apropiado para estudiar terapias celulares en patologías músculo-

esqueléticas con posterior aplicación a la especie humana (Anónimo, 2005). Si la prevalencia de OA es alta en el caballo no lo es menos en la especie humana, calculándose que la padecen 151 millones de personas en todo el mundo (Anónimo, 2010). Esto aporta un enorme interés adicional a la investigación de tratamientos para patologías articulares en la especie equina. El caballo se ha establecido como modelo animal tanto para lesiones tendinosas y ligamentosas (Cadby et al., 2013), como para lesiones focales de cartílago y OA (Poole et al., 2010; Colbath et al., 2017b) al presentar varias ventajas respecto a otras especies. Para empezar, el espesor y la composición del cartílago equino guardan una estrecha similitud con las características del cartílago articular humano (Poole et al., 2010). Por otra parte, su gran tamaño facilita la exploración y la toma de muestras, permitiendo además que éstas sean de un tamaño o volumen considerables, imposibles de obtener en especies más pequeñas. Como ventaja adicional sobre otras especies de gran tamaño, como podrían ser la oveja o la cabra, el manejo del caballo permite seguir de forma sencilla protocolos de rehabilitación y entrenamiento posteriores a la terapia, resultando en unas condiciones más similares a las pautas que se utilizan con los pacientes humanos. Todas estas características conforman al caballo como un modelo animal muy apropiado para el estudio de terapias celulares aplicadas a problemas articulares (McIlwraith et al., 2012; Colbath et al., 2017b).

2. LA ARTICULACIÓN

2.1. Estructura y función

De forma general para todas las especies de mamíferos, las articulaciones son las estructuras del aparato músculo-esquelético que permiten la movilidad de un componente óseo respecto a otro, conformando así, junto con otros elementos, la locomoción del individuo. Para cumplir con su función, las articulaciones necesitan tener una resistencia comparable a la de los huesos para soportar las fuerzas producidas por el movimiento, a la vez que suficiente elasticidad para absorber choques y permitir el deslizamiento sin fricción de los extremos óseos. Todas estas condiciones, contradictorias entre ellas, tienen que confluir en una única estructura que es la articulación, resultando en una alta complejidad de la misma. Como contrapartida a esta complejidad, estas estructuras están dotadas con una capacidad de reparación muy baja.

Es importante mantener siempre una visión global de la articulación, como si se tratara de un órgano *per se* cómo el hígado o el riñón, puesto que todos sus componentes interactúan estrechamente para cumplir con una función común y la afección de uno de ellos puede influir en la función fisiológica del resto, dando lugar a una articulación patológica.

Las articulaciones pueden clasificarse siguiendo distintos criterios. Una clasificación general puede realizarse atendiendo a sus características estructurales, es decir, según el tipo de tejido que conforme la conexión entre los huesos que van a articular, o bien según el grado de movilidad permitido. En la Tabla 1 se encuentran resumidas las características principales de los diferentes tipos de articulación atendiendo a estos criterios y ejemplificados en el caballo (Liebich and König, 2005b).

TIPO DE ARTICULACIÓN	CONEXIÓN	GRADO MOVILIDAD	EJEMPLOS EN EL CABALLO
<i>Fibrosa</i>	Tejido conectivo denso	Generalmente sinartrosis (grado de movilidad muy bajo)	Suturas que conectan los huesos del cráneo
		Algunas anfiartrosis (movilidad reducida)	Articulaciones intervertebrales (excepto C1-C2)
<i>Cartilaginosa</i>	Cartílago	Generalmente anfiartrosis	Sínfisis huesos púbicos
<i>Sinovial</i>	No conexión estructural entre extremos óseos: cavidad sinovial	Siempre diartrosis (amplio grado de movilidad)	Articulaciones del esqueleto apendicular (coxo-femoral, húmero-radial, radio-carpal, interfalángicas, etc.)

Tabla 1.- Tipos de articulaciones según sus características estructurales (tipo de conexión entre extremos óseos) y el grado de movilidad permitido con ejemplos en el caballo.

En el caso del caballo, todas las articulaciones de su esqueleto apendicular son de tipo sinovial y son las que van a producir más patologías locomotoras, (Caron, 2011; Liebich and König, 2005b; Van Weeren, 2016a), por lo que serán las que describamos más detenidamente.

2.2. Articulaciones sinoviales en el caballo

Estas articulaciones en el caballo son siempre de tipo diartrosis, permitiendo un mayor grado de movilidad necesario para la locomoción. Dentro de las articulaciones de tipo diartrosis pueden diferenciarse varios tipos según las superficies articulares que las conformen, las estructuras periarticulares que les den sujeción y los tipos de movimiento que permitan. Las características y movilidad permitida de cada articulación van a influir en la forma en que se presenten y desarrollen ciertas patologías, como la OA (Kawcak, 2016). En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características de cada tipo de articulación sinovial (Liebich and König, 2005b):

GÉNERO	SUPERFICIES ARTICULARES	MEDIO DE UNIÓN PRINCIPAL	MOVIMIENTOS	EJEMPLO EN EL CABALLO
<i>Enartrosis</i>	Cabeza - cavidad	Cápsula fibrosa	Todos	Coxo-femoral
<i>Condíleas</i>	Cóndilo - cavidad glenoidea	Ligamentos peri-articulares	Todos menos rotación	Húmero-radial
<i>Silla de montar</i>	Cóncava - convexa	Cápsula fibrosa	Todos menos rotación	Interfalangiana proximal
<i>Troclear o gínglimo</i>	Tróclea-cresta	Ligamentos peri-articulares	Flexión y extensión	Tibio-tarsal
<i>Trocoide</i>	Cilindro óseo que da vueltas sobre un eje	Ligamento transverso	Rotación	Atlanto-axial (C1-C2)
<i>Artrodia</i>	Caras planas o casi planas	Ligamentos peri-articulares	Deslizamiento	Campo-metacarpiana

Tabla 2.- Tipos de articulaciones sinoviales en el caballo según las características de las superficies articulares, el tipo principal de medio de unión, los tipos de movimientos permitidos y ejemplos en esta especie

La composición básica de este tipo de articulaciones son elementos óseos recubiertos por una capa de cartílago hialino, bajo la cual se encuentra el hueso subcondral, líquido sinovial bañando las superficies articulares, y una estructura que lo contiene. Esta estructura suele ser la cápsula articular, pero en algunas ocasiones este papel lo desempeñan las estructuras ligamentosas y tendinosas que rodean a la articulación. También pueden encontrarse estructuras adicionales, como los ligamentos colaterales o los peri- o intra-articulares, encargados de dar estabilidad a la articulación, o estructuras como los meniscos, presentes sólo en algunas articulaciones del caballo, como la femoro-tibial y la temporomandibular, cuya finalidad es que la carga se distribuya más uniformemente en las superficies articulares evitando así que ciertas zonas sufran una presión excesiva (Liebich and König, 2005b; Van Weeren, 2016a). En la Figura 1 quedan representados los principales componentes de una articulación sinovial.

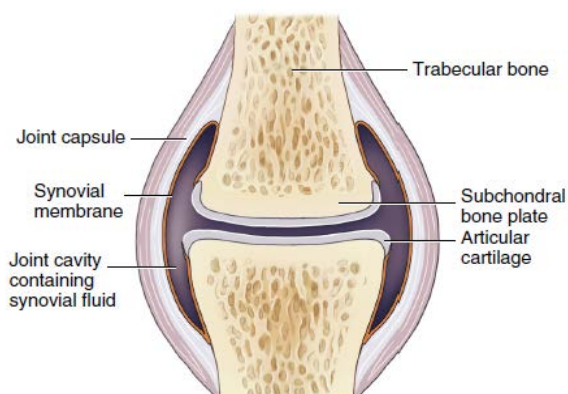


Figura 1: Representación esquemática de una articulación sinovial mostrando sus principales estructuras: los extremos óseos, el cartílago articular, hueso subcondral subyacente, la cápsula articular y la membrana sinovial. Tomado de Van Weeren (2016a)

A continuación, veremos con más detalle los principales elementos de las articulaciones sinoviales:

2.2.1. Cartílago articular

El cartílago articular de los animales adultos es un tejido avascular no innervado que, al igual que otros tejidos conectivos, consta esencialmente de células y matriz extracelular (ECM). La ECM es el componente mayoritario del cartílago y sus elementos principales son agua (70% - 80%), colágeno y proteoglicanos (PGs). Del peso seco del cartílago, aproximadamente el 50% corresponde al colágeno y el 35% a los PGs. El resto del peso seco lo conforman otros componentes como diversas glicoproteínas, minerales, y diversos componentes minoritarios. El componente celular del tejido cartilaginoso es relativamente pequeño, conformando del 1% al 12% del volumen del tejido, dependiendo de la zona de cartílago (McIlwraith, 2011; Van Weeren, 2016a).

Pese a que su apariencia macroscópica es homogénea, en el cartílago existen grandes diferencias estructurales y de composición desde su superficie hasta su zona más profunda. Pueden diferenciarse cuatro capas, aunque la transición entre ellas es gradual, excepto para la última capa, cuyo límite está bien definido. La zona superficial consta principalmente de colágeno tipo II en forma de fibras densamente agrupadas, con un contenido en PGs relativamente bajo mientras que el de agua es bastante alto. Los condrocitos en esta capa tienen morfología aplanada. En la zona intermedia o de transición, los condrocitos tienen una morfología más redondeada y en la ECM hay más abundancia de PGs y menor de colágeno y agua. La ECM a nivel de la zona profunda tiene el menor contenido en agua y colágeno y la mayor concentración de PGs, con condrocitos dispuestos formando columnas. Finalmente, la zona calcificada constituye la interfaz entre las tres capas anteriores (que conforman la parte hialina del cartílago) y el hueso subcondral. Esta zona de transición se conoce como *tidemark* y en algunas zonas profundiza en la zona calcificada hasta alcanzar el hueso subcondral, lo que supone que en ciertas áreas existe un contacto directo entre el cartílago hialino y el hueso subcondral (Caron, 2011; Van Weeren, 2016a) (Figura 2).

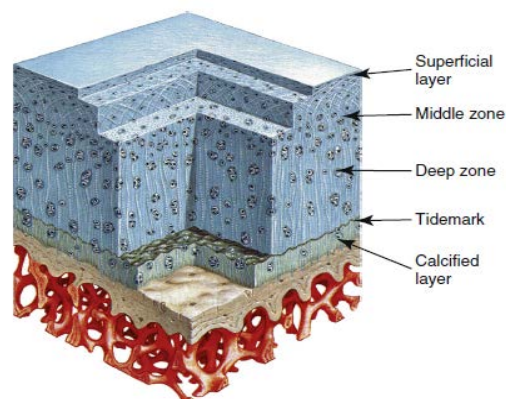


Figura 2: Representación de la estructura en capas del cartílago articular, mostrando la capa superficial, la zona media y la zona profunda, con la *tidemark* separando la parte hialina del cartílago de la capa calcificada del mismo, que se encuentra inmediatamente por encima del hueso subcondral. Tomado de Van Weeren (2016a)

2.2.1.1. Componente celular del cartílago articular

Durante mucho tiempo, se consideró que en el cartílago articular maduro el único tipo celular existente era el condrocito. Sin embargo, se ha demostrado en varias especies, incluida el caballo, que al igual que en muchos otros tejidos también existe una población de células progenitoras, aunque su número es pequeño (McCarthy et al., 2012).

Pese a la baja presencia de los condrocitos, su papel es imprescindible ya que son los encargados de sintetizar los componentes de la ECM del cartílago. Los condrocitos se encuentran bastante separados entre ellos y cada uno está rodeado totalmente por ECM. Al conjunto formado por un condrocito y la porción de ECM que le rodea se le conoce como condron o condrona, y constituye la unidad estructural, funcional y metabólica del cartílago hialino (Van Weeren, 2016a).

2.2.1.2. Principales componentes de la matriz extracelular del cartílago articular

Como ya se ha mencionado anteriormente, el colágeno es la molécula más abundante en la ECM del cartílago articular, siendo el colágeno tipo II el predominante. Éste forma uniones entre varias moléculas para dar lugar a grandes filamentos de crucial importancia para las propiedades mecánicas del cartílago. También pueden encontrarse muchos otros tipos de colágeno, aunque no se conoce exactamente el papel de todos ellos. Por ejemplo, los colágenos tipo IX, XI y X son especialmente abundantes en animales jóvenes, donde actúan como co-polímeros del colágeno tipo II o regulando la mineralización de la ECM. El colágeno tipo III también funciona como co-polímero y podría tener un papel en la respuesta al daño del cartílago articular (Eyre and Wu, 1995; Van Weeren, 2016a).

Los PGs constituyen el otro componente principal del peso seco de la ECM. Constan de una proteína central con varias cadenas de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS) unidas a los lados. Existe una gran variedad de PGs dependiendo de las características de la proteína central y de los GAGS. El PG más abundante en el cartílago articular, y por tanto el más estudiado, es el agregcano, caracterizado porque sus cadenas de GAGS son mayoritariamente del tipo condroitín sulfato (CS) (Paulsson et al., 1987; Van Weeren, 2016a). La longitud de la proteína central y de los GAGS del agregcano tiende a disminuir a lo largo de la vida, viéndose afectadas las propiedades mecánicas del cartílago en individuos de edad avanzada (Lee et al., 2013). También están presentes en la ECM del cartílago otros PGs de tipo minoritario, como los de la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs) (Schaefer and Iozzo, 2008).

El agregcano se une al ácido hialurónico (HA) dando lugar a una conformación similar a la de las cadenas de GAGS unidas a la proteína central del PG, pudiendo unirse más de 100 monómeros de agregcano a lo largo de una molécula central de HA para formar agregados de PG-HA que se intercalan con las fibras de colágeno de la ECM (Heinegard, 2009) (Figura 3). El HA es también un GAG, pero de tipo no sulfatado, y además de ser uno de los principales componentes de la ECM del cartílago articular, también se encuentra de forma abundante en el líquido sinovial que baña la articulación (Van Weeren, 2016a).

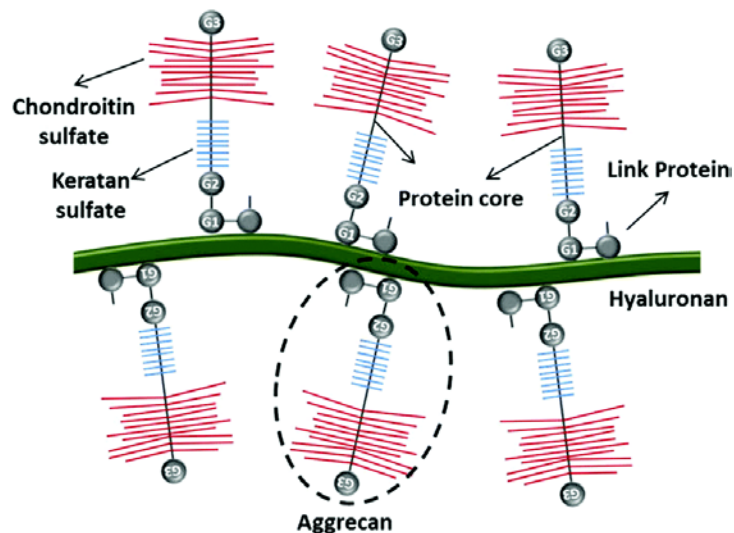


Figura 3: Representación esquemática del complejo proteoglicano-ácido hialurónico. El proteoglicano representado es el agregano, formado por una proteína central a la que se unen distintos tipos de glicosaminoglicanos sulfatados, principalmente de tipo condroitín sulfato. La proteína central del agregano se une a la molécula de ácido hialurónico para formar complejos. Tomado de Camarero-Espinosa et al., (2016)

Además de estos componentes principales, la ECM contiene numerosos componentes en menor proporción pero igualmente importantes. Ejemplo de ello son las matrilinas, que junto a los SLRPs mencionados anteriormente dan coherencia estructural a la ECM, o la proteína oligomérica de matriz (COMP), encargada de agrupar varias moléculas de colágeno para facilitar el ensamblaje de la matriz (Caron, 2011; Van Weeren, 2016a).

2.2.2. Hueso subcondral

El hueso subcondral consiste en una capa delgada de hueso compacto directamente adyacente a la zona calcificada del cartílago, situándose entre el cartílago articular y el hueso trabecular. Mecánicamente, la conformación del hueso subcondral proporciona un soporte firme para el cartílago y aporta cierta rigidez al conjunto de la estructura articular.

El hueso se adapta a las cargas mecánicas a las que es sometido mediante un proceso de remodelación, lo que se traduce en un mayor grosor o densidad del mismo en aquellas zonas que más carga soportan, respondiendo así a las diferentes fuerzas ejercidas sobre distintas áreas de una misma superficie articular. Distintos factores pueden influir sobre este patrón de carga, como por ejemplo el ejercicio (Kawcak et al., 2000). Pese a la relativa rigidez del hueso subcondral, éste es mucho más deformable que el hueso cortical y juega un importante papel biomecánico en la atenuación de las fuerzas generadas por la locomoción y la actividad atlética. Por ello, cambios en la rigidez de esta estructura tendrán repercusiones en la carga mecánica que debe soportar el cartílago articular, lo que ha conducido a la teoría de que la esclerosis del hueso subcondral puede ser un factor iniciador de la OA, más que un efecto secundario de esta patología. Aunque se sigue considerando al cartílago articular como el tejido de origen de la OA, el proceso degenerativo y reactivo en éste y en el hueso

subcondral están estrechamente relacionados e influyen uno en el otro desde las etapas más tempranas de esta patología (Burr, 1998; Buckwalter and Brown, 2004).

Al contrario que el cartílago, el hueso subcondral tiene una vascularización e inervación muy ricas, lo que permite una respuesta completa de este tejido a los estímulos tanto fisiológicos como patológicos (esclerosis, formación de osteofitos, etc.). La inervación del hueso subcondral es uno de los principales responsables de la percepción del dolor durante la patología articular, junto con los nociceptores presentes en la cápsula articular y en los ligamentos intra y extra articulares (Van Weeren, 2016a).

2.2.3. Cápsula articular y líquido sinovial

La cápsula articular de la mayoría de las articulaciones consta de dos capas: la parte externa es una capa fibrosa relativamente rígida y su función principal es dar estabilidad a la articulación, además de participar en la propiocepción de la misma. A la capa interna de la cápsula articular se la conoce como membrana sinovial y consta a su vez de otras dos capas: la íntima, en contacto directo con el interior de la cavidad sinovial, y la subíntima, situada entre la íntima y la capa fibrosa. La capa subíntima está ricamente vascularizada e inervada mientras que la capa íntima es muy delgada y no posee membrana basal. Esta disposición facilita el paso de componentes del plasma desde la sangre a la cavidad sinovial. De hecho, el líquido sinovial a menudo se describe como un ultrafiltrado de plasma sanguíneo. Esto no significa que el líquido sinovial se produzca de forma pasiva, puesto que las células que constituyen la membrana íntima, llamadas sinoviocitos, poseen una gran actividad excretora. Los sinoviocitos pueden dividirse en tres categorías principales: los sinoviocitos tipo A son macrófagos con función fagocítica, mientras que los tipo B son células fibroblásticas encargadas de producir proteínas y otras moléculas, como HA o GAGS, y secretarlas al líquido sinovial proporcionándole gran viscosidad. Los sinoviocitos tipo C constituyen una transición entre los tipo A y los tipo B, los cuales son en realidad muy similares y pueden transformarse de un tipo a otro. Todos los tipos de sinoviocitos producen una gran variedad de citoquinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, indispensables para el mantenimiento de la homeostasis de la articulación, por lo que la inflamación de membrana sinovial (sinovitis) tendrá un papel central en la patología articular (Van Weeren, 2016a).

El líquido sinovial se caracteriza por su color amarillento claro y, sobre todo, por la alta viscosidad que le confiere el abundante HA que contiene. El componente celular del líquido sinovial normal es muy bajo, normalmente no sobrepasa las 500 células/ μ l, y consiste principalmente en linfocitos y otras células mononucleares, mayoritariamente monocitos y macrófagos, con menos de un 10% de neutrófilos (Mahaffey, 2002). La principal función del líquido sinovial, además de lubricar la articulación y disminuir la fricción entre los extremos óseos, es la nutrición del cartílago articular, al ser éste una estructura avascular en los animales adultos. El rápido y relativamente ilimitado intercambio de componentes entre la sangre y el líquido sinovial permite un eficiente aporte de nutrientes y retirada de productos de deshecho (Caron, 2011; Van Weeren, 2016a).

2.2.4. Estructuras intra-articulares

Algunas articulaciones cuentan con estructuras intra-articulares adicionales como ligamentos o meniscos, con el objetivo de proporcionar estabilidad mecánica extra o bien de mejorar la geometría articular cuando la superficie articular ha de soportar una carga mayor, evitando presiones excesivas en ciertas áreas. Una lesión en las estructuras intra-articulares puede tener importantes consecuencias para la estabilidad de la articulación y resultar en una patología articular severa. Estas estructuras además están inervadas, por lo que pueden ocasionar dolor sustancial cuando se dañan. A parte de su importante función mecánica, no parece que estas estructuras desempeñen un papel importante en la homeostasis de la articulación, ni en situación fisiológica ni patológica (Caron, 2011; Van Weeren, 2016a).

2.3. La articulación radio-carpal

Puesto que la radio-carpal es la articulación de elección para el estudio *in vivo* realizado en la presente Tesis Doctoral, se revisarán a continuación los principales aspectos relacionados con la misma.

2.3.1. Recuerdo anatómico

El carpo del caballo, también conocido como rodilla en esta especie, no es una única articulación sino que consta de tres articulaciones formadas por las dos filas de huesos carpales, el extremo distal del radio y el extremo proximal de los huesos metacarpianos. La articulación más distal es la articulación carpo-metacarpiana, formada por la fila distal de huesos del carpo y el extremo proximal de los huesos metacarpianos. Siguiendo en orden proximal, se encuentra la articulación inter-carpiana, formada por ambas filas de huesos carpales. Finalmente, la articulación más proximal del carpo es la radio-carpal o antebraquio-carpal, formada por la fila proximal de huesos carpales y el extremo distal del radio. En el caballo, el cúbito no participa en esta articulación dado que se fusiona con el radio. La articulación radio-carpal se considera aislada de las otras articulaciones, mientras que las articulaciones intercarpiana y carpo-metacarpiana siempre comunican. Las articulaciones radio-carpal e intercarpiana se consideran de tipo troclear o gínglimo, aunque no son los ejemplos típicos, y son en las que se origina el movimiento por su amplio grado de movilidad. Sin embargo, la articulación carpo-metacarpiana es de tipo artrodia y no permite el movimiento de flexión, pero está sujeta a fuerzas de cizalla. Los huesos carpales de cada fila también forman entre ellos articulaciones de tipo artrodia (Figura 4).

En la articulación radio-carpal, la fila proximal está formada por cuatro huesos carpales, siendo de medial a lateral: el carpo-radial (escafoides), el intermedio (semilunar) y el carpo-cubital (piramidal), encontrándose además de forma caudal al carpo-cubital el hueso accesorio (pisiforme). El hueso accesorio articula con la porción distal del radio por su parte proximal y con el hueso carpo-cubital por su aspecto dorsal, y conforma el borde lateral del canal carpiano por el que discurren los tendones flexores digitales. Los huesos carpales están sujetos entre ellos por fuertes ligamentos intercarpales que juegan un papel fundamental en la estabilidad del carpo, como el ligamento carpal palmar o los ligamentos intercarpales dorsomedial, palmar lateral y palmar medial. La cápsula articular también contribuye de forma

importante al soporte de esta estructura. Esta cápsula es densa en su parte dorsal, donde se entremezcla con el retináculo de los tendones extensores. Los tendones extensores carpo radial, digital común y digital lateral discurren respectivamente de forma dorsal, dorso-lateral y lateral al carpo. La cara dorsal del extremo distal del radio presenta unos surcos profundos por los que se deslizan los tendones extensores carpo radial y digital común. En la articulación radio-carpal pueden palparse en flexión dos depresiones, una dorso-lateral y otra dorso-medial, correspondientes a evaginaciones sinoviales por las que puede realizarse el abordaje a las mismas (Liebich and König, 2005a; Ross, 2011).

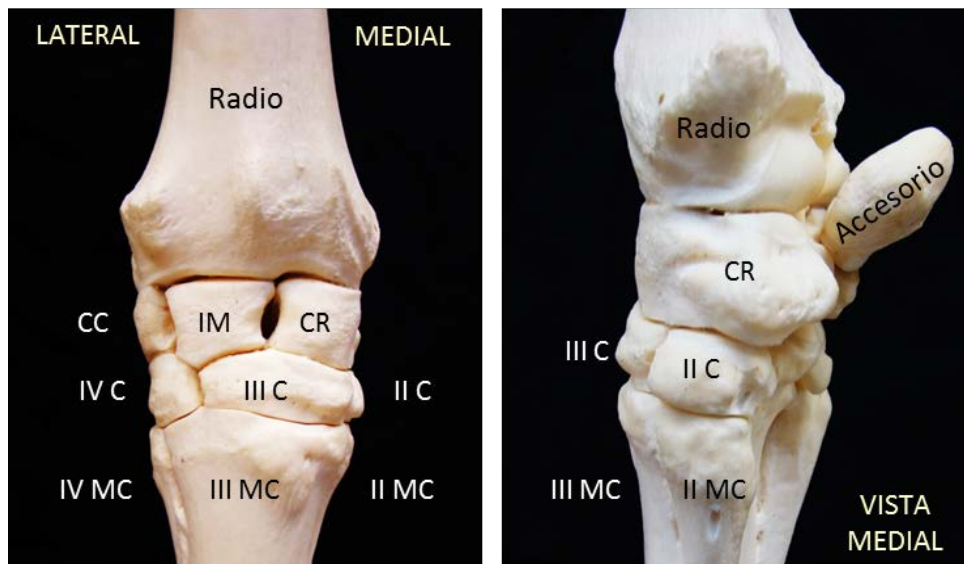


Figura 4: Componentes óseos del carpo equino en vista frontal y medial (carpo derecho). La fila proximal del carpo está formada por los huesos carpales carpo cubital (CC), intermedio (IM), carpo radial (CR) y accesorio. La fila distal del carpo la conforman los huesos carpales segundo (II C), tercero (III C) y cuarto (IV C). El extremo distal del radio, las dos filas de huesos carpales y los extremos proximales de los metacarpianos (MC II, III y IV) conforman las distintas articulaciones del carpo. Imágenes para el montaje tomadas de <http://www.onlineveterinaryanatomy.net>

2.3.2. Principales patologías

La patología más común a nivel de carpo es la OA, que en ocasiones es difícil de diferenciar de una fragmentación osteocondral puesto que ambas patologías están estrechamente interrelacionadas: el estrés repetido que sufren los huesos carpales produce esclerosis del hueso subcondral, por lo que el cartílago que lo recubre se encuentra con un soporte demasiado rígido y también se lesiona, comenzando así el proceso de la OA y pudiendo fragmentarse el área afectada y generarse un fragmento osteocondral. La fragmentación osteocondral no debe confundirse con la osteocondrosis (OC), que es rara en la articulación radio-carpal. También pueden hallarse fragmentos osteocondrales en esta articulación sin que medie este proceso, sino a consecuencia de un traumatismo único y agudo. Otras patologías a tener a cuenta son, como en otras articulaciones, la artritis séptica, las fracturas articulares o la afección de tejidos blandos. La afección de los ligamentos intercarpales o una alteración de los tendones adyacentes, como una tenosinovitis, pueden repercutir en la articulación radio-carpal.

2.3.3. Diagnóstico

2.3.3.1. Historia clínica y examen físico

La cojera de origen carpal es un hallazgo posible en muchos caballos de deporte, pero es especialmente frecuente en los dedicados a carreras (Peloso et al., 1994). Un caballo con patología de la articulación radio-carpal puede presentar diferente grado de cojera, efusión sinovial, inflamación de tejidos blandos periarticulares o flexión del carpo cuando está en estación. Cuando se aprecia una inflamación severa del carpo o se conoce una historia previa de trauma en esta región, el diagnóstico de la cojera es sencillo de orientar (Figura 5.A). En otras ocasiones, no hay una evidencia clara de que el problema esté a este nivel pero existen varios signos sugestivos, como fallo al cambiar de mano, rehusar el salto, tropezar (especialmente en los ponis) o bajada de rendimiento deportivo en general. Un aumento de la temperatura local en la superficie dorsal del carpo es un indicador bastante fiable de la presencia de un problema en esta región. La efusión sinovial es también considerablemente indicativa, pero puede haber lesión sin que haya efusión. El grado de flexión está normalmente disminuido en los caballos con OA crónica por la fibrosis de la cápsula articular, que puede notarse engrosada y fibrosa a la palpación. En caso de fracturas articulares, la flexión estática puede ser muy dolorosa. La flexión carpal se considera el test de flexión más específico (Figura 5.B) y cuando es positivo el origen de la cojera se localizará con muy alta probabilidad en la región carpal, aunque no necesariamente en las articulaciones puesto que también deben considerarse el resto de estructuras en esta área. Sin embargo, una respuesta negativa no permite excluir al carpo como estructura lesionada (Ross, 2011; Kawcak and Barrett, 2016).

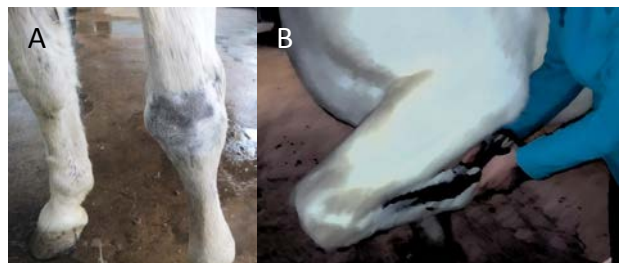


Figura 5: Distensión sinovial evidente del carpo (A) y test de flexión del carpo (B) en pacientes del HV-UZ.

2.3.3.2. Anestésias diagnósticas

Aunque la anestesia intrasinovial de la articulación radio-carpal es muy selectiva, podemos encontrarnos con falsos negativos por ejemplo cuando hay una afección del hueso subcondral, o con falsos positivos, como en el caso de una afección en la zona de inserción del ligamento suspensor del menudillo, que puede verse desensibilizada (Ford et al., 1989). Al realizar la punción para administrar el anestésico se puede aprovechar para obtener una muestra de líquido sinovial (Figura 6). Los análisis laboratoriales del mismo suelen reservarse para casos de inflamación aguda o cuando hay sospecha de artritis séptica, pero una valoración macroscópica del color y la viscosidad del líquido sinovial pueden reforzar la sospecha de un problema a este nivel (Ross, 2011).



Figura 6: Realización de una artrocentesis de la articulación radio-carpal en el HV-UZ.

2.3.3.3. Examen radiológico

La radiografía es una herramienta diagnóstica muy útil para la región del carpo, aunque debe tenerse en cuenta que presenta ciertas limitaciones ya que debido a la configuración anatómica del mismo y la superposición de los huesos carpales algunos hallazgos pueden ser difíciles de interpretar. Además, algunos cambios sutiles pueden pasar desapercibidos ya que es una técnica con poca sensibilidad para detectar ciertos procesos como los primeros indicios de osteolisis y de afección subcondral en los huesos carpales (Ross, 2011). En el caso de OA de la articulación radio-carpal, los cambios radiológicos tempranos incluyen ligera formación de entesofitos, más comúnmente en el hueso radio-carpal, y osteofitos marginales sutiles en los hueso carpales y extremo distal del radio. En caballos con OA avanzada de esta articulación, los osteofitos marginales y los entesofitos son más números y de mayor tamaño, y pueden darse fenómenos de remodelación ósea y reacción perióstica, incluyendo áreas de osteolisis. La apreciación radiológica de “pérdida de espacio articular” (que no se debe en realidad a la pérdida del espacio en sí, sino a la disminución en el espesor del cartílago, que conforma una línea radiolúcida que puede encontrarse estrechada en la OA) puede encontrarse en casos avanzados de OA, pero no siempre es un signo radiológico obvio (Figura 7). Como se ha comentado al hablar de las patologías, la OA y la fragmentación osteocondral están estrechamente relacionadas, por lo que en casos de OA pueden encontrarse fragmentos osteocondrales producidos por la ruptura de osteofitos. En ocasiones, es difícil determinar si los osteofitos representan cambios osteoarthríticos o si se trata de pequeños fragmentos osteocondrales (Kawcak and Barrett, 2016; Magnusson and Ekman, 2001).

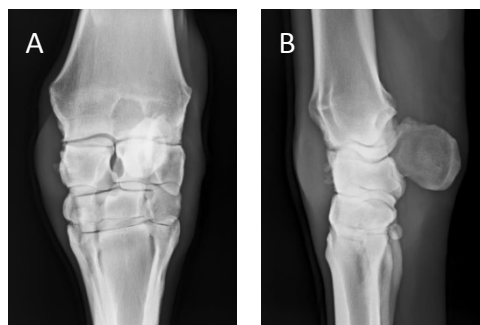


Figura 7: Radiografía frontal (A) y lateral (B) del carpo de un paciente del HV-UZ con signos radiológicos de osteoartritis: estrechamiento de la línea articular y remodelación ósea en los márgenes articulares con formación de osteofitos.

2.3.3.4. Resonancia magnética

La resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI) puede aportar información muy valiosa al ser capaz de detectar pequeñas lesiones en el cartílago y en el hueso subcondral que son inapreciables con otras técnicas como la radiografía. Además, permite la valoración de tejidos blandos de difícil acceso con otras técnicas, como los ligamentos intercarpales, y es de gran utilidad para caracterizar lesiones cuya localización no queda totalmente clara en la radiografía. Por todo ello, la MRI se está consolidando como una de las mejores técnicas para valorar las articulaciones del carpo.

En el caso de OA carpal, las alteraciones que pueden encontrarse mediante MRI incluyen alteraciones del hueso subcondral como aumento de densidad, fenómenos de lisis o lesiones de tipo quístico. Las alteraciones del hueso subcondral, especialmente el aumento de densidad, contribuyen también a la detección de alteraciones en el cartílago articular, por ir frecuentemente asociados ambos procesos. Además, la MRI permite detectar el aumento anormal de fluido en el hueso (edema óseo) (Figura 8.A), que puede ser de gran ayuda para determinar cómo de activo es el proceso patológico. Por otra parte, pueden detectarse otros cambios en tejidos blandos a menudo asociados al proceso osteoartítico, como el engrosamiento de la cápsula articular y la proliferación sinovial (Figura 8.B) (Kawcak et al., 2008; Nagy y Dyson, 2012; Kawcak y Barrett, 2016).

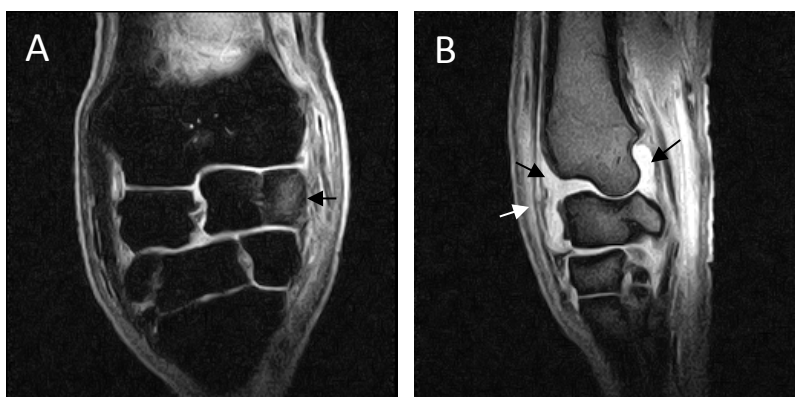


Figura 8: Imágenes de resonancia magnética obtenidas de los animales del estudio en las que se aprecia edema óseo en el hueso carpo-cubital (A, flecha) y considerable efusión sinovial en la articulación radio-carpal (flechas negras) con engrosamiento de la cápsula articular (flecha blanca) (B).

2.3.3.5. Ecografía

La ecografía resulta especialmente útil para valorar los tejidos blandos periarticulares tales como ligamentos, tendones y cápsula articular. Por ejemplo, permite evaluar la desmitis de los ligamentos colaterales y puede utilizarse para valorar algunos de los ligamentos intercarpales, como el palmar medial. También puede utilizarse en casos de tenosinovitis de los tendones extensores y flexores digitales que discurren adyacentes a la articulación radio-carpal. Además, permite valorar el grado de efusión sinovial, el estado de la cápsula articular y de los bordes articulares en caso de alteraciones de la articulación radio-carpal (Tnibar et al., 1993; Ross, 2011) (Figura 9).

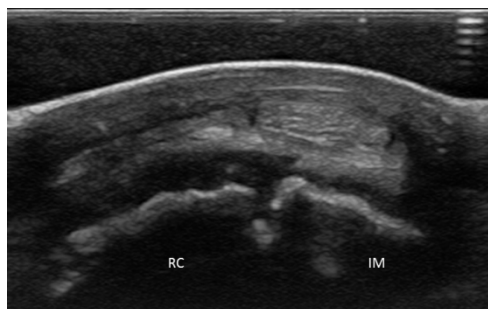


Figura 9: Imagen ecográfica transversal de una articulación radio-carpal con osteoartritis en la que se aprecia engrosamiento de la cápsula articular, efusión sinovial e irregularidades en los bordes óseos de los huesos radio-carpal (RC) e intermedio (IM), tomada de uno de los animales del estudio.

2.3.3.6. Otras técnicas de imagen

Aunque la radiografía, la MRI y la ecografía han sido vistas con más detalle por haber sido las utilizadas en el estudio *in vivo* de esta Tesis Doctoral, existen otras técnicas de imagen que pueden emplearse en caso de patología de la articulación radio-carpal. Por ejemplo, la escintigrafía es especialmente útil para el diagnóstico de lesiones tempranas relacionadas con el estrés del hueso subcondral. La tomografía computerizada resulta útil para determinar la extensión de una lesión y guiar mejor el tratamiento, como en el caso de fracturas. La artroscopia, además de para realizar una intervención quirúrgica terapéutica, es también una técnica diagnóstica que permite la visualización directa del cartílago (Ross, 2011; Kawcak and Barrett, 2016).

3. PRINCIPALES PATOLOGÍAS ARTICULARES EQUINAS

Con la finalidad de describir brevemente los problemas que se dan con mayor frecuencia en las articulaciones del caballo, las patologías se verán agrupadas en distintas categorías, según se asocien a alteraciones en el desarrollo, condiciones sépticas, traumatismos y degeneración, u otros procesos.

3.1. Alteraciones del desarrollo

3.1.1. Osteocondrosis y osteocondritis disecante

La osteocondrosis (OC) es una enfermedad del desarrollo que aparece en caballos jóvenes y que se define como un fallo en el proceso de osificación endocondral del complejo de cartílago epifisario articular. La alteración de este proceso da lugar a áreas de cartílago y hueso subcondral subyacente defectuosos, pudiendo desprenderse esta zona en la fase final del proceso de forma completa (*chip*) o parcial (*flap*) generando un fragmento intra-articular, lo que se conoce como osteocondritis disecante (OCD). Esta patología es de carácter multifactorial, estando implicados factores genéticos, nutricionales, biomecánicos y de conformación. Al tener un componente genético, la OC es más prevalente en unas razas que en otras. Recientemente, en el Pura Raza Español (PRE) se ha reportado casi un 50% de prevalencia en un estudio retrospectivo incluyendo 309 caballos PRE de más de un año de edad (Boado y López-Sanromán, 2016). La OC(D) también es más frecuente en unas

articulaciones, y en unas zonas específicas de las mismas, que en otras. Las áreas donde más frecuentemente se localiza este problema son en la cresta intermedia distal de la tibia y en la tróclea lateral distal del astrágalo en la articulación tarso-crural, en la cresta lateral de la tróclea del fémur en la articulación femoro-patelar y en la cresta sagital del metacarpo/tarso en la articulación metacarpo/tarso-falángica (menudillo) (Van Weeren, 2006). Con menor frecuencia, también puede aparecer OC en otras localizaciones o en otras articulaciones, como la interfalángica proximal (IFP) (Ruggles, 2011). El rendimiento del caballo no siempre se ve afectado pero esta patología genera importantes pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, derivadas de la pérdida de potencial reproductivo del animal por sus implicaciones genéticas. El diagnóstico de esta patología se basa principalmente en la clínica (aunque no siempre dan cojera y/o sinovitis) y los hallazgos radiológicos (Figura 10.A), y el tratamiento de elección es la cirugía artroscópica para retirar el fragmento (en caso de OCD) (Figura 10.B) y/o desbridar la zona afectada (Van Weeren, 2006).

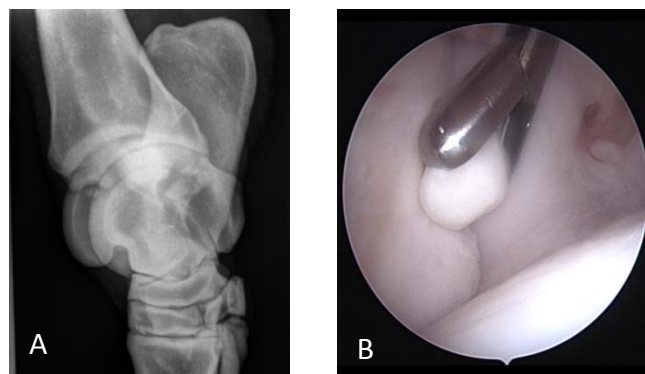


Figura 10: Radiografía en la que se muestra una lesión de osteocondritis disecante en la articulación tarsocrural (A) e imagen artroscópica tomada durante la cirugía para retirar el *chip* articular (B) en un paciente del HV-UZ.

3.1.2. Lesiones quísticas del hueso subcondral

Las lesiones quísticas del hueso subcondral (QOSC) todavía despiertan controversia en cuanto a su definición y nomenclatura, así como sobre su patogénesis y tratamiento. La localización más frecuente de estas lesiones es en el cóndilo medial del fémur en la articulación femoro-tibial de animales jóvenes. Otras localizaciones menos frecuentes incluyen la tercera falange en la articulación interfalángica distal (IFD) (Dyson, 2011) y la tibia en la tarso-crural (Dyson y Ross, 2011), pero pueden aparecer en cualquier articulación. La patogenia de estas lesiones no está claramente establecida, pero parece estar relacionada, al igual que en el caso de la OC(D), con un defecto en la osificación endocondral (Trotter y McIlwraith, 1981). De hecho, se ha considerado que los QOSC son un tipo de presentación de la OC, especialmente cuando aparecen en animales jóvenes de forma bilateral (Stromberg, 1979). Sin embargo, también se ha descrito que los QOSC pueden darse a consecuencia de un traumatismo en el cartílago o en el hueso subcondral (Ray et al., 1996). El diagnóstico generalmente puede confirmarse mediante radiología, observándose un área radiolúcida redondeada de mayor o menor tamaño, quedando más o menos profundidad con respecto a la superficie articular (Figura 11). Las lesiones quísticas pueden clasificarse en varios tipos

según los hallazgos radiológicos en cuanto a forma, radiolucidez, profundidad relativa a la superficie articular y comunicación con la misma (McIlwraith, 2016a).



Figura 11: Radiografía en la que se muestra una lesión quística del hueso subcondral (QOSC) en el extremo distal de la tibia en un paciente del HV-UZ.

Cuando estas lesiones no implican a la articulación o son de pequeño tamaño, pueden responder bien al tratamiento conservador con antiinflamatorios sistémicos e intra-articulares. Si este tratamiento no da resultado, está indicada la cirugía. No hay consenso absoluto sobre el tipo de abordaje quirúrgico, pudiendo realizarse desde una inyección de córtico-esteroides dentro del quiste guiada por artroscopia (Wallis et al., 2008) hasta un desbridamiento quirúrgico de la zona mediante artroscopia, rellenando después el defecto con distintos productos (Ortved et al., 2012). Recientemente, se ha descrito una nueva modalidad de tratamiento para los QOSC en el cóndilo medial del fémur, consistente en la colocación de un tornillo trascondilar que atraviesa el quiste, provocando su osificación y logrando mejoría clínica y radiológica (Santschi et al., 2015).

3.2. Artritis séptica

Se considera artritis séptica a la infección bacteriana de una articulación, pudiendo penetrar dichas bacterias de forma hematogena si el individuo se encuentra comprometido inmunológicamente o sufre una septicemia, siendo ésta la situación más frecuente en el caso de potros neonatos, o bien desde el medio exterior. En este segundo supuesto, las bacterias suelen llegar a la articulación a causa de un trauma que causa perforación directa de la misma, aunque también pueden hacerlo indirectamente por continuidad si el trauma afecta a los tejidos adyacentes. Una tercera causa, que en realidad sería una variación de la herida perforante, sería la iatrogénica tras realizar una artrocentesis. Independientemente de la vía de entrada de las bacterias a la articulación, se va a generar una reacción inflamatoria rápida y muy fuerte que va a ser la principal fuente de problemas. La gran cantidad de mediadores inflamatorios liberados al espacio articular, principalmente por los sinoviocitos, conducirá a la degradación de componentes de la ECM del cartílago articular, viéndose éste afectado y pudiendo iniciarse una patología articular degenerativa. Si el daño articular es muy extenso, puede llegar a producirse una anquilosis de la articulación afectada (Van Weeren, 2016b). Cualquier articulación es susceptible de sufrir una artritis séptica, siendo más grave la afección de una articulación de amplia movilidad como la radio-carpal, tarso-crural o femoro-tibial, por

sus implicaciones funcionales. Además de las articulaciones, otras estructuras sinoviales pueden sufrir también una condición séptica con importantes consecuencias, como la tenosinovitis séptica de las vainas de los tendones flexores digitales (Wereszka et al., 2007), o la bursitis séptica de la bolsa podotroclear, que discurre entre el hueso navicular (sesamoideo distal impar) y el tendón flexor digital profundo y que puede ser alcanzada por una herida punzante en la palma del casco (Wright et al., 1999).

Dadas las graves consecuencias que puede tener una artritis séptica para el caballo, es vital actuar de forma rápida y agresiva ante esta situación. Los lavados articulares, realizados por artrocentesis múltiple o artroscopia dependiendo del caso, van a ser fundamentales para lograr mejorar el pronóstico (Figura 12). Los lavados deben iniciarse de inmediato y realizarse varias veces y de forma abundante. Además, deben acompañarse de antibioterapia de amplio espectro tanto sistémica como local (Van Weeren, 2016b).

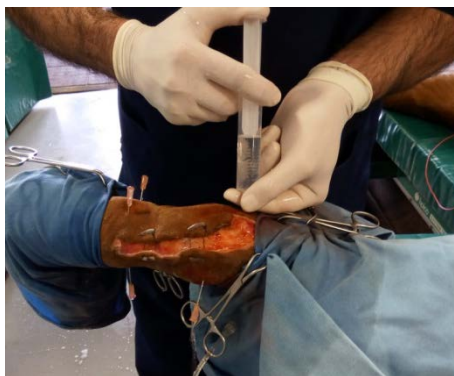


Figura 12: Lavado articular mediante artrocentesis múltiple de las articulaciones metacarpo-falangiana e interfalangiana proximal tras una herida que alcanzó a estas estructuras en un paciente del HV-UZ.

3.3. Artritis traumáticas y degenerativas

La artritis traumática no se refiere a una entidad única, sino a un conjunto de diversas patologías y procesos que se desarrollan tras un trauma, sea este único (trauma agudo) o bien se trate de episodios de trauma repetido (trauma crónico), como los debidos a sobrecarga crónica de la articulación predispuesta por defectos de aplomo o asociada a un mal plan de entrenamiento (Kawcak et al., 2000; Ross y McIlwraith, 2011). El grupo de patologías que pueden desencadenarse es variado y en cualquiera de estas condiciones, debido al daño directo del cartílago y/o del hueso subcondral, a la inflamación o a la alteración mecánica producida, pueden dar lugar a la OA o enfermedad degenerativa articular (EDA o DJD, *degenerative joint disease*). Las artritis traumáticas pueden clasificarse en tres grupos (McIlwraith, 2016b) como se verá a continuación junto con algunos ejemplos relevantes. Cabe matizar que cualquiera de las lesiones que se van a describir puede darse en cualquiera de las articulaciones, pero se resaltarán aquellas en las que la presentación es más frecuente:

- **Tipo I:** incluye sinovitis y capsulitis traumática, sin que exista daño obvio en el cartílago o en estructuras principales de soporte articular. Ejemplos de este grupo son la sinovitis aguda y los esguinces leves. La sinovitis es una de las principales causas de cojera con origen en la articulación IFD, asociada a los fuertes impactos que recibe la porción más distal de las

extremidades del caballo (Dyson, 2011). La sinovitis/capsulitis es también frecuente en el menudillo por ser ésta una articulación de gran movilidad que puede sufrir sobrecarga aguda o repetida (Figura 13.A). Cuando la sobrecarga es repetida en esta articulación, puede desarrollarse una sinovitis crónica proliferativa (villonodular), caracterizada por un engrosamiento y fibrosis de la cápsula articular en su aspecto dorsal (Richardson y Dyson, 2011).

- **Tipo II:** el trauma produce daño directo en el cartílago articular o la rotura completa de una de las principales estructuras de soporte de la articulación. En este grupo se incluyen los esguinces severos, los desgarros de menisco y las fracturas intra-articulares. Ejemplos de estas lesiones pueden encontrarse en las articulaciones IFD e IFP, por las grandes fuerzas que soporta la extremidad distal del caballo. Estas articulaciones pueden padecer afecciones graves de los ligamentos colaterales, que en la IFP pueden asociarse además a luxaciones o subluxaciones, así como distintos tipos de fracturas articulares. Además, pueden darse daños traumáticos del cartílago articular, especialmente en la IFD (Dyson, 2011; Ruggles, 2011). En el caso del menudillo, por su gran movilidad y soporte de fuerzas, también pueden encontrarse lesiones de este tipo, incluidas afecciones de los ligamentos colaterales que pueden llegar incluso a la avulsión y distintos tipos de fracturas articulares, como las de los cóndilos del metacarpo/tarso. En esta articulación también deben tenerse en cuenta las fracturas de los huesos sesamoideos proximales, puesto que algunas pueden implicar a la articulación (Richardson y Dyson, 2011) (Figura 13.B). En los distintos huesos del tarso pueden darse fracturas con relativa frecuencia, pudiendo afectar a alguna de las articulaciones según el tipo de fractura (Dyson y Ross, 2011). La articulación femoro-tibial puede presentar lesiones traumáticas de tipo II específicas como las afecciones de los meniscos y de los ligamentos, tanto cruzados como colaterales. Además, tanto en la articulación femoro-tibial como en la femoro-patelar pueden producirse distintos tipos de fracturas articulares (Walmsley, 2011).



Figura 13: Sinovitis en la articulación del menudillo como ejemplo de artritis traumática tipo I (A) e imagen radiológica de la fractura de un hueso sesamoideo proximal afectando a la articulación como ejemplo de artritis traumática tipo II (B) en pacientes del HV-UZ.

- **Tipo III:** en esta categoría se incluye la OA post-traumática, derivada de alguna de las condiciones anteriores (OA de tipo secundario) cuando el daño es severo o el tratamiento no ha sido adecuado. Dada la importancia de la OA y su interés principal en la presente Tesis Doctoral, esta patología será abordada con mayor detalle en la siguiente sección. En el caso de una articulación dañada de forma traumática, sea el trauma agudo o crónico por sobrecarga repetida, dos procesos patobiológicos fundamentales deben ser tenidos en cuenta. Por una

parte, la inflamación de la membrana sinovial o de la cápsula articular y, por otra, el daño físico o bioquímico del cartílago y del hueso. Un trauma puede producir un daño directo del cartílago y del hueso subcondral. Este daño directo puede ser agudo, como en el caso de las fracturas intra-articulares, o bien crónico por traumas repetidos que alteran la red de colágeno del cartílago articular, como podría suceder por la sobrecarga de ciertas zonas de la superficie articular por un mal aplomo o un mal entrenamiento. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que el cartílago también puede verse afectado aunque no se lesione directamente. Los traumas repetidos pueden dar lugar a una sinovitis o capsulitis, donde los mediadores inflamatorios secretados son capaces de inducir daño en el cartílago. La sobrecarga crónica también puede conducir a la esclerosis del hueso subcondral, pudiendo ocasionar un daño secundario del cartílago al encontrarse éste con un soporte demasiado rígido. Por su parte, los ligamentos extra e intra-articulares que dan soporte a la articulación, así como los meniscos en la babilla, pueden verse afectados por distintos tipos de traumas y causar una alteración mecánica articular, desembocando también en un daño del cartílago (McIlwraith, 2016b)

Por todo ello, al igual que se ha incidido anteriormente, es muy importante considerar siempre a la articulación en su conjunto y no a sus elementos de forma aislada.

3.4. Otras patologías articulares

Además de las alteraciones del desarrollo y de las artritis sépticas y traumáticas, existen otros tipos de afecciones articulares que no entran en ninguno de estos grupos y que veremos de forma breve.

3.4.1. Artritis auto-inmune y artritis inmuno-mediada

La artritis reumatoide de la especie humana es una enfermedad auto-inmune que se caracteriza por una fuerte inflamación de las articulaciones, no séptica ni traumática, que da lugar a una importante degeneración articular. El diagnóstico de esta condición se basa en la detección de un biomarcador llamado factor reumatoide. De acuerdo con este criterio, la RA no ha sido documentada en el caballo. Sin embargo, sí se ha descrito la presencia de auto-anticuerpos anti-colágeno tipo II e inmunocomplejos en el líquido sinovial de caballos con OA o artritis traumática, aunque la relación entre causa y efecto de estos hallazgos es incierta. Por una parte, los inmunocomplejos pueden estar presentes en muchos tipos de patologías y por otra, aunque los auto-anticuerpos sí estén relacionados con la patología articular, no parece probable que sean la causa de la misma, sino que se hayan generado por la exposición a fragmentos de colágeno tipo II liberado tras un daño del cartílago (Osborne et al., 1995). Otro tipo de artritis en el que está también implicada la respuesta inmune ha sido descrita en potros. Se trata de una artritis inmuno-mediada que parece estar asociada a inmunocomplejos circulantes producidos como resultado de una enfermedad sistémica (Madison y Scarratt, 1988). También se ha descrito artritis inmuno-mediada en potros asociada a altos niveles circulantes de proteína M por infección por *Streptococcus* y *Rhodococcus equi* (Sweeney et al., 1987).

3.4.2. Sinovitis reactiva y sinovitis eosinofílica

Tras la inyección intraarticular de cualquier producto puede producirse una sinovitis reactiva. Este proceso puede deberse a que cualquier componente del producto administrado cause una reacción química en la membrana sinovial, o bien a la contaminación con endotoxinas del producto (Palmer et al., 1998). Los córtico-esteroides como el acetato de metilprednisolona pueden causar una sinovitis reactiva, siendo especialmente sensible la articulación IFD. Esta articulación y la tarso-crural también parecen estar más predispuestas que otras al desarrollo de sinovitis reactiva tras la administración de glicosaminoglicanos polisulfatados. En algunos casos, la sinovitis reactiva puede causar una inflamación importante y aunque no es frecuente, una cojera severa, por lo que puede ser confundida con una artritis séptica. La sinovitis reactiva suele desarrollarse de forma más rápida, el recuento de células nucleadas está elevado pero por debajo de valores sépticos y los signos clínicos se resuelven de uno a tres días después. Distinguir un proceso de otro puede ser complicado, por lo que en caso de duda se recomienda realizar un protocolo terapéutico de artritis séptica con lavados articulares y antibioterapia (Bertone, 2011). La sinovitis eosinofílica es una condición rara y su causa no está clara, pudiendo tratarse de una reacción alérgica a un producto inyectado o a la migración de un parásito, o bien ser de carácter verdaderamente idiopático (Turner et al., 1990; Madison y Ziemer, 1993; Climent et al., 2007).

4. LA OSTEOARTRITIS O ENFERMEDAD DEGENERATIVA ARTICULAR

4.1. Definición

La osteoartritis (OA), o enfermedad degenerativa articular, es un desorden articular crónico, caracterizado por una degradación progresiva del cartílago articular y en el que interactúan factores biológicos y mecánicos sobre las distintas estructuras articulares con un papel central de la inflamación (Prades y Carmona, 2009). La OA se consideró durante mucho tiempo como consecuencia únicamente de alteraciones sobre el cartílago, ya fueran debidas a procesos que aumentarían la presión en la articulación o a la fragilidad del cartílago articular. Esta perspectiva se basaba en que los condrocitos son muy poco activos metabólicamente y en que, al contrario que otros tejidos, el cartílago no puede desarrollar una respuesta inflamatoria convencional al no estar vascularizado ni innervado (Berenbaum, 2013). Los avances en biología molecular de las últimas décadas han modificado profundamente este paradigma, al descubrirse la implicación de una gran variedad de mediadores inflamatorios que son capaces de aumentar la producción de enzimas degradativas por parte de los condrocitos, lo que condujo a la perspectiva inflamatoria de esta patología. Sin embargo, llevó tiempo que la sinovitis fuera aceptada como un componente crítico en el inicio y progreso de la OA (Goldring y Goldring, 2004; Sellam y Berenbaum, 2010; Kapoor et al., 2011). Además, ha ido incrementando la evidencia de la importante implicación del hueso subcondral en la patología, tanto por las consecuencias sobre el cartílago de su alteración mecánica como por su papel en la liberación de mediadores inflamatorios implicados en la percepción del dolor en la OA (Maldonado y Nam, 2013; Goldring y Goldring, 2010). En resumen, aunque la OA se considerara inicialmente como una patología dirigida únicamente por el cartílago y caracterizada sólo por los fenómenos degenerativos sobre el mismo (de ahí el término

osteoartrosis), la OA ha mostrado ser un proceso mucho más complejo en el que están implicados una gran cantidad de mediadores inflamatorios y en la que participan también la membrana sinovial y el hueso subcondral, por lo que actualmente el término osteoartritis es el más extendido y aceptado para definir a esta patología (Berenbaum, 2013).

4.2. Fisiopatología de la osteoartritis

La OA puede clasificarse como primaria o secundaria. En el primer caso no hay una causa predisponente aparente y se da principalmente en animales de edad avanzada debido a la pérdida de propiedades biomecánicas del cartílago asociadas con la edad, como la disminución del contenido en agua y proteoglicanos en la ECM (Lee et al., 2013). La OA secundaria está asociada a una anormalidad articular que predispone a la degeneración prematura del cartílago. Algunas de estas anormalidades parecen ser más predisponentes en unas articulaciones que en otras y pueden ser de distintos tipos, como se ha comentado en la sección anterior. Además, otros factores “extra-articulares” como la obesidad pueden estar implicados en la patogenia de esta enfermedad (Buff et al., 2002; Dumond et al., 2003).

Los hallazgos más frecuentemente asociados a la OA son el deterioro del cartílago, la formación de osteofitos, la esclerosis del hueso subcondral, la capsulitis y la sinovitis. La sinovitis acompaña a la OA en fases tanto tempranas como tardías y se asocia a alteraciones en el cartílago articular, dirigidas por mediadores inflamatorios que crean un desequilibrio entre los mecanismos de degradación y de reparación del cartílago: la producción y liberación de mediadores inflamatorios y catabólicos altera el equilibrio entre los procesos de anabolismo y catabolismo del cartílago, inclinando la balanza a favor de su destrucción. Al mismo tiempo, los subproductos de la degeneración del cartílago son fagocitados por los sinoviocitos, lo que ejerce en éstos un estímulo inflamatorio que conlleva la liberación de más mediadores proinflamatorios, que a su vez agravan la degeneración del cartílago, creando un círculo vicioso que hace que esta patología tenga un carácter crónico, progresivo e insidioso (Schlueter y Orth, 2004; Sellam y Berenbaum, 2010).

Los condrocitos son los responsables de sintetizar la ECM del cartílago y sobre ellos actúan factores reguladores para que mantengan un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la misma, permitiendo así la renovación del cartílago. En respuesta a un daño en la articulación, los sinoviocitos liberan citoquinas proinflamatorias, mayoritariamente interleuquina 1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), las cuales inducen la liberación de enzimas degradativas, principalmente metaloproteinasas de matriz (MMPs), sobre todo por parte de los propios condrocitos, produciendo un desequilibrio a favor de la degradación (Schlueter y Orth, 2004; Sellam y Berenbaum, 2010). Esta degradación puede ser mediada directamente por TNF α e IL-1 β , o bien de forma indirecta, ya que estas citoquinas inducen además la liberación de otros mediadores inflamatorios, como prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO) y otras interleuquinas, que a su vez también van a estimular la producción de MMPs (Kapoor et al., 2011). Las enzimas liberadas degradan los componentes de la matriz del cartílago, haciendo que éste pierda sus propiedades mecánicas y no pueda soportar las fuerzas a las que es sometida la articulación, creándose efectos colaterales como la formación de osteofitos o la esclerosis del hueso subcondral (Prades y Carmona, 2009). El aumento de los subproductos del catabolismo del cartílago, al ser fagocitados por los

sinoviocitos, producen o aumentan la sinovitis, estimulando a los sinoviocitos a liberar más mediadores de la inflamación, repitiéndose el ciclo sucesivamente (Sellam y Berenbaum, 2010). Que la balanza se incline a favor de la degradación no implica que no existan mecanismos antiinflamatorios tratando de contrarrestar estos efectos y de revertir la situación a la normalidad. Desafortunadamente, estos mecanismos son insuficientes y el ciclo de degradación-inflamación se perpetúa (Schlueter y Orth, 2004).

Este proceso de retroalimentación entre la destrucción del cartílago y la inflamación de la membrana sinovial está bien definido, sin embargo sigue sin estar completamente claro quien inicia este ciclo: puede que la sinovitis esté presente desde el principio de la OA y que sea exacerbada por los procesos de degradación, o puede que los cambios inflamatorios sean secundarios a los degenerativos (Loeuille et al., 2005). En lo que sí hay consenso es en que la inflamación articular juega un papel central en la patogenia de la OA, poniendo una vez más en manifiesto la compleja interacción entre todos los componentes de la articulación (Sellam y Berenbaum, 2010).

Los factores etiológicos de la OA parecen variar según el tipo de articulación (Buckwalter y Brown, 2004). En las articulaciones muy móviles, como la radio-carpal, intercarpiana, menudillo, tarso-crural o babilla, el inicio de la patología podría deberse a un trauma directo sobre el cartílago articular o a una sinovitis, siendo más frecuente la afección de estas articulaciones en animales jóvenes. Por otra parte, en las articulaciones poco móviles, como la interfalangiana proximal, la carpo-metacarpiana o las distales del tarso, parece que son los traumas repetidos los que desencadenan la patogenia, bien sea por que afecten directamente a la estructura del cartílago articular, bien sea por que generen esclerosis del hueso subcondral, como se ha comentado en la sección anterior. Estas articulaciones se ven más frecuentemente afectadas en animales de edad avanzada. Dependiendo del tipo de articulación, las manifestaciones del proceso patológico y el abordaje terapéutico también varían. Mientras que en las articulaciones poco móviles la proliferación de osteofitos tiende a ser exagerada pudiéndose apreciar las neoformaciones óseas desde el exterior como en el caso de la sobremano/pie (OA de la articulación IFP) o el esparaván (OA de las articulaciones intertarsiana distal y/o tarso-metatarsiana), en las articulaciones de mayor movilidad los cambios suelen ser más sutiles, pudiendo ser en ocasiones incluso inapreciables radiológicamente. En estas articulaciones, el tratamiento debe ir dirigido a limitar los daños y ralentizar el proceso en la medida de lo posible, mientras que en las articulaciones poco móviles una estrategia terapéutica puede ser recurrir a acelerar su anquilosis, como se verá más adelante (Kidd et al., 2001; Prades y Carmona, 2009; McIlwraith, 2016b).

A continuación, se describirán con más detalle los principales mediadores implicados en el proceso de la OA.

4.2.1. Mediadores proinflamatorios y catabólicos

Las citoquinas proinflamatorias son principalmente secretadas por los sinoviocitos macrófagos y difunden a través del líquido sinovial hasta sus células diana, que principalmente son los condrocitos y los propios sinoviocitos. Éstos, por regulación autocrina, liberan en respuesta más mediadores inflamatorios, mientras que los condrocitos son los principales

secretoras de enzimas degradativas, si bien éstas también son producidas por los sinoviocitos. En la Tabla 3 se resumen las principales características de las citoquinas y mediadores proinflamatorios más importantes (Prades y Carmona, 2009; Sutton et al., 2009; Sellam y Berenbaum, 2010; Kapoor et al., 2011):

CITOQUINA	ACCIONES	
TNF α <i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>	↑ Mediadores inflamatorios (PGE2, NO, IL-1)	↓ Síntesis componentes ECM cartílago ↓ Producción TIMPs
IL-1 β <i>Interleuquina 1 beta</i>	↑ MMPs ↑ Mediadores inflamatorios (PGE2, NO, IL-6, TNF α)	↓ Producción TIMPs ↓ Síntesis componentes ECM cartílago (PGs)
IL-6 <i>Interleuquina 6</i>	↑ MMP-2 ↑ Proteínas fase aguda Reclutamiento leucocitos (linfocitos T y B)	↓ Síntesis componentes ECM cartílago (PGs) ↓ Proliferación condrocitos
IL-8 <i>Interleuquina 8</i>	↑ Neovascularización ↑ Radicales libres	Reclutamiento leucocitos (neutrófilos) Hipertrofia y calcificación condrocitos
IL-17 <i>Interleuquina 17</i>	↑ Mediadores inflamatorios (PGE2, NO) ↑ MMP	↑ Factores proangiogénicos ↑ Actividad osteoclastos
IL-18 <i>Interleuquina 18</i>	↑ Mediadores inflamatorios (IL-1 β , TNF α , IFN γ) ↑ Factores proangiogénicos	↓ Síntesis componentes ECM cartílago Hiperplasia sinovial y reclutamiento leucocitos
LIF <i>Factor Inhibidor de Leucemia</i>	↑ MMP-2 y MMP-13 Reclutamiento leucocitos	↓ Síntesis componentes ECM cartílago (PGs)
PGE2 <i>Prostaglandina E 2</i>	↑ MMP-13, inhibición MMP-1 Regula expresión componentes ECM	↓ Síntesis componentes ECM cartílago (PGs)
NO <i>Óxido nítrico</i>	↑ MMPs ↑ Angiogénesis, vasodilatación y permeabilidad Apoptosis condrocitos	↓ Citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento ↓ Síntesis componentes ECM cartílago (PGs y colágeno)

Tabla 3.- Acciones más relevantes llevadas a cabo en la articulación por los principales mediadores proinflamatorios durante la fisiopatología de la osteoartritis.

De forma resumida, los mediadores proinflamatorios estimulan la producción de más mediadores, estimulan la síntesis y liberación de enzimas degradativas aumentando la

destrucción de componentes del cartílago, a la vez que también son capaces de inhibir la síntesis de los mismos. Las acciones e interacciones entre citoquinas y mediadores proinflamatorios son muy complejas, pero en conjunto provocan la destrucción del cartílago articular (Sellam y Berenbaum, 2010; Kapoor et al., 2011;).

En cuanto a las enzimas que median la destrucción del cartílago, las más importantes son las MMPs. Se trata de enzimas proteasas que presentan distintas isoformas, cada una con una afinidad especial por ciertos componentes de la ECM del cartílago, por lo que se clasifican principalmente en colagenasas, gelatinasas y estromelisin, existiendo otros tipos minoritarios como las matrilisinas y las enamelinas. Las características más relevantes de las principales enzimas degradativas se presentan en la Tabla 4 (Goldring y Goldring, 2004; Prades y Carmona, 2009; Troeberg y Nagase, 2012):

ENZIMA	TIPO	AFINIDAD Y ACCIONES
MMP-1	Colagenasa	Actividad preferente por colágeno tipo III
MMP-2	Gelatinasa	Degradación colágeno distintos tipos
MMP-3	Estromelisina	Degradación PGs
MMP-9	Gelatinasa	Degradación colágeno distintos tipos
MMP-13	Colagenasa	Degrada conjuntamente colágeno tipo I, II y III
ADAMTS-4 y 5 (Agrecanasas 1 y 2)	Agrecanasa	Degradación del PG agrecan

Tabla 4.- Clasificación de las principales enzimas de degradación del cartílago que participan en la fisiopatología de la osteoartritis y su afinidad por los componentes de la matriz extracelular del cartílago.

Las enzimas degradativas son liberadas tanto por sinoviocitos como por condrocitos, siendo estos últimos los mayores productores. El papel de estas enzimas es fundamental para mantener la homeostasis del cartílago sano, permitiendo en condiciones normales mantener una renovación del mismo. Sin embargo, la estimulación por citoquinas proinflamatorias induce la liberación excesiva de estas enzimas rompiendo el equilibrio a favor del catabolismo (Dean et al., 1989; Prades y Carmona, 2009; Troeberg y Nagase, 2012).

4.2.2. Mediadores antiinflamatorios y anabólicos

Como se ha mencionado anteriormente, también existen otras citoquinas y mediadores con un papel antiinflamatorio, de inhibición de la degradación del cartílago o de estimulación de la producción de componentes de la ECM, que tratan de contrarrestar las acciones de los elementos anteriores. En la Tabla 5 se encuentran resumidas las características de las principales citoquinas antiinflamatorias que participan en el proceso (Sellam y Berenbaum, 2010; Kapoor et al., 2011).

CITOQUINA	ACCIONES
IL-4 <i>Interleuquina 4</i>	↓ Citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN γ , PGE2) ↓ MMP3 ↓ Inflamación, vascularización y degradación
IL-10 <i>Interleuquina 10</i>	↓ Citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN γ , PGE2, NO) ↓ MMPs ↑ Citoquinas antiinflamatorias (IL-1Ra)
IL-13 <i>Interleuquina 13</i>	↓ Citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN γ , PGE2) ↓ MMP3 ↑ Citoquinas antiinflamatorias (IL-1Ra)
IL-1Ra <i>Antagonista del receptor de la interleuquina 1</i>	Bloquea receptor para IL-1 β (inhibición competitiva) Inhibe producción MMPs

Tabla 5.- Acciones más relevantes llevadas a cabo en la articulación por los principales mediadores antiinflamatorios durante la fisiopatogenia de la osteoartritis.

Las citoquinas antiinflamatorias actúan en general inhibiendo la producción y/o la liberación de las principales citoquinas proinflamatorias, o bien impiden que se unan a su receptor, obstaculizando por tanto sus acciones. Algunas de ellas también estimulan la liberación de otros mediadores antiinflamatorios o inhiben a las enzimas degradativas. Sin embargo, algunas citoquinas antiinflamatorias pueden contribuir a la hiperplasia de la membrana sinovial (Prades y Carmona, 2009).

Existen otras moléculas, los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs), que son producidos por condrocitos y sinoviocitos B (fibroblastos) y cuya función es contrarrestar los efectos de las MMPs. Se conocen 4 tipos (TIMP 1-4) y en condiciones normales están en equilibrio con las MMPs en los tejidos participando en funciones fisiológicas (Clutterbuck et al., 2010; Sellam y Berenbaum, 2010). En la OA equina se ha identificado el papel de dos TIMPs (TIMP-1 y 2), cuyos niveles están significativamente aumentados en la OA, pero no lo suficiente como para contrarrestar la excesiva actividad de las MMPs (Clutterbuck et al., 2010).

Otros mediadores anabólicos y anti-catabólicos en la articulación son los factores de crecimiento, siendo los principales implicados el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1). TGF- β disminuye la hiperplasia sinovial, aumenta la producción de colágeno y de PGs y disminuye la de proteasas y la expresión del receptor para IL-1 β . Por su parte, IGF-1 también aumenta la producción de colágeno y PGs y promueve la formación de otros componentes de la ECM, a la vez que disminuye la expresión de IL-1 β y MMPs, en combinación con otras moléculas (Frisbie et al., 2000; Iqbal et al., 2000).

4.2.3. Otros mediadores

Algunos factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial (EGF) o el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también se consideran implicados en la

patogenia de la OA, ya que en esta situación se encuentran en desequilibrio con los factores anti-angiogénicos, favoreciendo un aumento en la vascularización de la membrana sinovial que a su vez facilita la inflamación (Bonnet y Walsh, 2005).

Existen además diversos neuropéptidos, como la sustancia P, el factor de liberación de corticotropina (CRF), o la urocortina entre otros, que participan en la percepción del dolor durante la OA debido a cambios en el sistema nociceptivo articular. Además, estos neuropéptidos también pueden participar en otros procesos como la vasodilatación, promoción de la inflamación y activación de osteoclastos (Sellam y Berenbaum, 2010).

Las adipoquinas visfatina, nectina y leptina son secretadas por el tejido adiposo de la membrana sinovial y parecen estar implicadas en la degradación del cartílago. En la especie humana se ha encontrado relación entre los niveles en plasma de leptina y el índice de masa corporal en pacientes de OA (Dumond et al., 2003). La relación entre leptina y OA no está hasta la fecha descrita en el caballo, pero se ha encontrado relación entre leptina y obesidad en esta especie (Buff et al., 2002).

Los radicales libres derivados del oxígeno (ODFR) son productos de la respuesta inflamatoria con gran capacidad para dañar tejidos de forma directa y se considera que pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la OA. Derivan principalmente de neutrófilos activados que llegan al espacio articular y de ciclos de isquemia-reperfusión (Ziskoven et al., 2010).

En la Figura 14 se representan los principales procesos que tienen lugar en la fisiopatogenia de la OA.

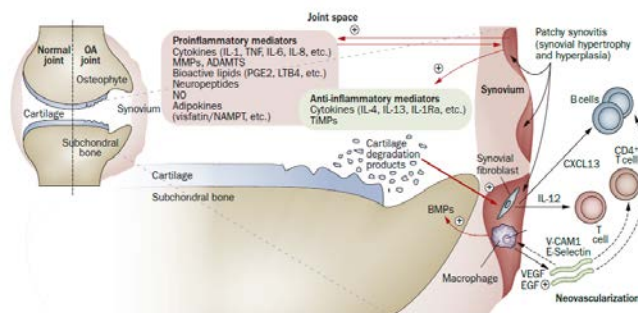


Figura 14: Ilustración esquemática de la compleja interacción entre diversos mediadores que tiene lugar durante la fisiopatogenia de la osteoartritis y los efectos derivados de este proceso sobre las estructuras articulares. Tomado de Sellam y Berenbaum (2010).

4.3. Sintomatología y diagnóstico de la osteoartritis

Como reflejo del proceso que se acaba de describir, los caballos con OA presentan distintos grados de dolor, efusión sinovial y limitación funcional, además de signos inflamatorios como aumento de calor local (Jansson, 1996). En los casos avanzados, y especialmente en articulaciones de baja movilidad, las neoformaciones óseas derivadas del proceso de la OA (osteofitos) puede ser claramente visibles desde el exterior (sobremano/pie, esparaván) (Dyson y Ross, 2011; Ruggles, 2011) (Figura 15). Cualquier articulación puede verse afectada por la OA, pero esta patología se observa más frecuentemente en la IFP, el menudillo,

las articulaciones carpales y las articulaciones distales del tarso, aunque también puede aparecer en las articulaciones tarso-cruval y talo-calcánea o en la babilla, siendo más habitual en estas localizaciones que la OA vaya asociada a otra patología como la OC(D) (Kidd et al., 2001).



Figura 15: Aspecto externo (izquierda) e imagen radiológica correspondiente (derecha) de una osteoartritis de las articulaciones distales del tarso (esparaván) (A) y de una articulación interfalangiana proximal con osteoartritis (sobrepie) (B).

El dolor generalmente se manifiesta como cojera y es consecuencia de la inflamación, la neovascularización y la neoinervación que suceden en la articulación, así como del aumento de la presión que soporta el hueso al dañarse el cartílago. Sin embargo, no existe una correlación entre el grado de dolor manifestado y la severidad de las lesiones articulares (Prades y Carmona, 2009). La estimulación de ciertos nociceptores, además, induce la producción de mediadores inflamatorios que contribuyen a perpetuar la respuesta inflamatoria articular (inflamación neurogénica) (Bonnet y Walsh, 2005). La efusión sinovial ocurre a consecuencia de la sinovitis, que conlleva un aumento en la producción de líquido sinovial. Un grado elevado de efusión puede conducir además a la fibrosis de la cápsula articular, lo que a su vez agrava la limitación funcional de la articulación (Prades y Carmona, 2009).

Los signos clínicos descritos, junto con la historia del animal, van a orientar el diagnóstico. Los hallazgos radiológicos más frecuentemente asociados a la OA son la formación de osteofitos marginales, la esclerosis del hueso subcondral, la proliferación del periostio adyacente, y la pérdida de espesor del cartílago articular. Sin embargo, un examen radiológico normal no descarta la presencia de OA, lo que ha conducido al desarrollo de otros métodos diagnósticos para esta patología. Además de técnicas de imagen tales como la MRI, la ecografía, escintigrafía o artroscopia que se han comentado en apartados anteriores, el uso de biomarcadores tanto a nivel local (líquido sinovial) como sistémico está adquiriendo gran importancia (Jansson, 1996).

El análisis del líquido sinovial puede aportar bastante información sobre el estado de la articulación. Los parámetros que pueden valorarse en él van desde la apariencia macroscópica (color, volumen, viscosidad), la determinación de proteínas totales, el recuento total y diferencial de leucocitos o la citología, hasta otros más específicos como la actividad de ciertas enzimas (Mahaffey, 2002).

Aunque la determinación de estos parámetros puede aportarnos información valiosa sobre la severidad de la sinovitis que presenta la articulación, no permiten reflejar el grado de deterioro del cartílago. Es por ello que en las últimas décadas se ha iniciado la búsqueda de biomarcadores, tanto a nivel sinovial como en suero, que puedan aportar información sobre el estado del cartílago y la progresión de la OA (Bertone et al., 2001).

4.3.1. Biomarcadores en osteoartritis

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define biomarcador como “cualquier medición que permita reflejar la interacción entre un sistema biológico y un potencial daño, que puede ser químico, físico o biológico. La respuesta medida puede ser funcional y fisiológica, bioquímica a nivel celular, o una interacción molecular” (OMS, 1993). La búsqueda de biomarcadores es una importante área de investigación en muchas enfermedades, incluida la OA. Como ejemplo, en la última revisión de la Sociedad Internacional de Investigación en Osteoartritis (OARSI) en 2016, se recoge la publicación de unos 200 nuevos estudios sobre biomarcadores para la OA desde la anterior revisión en 2015 (Mobasheri et al., 2017).

Como se ha descrito en la sección anterior, el proceso de la OA resulta en el incremento de mediadores inflamatorios junto con la liberación de micromoléculas y sus fragmentos al líquido sinovial y al suero, pudiendo emplearse la modificación en sus niveles como reflejo del estado de los procesos anabólicos y catabólicos articulares. Los biomarcadores son útiles para clarificar los procesos patológicos en la articulación, diferenciar de forma diagnóstica entre articulaciones sanas y afectadas y monitorizar la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (McIlwraith, 2005). Según la forma en que son detectados, los biomarcadores pueden subdividirse en bioquímicos o inmunológicos. Los segundos se basan en la unión de un anticuerpo específico a un epítipo concreto de la molécula a detectar, por ejemplo, mediante la técnica ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, *enzyme-linked immunosorbent assay*), siendo estas técnicas las más estudiadas por ofrecer una mayor sensibilidad (Frisbie, 2016b).

Otra clasificación de los biomarcadores es en directos e indirectos. Los biomarcadores directos se originan en el cartílago o el hueso subcondral y proporcionan información sobre su anabolismo y catabolismo. A nivel del cartílago, los biomarcadores anabólicos más empleados son el carboxipropeptido del colágeno tipo II (CPII), que aporta información sobre la síntesis del colágeno tipo II al ser un precursor del mismo, y el CS, que refleja la síntesis de agregano. Ambos se han encontrado incrementados en líquido sinovial y suero en la OA equina. Por su parte, los principales marcadores de catabolismo del cartílago son los fragmentos del colágeno tipo II, los GAGs y la COMP. Los dos primeros se encuentran aumentados en líquido sinovial mientras que COMP se halla disminuida en líquido sinovial y suero durante la OA (McIlwraith, 2005; McIlwraith et al., 2001).

Los biomarcadores indirectos son aquellos que no se originan mayoritariamente en cartílago o hueso subcondral pero que tienen capacidad para influir en su integridad. En este grupo se incluyen diversas citoquinas y mediadores que han sido descritos en el apartado de la fisiopatología, como IL-1 β , PGE2, MMPs o IGF (Bertone et al., 2001; Frisbie, 2016b). A continuación nos referiremos a un grupo de biomarcadores indirectos constituido por las proteínas de fase aguda (PFA), de creciente interés en medicina veterinaria y con relevancia para la presente Tesis Doctoral.

4.3.1.1. Proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda (PFA) se han usado como biomarcadores de inflamación durante décadas en medicina humana, siendo su estudio y utilización más recientes en medicina veterinaria y constituyendo una importante área de investigación en la actualidad. Las PFA son proteínas sanguíneas cuya concentración cambia en respuesta a la infección o al daño tisular (Gabay y Kushner, 1999; Kushner, 1993), al ser estimulada su producción por las distintas citoquinas y mediadores inflamatorios liberados (Koj, 1996). De acuerdo a su patrón de respuesta, las PFA pueden clasificarse en mayores y menores/moderadas, iniciándose el incremento de las primeras a las pocas horas y alcanzando los valores máximos a la 24- 48h, mientras que las PFA menores/moderadas tienen incrementos más lentos y se mantienen elevadas por más tiempo (Taira et al., 1992), lo cual es importante a la hora de medir la PFA más apropiada según la fase clínica. En el caballo, el amiloide sérico A (SAA) es la PFA mayor y por tanto la más estudiada. Sin embargo, otras PFA menores/moderadas como el fibrinógeno, la proteína C reactiva (CRP) o la haptoglobina, también están siendo objeto de estudio en esta especie. En el caso concreto de las patologías articulares, el SAA se ha determinado en líquido sinovial equino de articulaciones sanas y patológicas (Jacobsen et al., 2006a; Jacobsen et al., 2006b), y se ha valorado el efecto de distintos procedimientos sobre sus niveles (artrocentesis repetidas, administración repetida de ampicilina intra-articular, lavado artroscópico) (Sanchez-Teran, 2012; Sanchez-Teran et al., 2016;). Sin embargo, el estudio de otras PFA como la haptoglobina en la patología articular equina es todavía un área por explorar.

4.3. Tratamiento de la osteoartritis

Para establecer un buen tratamiento de la OA es fundamental entender su patogenia y los cambios que suceden en la articulación. Visto el carácter insidioso y progresivo de esta patología ya podemos anticipar que, a día de hoy, no existe ningún tratamiento totalmente efectivo para este desorden, pudiendo aspirar sólo a paliar sus efectos. Las estrategias terapéuticas actuales están enfocadas en reducir el dolor, disminuir la limitación funcional y enlentecer el deterioro de las estructuras articulares. La inflamación juega un papel central en la fisiopatología de la OA, como ya hemos visto anteriormente. Por ello, un abordaje terapéutico óptimo debería tratar de limitar esta inflamación, la subsiguiente degradación del cartílago, e intentar estimular la regeneración de las estructuras articulares afectadas (Walker-Bone et al., 2000). A continuación, se revisarán los principales tratamientos para la OA que se estudian y emplean en la actualidad en ortopedia equina.

4.3.1. Tratamientos médicos convencionales

El tratamiento médico de la OA es uno de los abordajes más utilizados en la clínica equina y comprende principalmente la administración de antiinflamatorios, tanto a nivel sistémico como local, y el uso de suplementos con diversas propiedades. Es habitual en la práctica clínica la combinación de distintos productos, sin que haya clara evidencia de la superioridad de una u otra combinación (Goodrich y Nixon, 2006).

Una forma de clasificar los fármacos utilizados para tratar la OA se basa en los principales efectos ejercidos por los mismos, pudiendo establecerse dos grandes grupos: los fármacos modificadores de los síntomas (*symptom modifying osteoarthritis drugs*, SMOADs) y los fármacos modificadores de estructura (*structure or disease modifying osteoarthritis drugs*, DMOADs). Los SMOADs son fármacos capaces de proporcionar mejoría clínica, principalmente aliviando el dolor, pero no influyen sobre el progreso de la enfermedad. A este grupo pertenecen los fármacos analgésicos y antiinflamatorios. Los DMOADs son fármacos con potencial para reducir, frenar o revertir la destrucción del cartílago articular, conocidos anteriormente como condroprotectores (Wieland et al., 2005). Idealmente, un fármaco para la OA debería poseer ambas propiedades: aliviar los síntomas de la OA al mismo tiempo que ralentiza (o de forma óptima, revierte) la progresión de la misma. Por ello, la acción como DMOADs de algunos fármacos inicialmente clasificados como SMOADs ha sido posteriormente evaluada. La clasificación estricta en uno u otro grupo es complicada, ya que aunque existen estudios que sugieren la acción como SMOAD de ciertos fármacos en ocasiones son insuficientes para afirmar categóricamente estos efectos (McIlwraith et al., 2012). En la Tabla 6 se muestran los principales fármacos utilizados en el manejo de la OA equina para los que se ha visto efecto como SMOAD o DMOAD (McIlwraith et al., 2012), que serán descritos con más detalle a continuación.

GRUPO	FÁRMACO	Fármacos modificadores de los síntomas (SMOADs)	Fármacos modificadores de estructura (DMOADs)
Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)		✓	
Córtico-esteroides intraarticulares	Betametasona	✓	
	Metilprednisolona	✓	(posible condrotoxicidad)
	Triamcinolona	✓	✓
Ácido hialurónico			✓
DMOADs de acción lenta (<i>slow acting DMOADs</i> , SDMOADs)	PSGAG	✓	✓
	Nutracéuticos (suplementos orales) Ej. Condroitín sulfato, glucosamina		✓ (pocos estudios)

Tabla 6.- Acciones conocidas de los principales fármacos usados en el tratamiento de la osteoartritis equina (antiinflamatorios no esteroideos, cortico-esteroides intraarticulares, ácido hialurónico y SDMOADs), como SMOAD (fármaco modificador de los síntomas) o DMOAD (fármaco modificador de estructura).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los fármacos más frecuentemente utilizados a nivel sistémico para paliar la OA. Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima ciclo-oxigenasa (COX). Además de efectos adversos generales derivados de la inhibición no selectiva de la isoforma constitutiva COX-1, también se ha descrito efecto negativo de los AINEs sobre la síntesis de PGs en el cartílago articular en ciertas condiciones (Beluche et al., 2001). De todos los AINEs, la fenilbutazona es sin duda el más empleado en el caballo con OA, siendo la administración oral la más usada por ser más práctica y segura. El uso de este fármaco disminuye la cojera, los signos inflamatorios, la efusión sinovial y el nivel de PGE2 en líquido sinovial (Raekallio et al., 1997). Otro AINE de uso extendido en la clínica equina es el flunixin meglumine, que también ha mostrado ser útil en el manejo de la OA, pero la relación coste-eficacia inclina la elección hacia la fenilbutazona (Goodrich y Nixon, 2006). El ketoprofeno parece ser retenido en las articulaciones inflamadas en mayor medida que en las sanas, lo que podría resultar en una mejor eficacia de su uso. Además, su rango de seguridad es más amplio que el de la fenilbutazona. El ketoprofeno proporciona una analgesia del dolor músculo-esquelético de buena a excelente y sus efectos incluyen la reducción en la cojera y la efusión sinovial, pero los efectos de la fenilbutazona en el tratamiento de la inflamación articular aguda siguen siendo superiores (Owens et al., 1995; Owens et al., 1996). Otros AINEs que se han estudiado son el naproxeno y el carprofeno, pero al igual que el ketoprofeno, su uso no está extendido, siendo la fenilbutazona el AINE por excelencia para el manejo de la OA equina.

El uso de córtico-esteroides intra-articulares sigue siendo una estrategia terapéutica muy extendida para la OA equina. Su eficacia se basa en la inhibición de la proteína NF-kB, implicada en la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que hace que estas moléculas disminuyan drásticamente (Goodrich y Nixon, 2006). Pese a su potente efecto antiinflamatorio, su uso es controvertido debido a sus efectos sobre el metabolismo del cartílago articular, como la disminución en la síntesis y la pérdida de GAGs, la inhibición de la síntesis de PGs o la necrosis de condrocitos (Caron, 2005; McIlwraith, 2010). Estos efectos negativos van a depender del tipo de córtico-esteroide utilizado, la concentración, la duración de la exposición y muchas otras variables. La metilprednisolona, la betametasona y la triamcinolona son los córtico-esteroides más empleados en el manejo terapéutico de la OA, siendo esta última la más utilizada en la actualidad por no presentar efectos deletéreos sobre el cartílago, pese a que la duración de su efecto es menor que la de otros córtico-esteroides (Goodrich y Nixon, 2006; McIlwraith, 2010).

La implicación de la membrana sinovial en el proceso osteoartítico afectaría también a la producción de líquido sinovial, encargado de nutrir y lubricar la articulación. Los sinoviocitos alterados producen HA de menor tamaño, lo que resta viscosidad al líquido sinovial. Se ha sugerido que la falta de lubricación en la articulación tiene un papel significativo en la patogenia de la OA, lo que ha incrementado la investigación sobre diversas sustancias capaces de aportar viscosuplementación con el objetivo de mejorar la lubricación de la articulación y su protección, disminuyendo el dolor (Elsaid et al., 2008). El ácido hialurónico (HA) ha sido el producto más utilizado tradicionalmente para este fin y su uso está muy extendido en el manejo terapéutico de la OA equina. Aunque el mecanismo de acción a nivel celular del HA exógeno no se conoce exactamente, se cree que además de restaurar la viscoelasticidad y de mejorar la lubricación de la articulación (Howard y McIlwraith, 1993),

podría tener cierto papel en la regulación del ambiente inflamatorio articular y en la estimulación de la producción endógena de HA (Goodrich y Nixon, 2006). Existen diversos tipos de HA con distintos pesos moleculares y, aunque la vía de administración más habitual es la intraarticular, la administración intravenosa también ha mostrado ser beneficiosa, e incluso se ha estudiado su uso oral (Richardson y Loinaz, 2007; Carmona et al., 2009). El HA es frecuentemente combinado con córtico-esteroides en inyección intraarticular. Esta práctica clínica está muy extendida y los estudios al respecto han mostrado efectos beneficiosos de esta combinación (Frisbie, 2016a), aunque un estudio reciente mostró que el efecto clínico a corto plazo de la combinación HA-triamcinolona fue inferior al mostrado por la administración de la triamcinolona sola (de Grauw et al., 2016).

Aunque su aplicación todavía no está extendida y no podría considerarse un tratamiento convencional, el uso de hidrogel de poliacrilamida (PAAG) está siendo investigado en el tratamiento de la OA en el caballo, mostrando efectos analgésicos hasta dos años después de la administración (Tnibar et al., 2015). Este producto se ha utilizado tradicionalmente para aumentar tejidos blandos, por ejemplo en cirugía plástica, siendo este efecto constante y estable por sus propiedades de intercambio de agua con el organismo. Además, el PAAG es capaz de sustentar la integración y el crecimiento celular *in vivo* (Christensen et al., 2008). Sus propiedades han despertado el interés en el estudio de su aplicación a patologías articulares. En un estudio histopatológico en el caballo, se observó proliferación e invasión de células sinoviales dentro del gel a los 14 días tras la administración intraarticular de PAAG, habiéndose formado una capa de revestimiento sinovial a los 30 días que perduró hasta 2 años después (Christensen et al., 2016). Se requieren más estudios para comprender los mecanismos de acción y las posibilidades del PAAG, pero su uso parece ser seguro y los efectos beneficiosos y prolongados vistos hasta ahora indican que puede ser una potencial herramienta terapéutica para la OA equina y de otras especies.

La administración intraarticular de GAGs polisulfatados (PSGAGs) parece tener un efecto inhibitorio de distintos mediadores proinflamatorios sobre el cartílago y la membrana sinovial. Su mecanismo de acción no está totalmente esclarecido, pero este producto ha mostrado beneficios clínicos en la OA equina y su uso está bastante establecido (Goodrich y Nixon, 2006).

Los bisfosfonatos (BPs) son fármacos que se han estudiado y utilizado en muchas patologías óseas en diversas especies, incluida el caballo, principalmente por sus propiedades anti-resortivas sobre el hueso. El tiludronato es el BP más estudiado en el caballo y su uso en el tratamiento del síndrome navicular está bastante extendido. Además, se ha atribuido a los BPs posibles efectos condroprotectores, antiinflamatorios y analgésicos, lo que ha sugerido su uso como terapia para la OA equina (Soto y Chiappe Barbará, 2014). El uso intraarticular de tiludronato como tratamiento del esparaván ha mostrado mejoría clínica (Gough et al., 2010), pero sus efectos sobre el cartílago todavía no están claros y ciertas concentraciones podrían ser condrotóxicas (Duesterdieck-Zellmer et al., 2014).

Existe además en el mercado una cantidad creciente de suplementos orales, cuyo uso se está popularizando cada vez más, que generalmente contienen componentes del cartílago como el condroitín sulfato o precursores de estos, como la glusocosamina. Pese a su

popularidad, su efectividad tratando o previniendo la OA todavía no se ha esclarecido (McIlwraith, 2013).

4.3.2. Abordaje quirúrgico

Como alternativa o de forma complementaria a los tratamientos farmacológicos, ante ciertas situaciones puede realizarse un manejo de la OA mediante cirugía.

La OA, si avanza indefinidamente, dará lugar a una destrucción completa del cartílago y la consiguiente anquilosis de la articulación. Mientras que esta evolución es indeseable en articulaciones de alta movilidad por la enorme limitación de funcionalidad que supondría para el animal, este proceso puede aplicarse como tratamiento en articulaciones poco móviles. La técnica para realizar una fijación permanente de la articulación se conoce como artrodesis y se ha usado con éxito en articulaciones como la interfalangiana proximal, intertarsiana distal o la carpo-metacarpiana (Lang et al., 2009; Herthel et al., 2016). La artrodesis quirúrgica consiste en el uso de fijaciones, como tornillos intra-articulares o placas de compresión dinámica (Herthel et al., 2016), la retirada del cartílago para estimular la osificación (Lang et al., 2009; Panizzi et al., 2011) o la realización de perforaciones en el mismo que creen trayectos osificados para limitar los escasos movimientos de rotación y deslizamiento de las articulaciones tarsales distales, en el caso del esparaván (Dechant et al., 2003) (Figura 16.A). Aunque el abordaje quirúrgico es el recomendado para realizar la artrodesis, cuando existen limitaciones económicas y dependiendo del tipo de articulación, puede recurrirse a una artrodesis química. Ésta consiste en la inyección intraarticular de sustancias altamente condrotóxicas, por lo que si se escoge realizar este abordaje es imprescindible tener en cuenta la comunicación entre articulaciones. Pueden emplearse distintos productos, incluidos algunos de los córtico-esteroides con efectos condrotóxicos mencionados en la sección de tratamiento médico de la OA, como la metilprednisolona, pero los resultados pueden ser variables (Zubrod y Schneider, 2005). El monoiodoacetato ha sido una de las sustancias utilizadas para este fin, especialmente en casos de esparaván (Dowling et al., 2004), pero los efectos adversos que puede causar, como necrosis en el sitio de inyección u OA de la intertarsiana proximal cuando se inyecta en las articulaciones distales del tarso (Dowling et al., 2004; Penraat et al., 2000), han hecho que su uso se haya visto sustituido por otros productos, como el alcohol etílico. La administración intraarticular de alcohol etílico para facilitar la anquilosis ha sido estudiada tanto en las articulaciones tarsales distales como en la IFP con buenos resultados (Carmalt et al., 2012). Además, el alcohol etílico no sólo destruye los condrocitos, sino que se cree que provoca neurolisis y destrucción de la inervación sensitiva de la membrana sinovial, cápsula articular y, quizá, hueso subcondral, por lo que se le atribuye un efecto de disminución del dolor asociado a la OA hasta que la anquilosis se consolida (Caston et al., 2013).

Como ya se ha comentado, los procedimientos anteriormente descritos se suelen reservar para articulaciones poco móviles. Sin embargo, para articulaciones muy móviles con OA se puede recurrir a otros abordajes quirúrgicos con un objetivo totalmente distinto, ya que en lugar de buscar la destrucción del cartílago y la anquilosis, se persigue estimular su reparación y la mejoría en la movilidad articular. Para ello pueden emplearse técnicas artroscópicas que se pueden clasificar en tres grupos: paliativas, reparativas y restaurativas. El método paliativo consiste en desbridar las zonas afectadas del cartílago para promover su

cicatrización (Mcllwraith, 2011; Cokelaere et al., 2016). Los tratamientos reparativos incluyen la artroplastia por abrasión o la microfractura (Figura 16.B). Su objetivo es comunicar espacio medular del hueso con el espacio articular, de forma que el sangrado producido lleve factores de crecimiento y células progenitoras hasta el cartílago lesionado (Frisbie et al., 2006; Hunziker et al., 2015). Con estas técnicas, el nuevo tejido producido es principalmente de tipo fibrocartilaginoso, con inferiores propiedades biomecánicas a las del original. Por ello, no suelen utilizarse forma aislada, sino que principalmente se estudia su uso en combinación con productos ortobiológicos con potencial regenerativo (Mcllwraith et al., 2011). Las técnicas restaurativas tienen como objetivo reemplazar el tejido lesionado y consisten en distintos procedimientos de trasplante, bien sea de tejido, como el injerto osteo-condral directo o mediante andamiajes, o de células, como el trasplante de condrocitos o de células progenitoras del cartílago (Cokelaere et al., 2016), como se comentará más adelante.

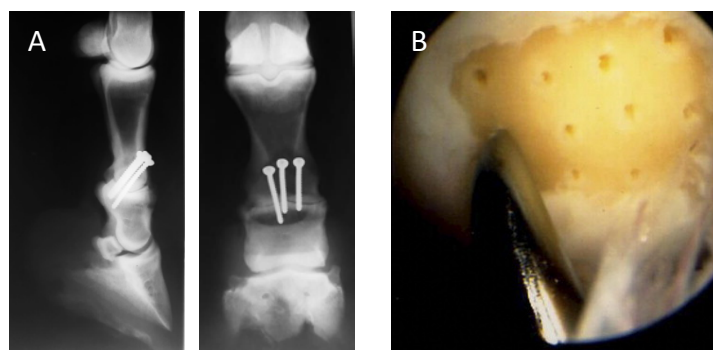


Figura 16: Imagen radiológica tras la realización de una artrodesis quirúrgica mediante tornillos en la articulación interfalángiana proximal en un paciente del HV-UZ (A). Imagen artroscópica tras realizar la técnica de microfractura en un defecto condral del cóndilo medial del fémur. Tomada de Mcllwraith et al. (2011) (B).

4.3.3. Terapias físicas

El uso de distintas modalidades de rehabilitación se está extendiendo en el manejo de la OA como estrategia complementaria para reducir el dolor y tratar de mantener la funcionalidad articular. Además de los habituales protocolos de rehabilitación que incluyen diversos grados de actividad física y distintos tipos de ejercicios, existen cada vez más opciones de terapias físicas. Algunos ejemplos son la crioterapia, la termoterapia, las ondas de choque extra-corporales (Figura 17), el láser de bajo nivel, los ultrasonidos terapéuticos, las distintas modalidades de hidroterapia o el uso de dispositivos y ejercicios para mejorar la propiocepción. Su uso en la clínica equina se está extendiendo cada vez más, incluso aunque no se conozcan exactamente los mecanismos de acción de algunos de ellos. Estos métodos parecen tener un potencial beneficioso para los pacientes, aunque todavía se sabe poco sobre las distintas variables a la hora de aplicarlos en cada situación, por lo que su uso apropiado requiere de la identificación previa del problema específico y de los objetivos de la rehabilitación: cada caso particular, la fase de la patología en que se encuentre y los objetivos a lograr durante la misma, requieren un protocolo de rehabilitación concreto (Porter, 2005; Haussler y King, 2016; Kaneps, 2016).



Figura 17: Aplicación de ondas de choque extra-corporales en un caso de osteoartritis de la articulación interfalángiana proximal en el HV-UZ.

4.3.4. Nuevas terapias en la osteoartritis equina

4.3.4.1. Terapia génica

El valor potencial de la terapia génica se basa en las limitaciones de los tratamientos convencionales, debidas en parte a la vida media relativamente corta de los agentes más utilizados, lo que requiere de administraciones intra-articulares sucesivas que podrían evitarse con este tipo de terapia (Frisbie y McIlwraith, 2001). Al igual que ciertas moléculas implicadas en la fisiopatología de la OA han sido estudiadas para su uso como biomarcadores, algunas de ellas también han sido objeto de investigación como dianas terapéuticas. Distintos candidatos para el tratamiento de la OA mediante terapia génica se han examinado utilizando vectores virales y no virales que contienen genes codificantes para distintas moléculas de interés como IGF-1, IL-1ra o TGF- β 1. Además, otros candidatos han incluido la proteína morfogenética ósea II y VII (BMP-2 y -7), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), mediadores anabólicos como IL-4, IL-1R o TNFR, o antagonistas catabólicos como SOD, Sox-5, -6, -9, SMAD y BCL-2 (Evans et al., 2004). En el caballo, se ha desarrollado y estudiado el IL-1ra como candidato para terapia génica en la OA, produciendo una reducción de la cojera y la efusión sinovial y mejorando la apariencia macroscópica, los hallazgos histopatológicos y las propiedades bioquímicas del cartílago, sin que se observaran efectos adversos a largo plazo (Frisbie et al., 2002). También se ha evaluado el uso de IGF-1 *in vitro* con resultados bastante prometedores (Hemphill et al., 2016), así como su seguridad y la liberación de la proteína *in vivo* en articulaciones sanas (Ortved et al., 2015). El uso de vectores humanos para BMP-2 y -6 en un modelo equino mostró buenos resultados, pero no fue capaz de proporcionar una regeneración apropiada a largo plazo (Menendez et al., 2011). La terapia génica es una potencial candidata para tratar la OA equina, aunque su desarrollo es complejo y son necesarios más estudios para clarificar distintos aspectos de la misma, como dosis, número de administraciones o duración del efecto terapéutico.

4.3.4.2. Productos ortobiológicos

Ortobiológico es un término utilizado para definir aquellas sustancias de origen biológico que ayudan a la curación de los tejidos del aparato locomotor, y que comprenden varios tipos de productos. El estudio y el uso de productos ortobiológicos para diferentes

patologías músculo-esqueléticas van en aumento en el caballo, en parte debido a su ya mencionado valor como modelo animal. La acción de este tipo de productos se basa en una rica composición en factores de crecimiento, o bien en la presencia de distintos tipos de células (Cruz, 2011).

En el caso de la articulación, los productos orto-biológicos no-celulares más frecuentemente utilizados son el suero autólogo condicionado y el plasma rico en plaquetas, por su contenido en factores de crecimiento.

El suero autólogo condicionado (ACS) se prepara a partir de sangre del propio paciente, que es incubada con unas esferas especiales de vidrio que estimulan a los leucocitos a liberar diversas citoquinas antiinflamatorias (Wehling et al., 2007), aunque se ha observado que la incubación simple de la sangre en tubos sin aditivos, sin utilizar el sistema de esferas, también incrementa el nivel de algunos de los mediadores, aunque de forma más modesta (Hraha et al., 2011). De las citoquinas producidas, la más conocida es el IL-1ra (por lo que a este producto también se le ha denominado IRAP), pero también se produce el incremento de muchos otros mediadores en el preparado, como IL-10, IGF, TGF- β , así como las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1 β (Rutgers et al., 2010). El estudio del ACS ha mostrado efectos beneficiosos en la patología articular equina y su uso clínico ha ido incrementando (Frisbie et al., 2007; Wehling et al., 2007), pero aún son necesarios más estudios controlados para comprender el funcionamiento y la efectividad del ACS.

El plasma rico en plaquetas (PRP) ha sido objeto de varios estudios sobre el tratamiento de problemas del aparato locomotor en el caballo, especialmente en tendones y ligamentos, y su uso en la práctica clínica está actualmente bastante extendido. El PRP se puede obtener mediante distintos métodos de centrifugación de la sangre del paciente, de forma que se obtenga un concentrado de las plaquetas, cuyos gránulos contienen diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), TGF- β o VEGF. La existencia de distintos métodos para obtener PRP, tanto comerciales como manuales, lleva asociada inevitablemente una variabilidad en sus características (Brossi et al., 2015). Un intento de estandarizar sus propiedades considera tres factores: la concentración de plaquetas, la presencia de activadores de las plaquetas, y el nivel de leucocitos en la preparación. Estos factores parecen influir en el potencial terapéutico del PRP, pero actualmente todavía no se han podido establecer unas recomendaciones específicas en cuanto a sus niveles (McCarrel et al., 2012). El uso intra-articular del PRP ha mostrado potencial terapéutico en lesiones degenerativas del cartílago en el caballo (Carmona et al., 2007; Chan et al., 2008), pero su uso no está tan extendido como en tejidos blandos y se requieren más estudios para clarificar sus efectos a nivel articular.

Las terapias orto-biológicas basadas productos celulares para la OA equina se caracterizan por su potencial regenerativo y comprenden principalmente el trasplante de condrocitos o de células progenitoras del cartílago y el uso de células madres mesenquimales. Como se ha mencionado al hablar de las modalidades restaurativas en los abordajes quirúrgicos de la OA, es posible realizar un trasplante de tejido o de células a la articulación afectada. Las células progenitoras del cartílago son una subpoblación de células pluripotentes con potencial condrogénico. A partir de un fragmento de cartílago del propio individuo, estas

células son aisladas y cultivadas antes de ser implantadas en el cartílago afectado mediante distintos sistemas de andamiaje. Su aplicación ha mostrado un importante potencial terapéutico (Frisbie et al., 2015) pero su uso es todavía limitado debido a su baja presencia en el cartílago y a la dificultad de su obtención (Jayasuriya y Chen, 2015). Otra variante de esta técnica es el aislamiento y cultivo de condrocitos adultos, presentes en mayor cantidad en el cartílago, que también ha demostrado un importante potencial como terapia para la OA (Cokelaere et al., 2016).

Las células madre mesenquimales (MSCs) y su aplicación en la OA serán abordadas en detalle en los siguientes apartados por su papel central en la presente Tesis Doctoral.

5. CÉLULAS MADRE

Las células madre son células indiferenciadas, presentes en distintos tejidos y durante distintas fases del desarrollo, con capacidad para diferenciarse a otros tipos celulares. Dada la complejidad de estas células, existen diversas formas de clasificarlas en función de sus distintas propiedades. Las clasificaciones más comunes son las que se refieren a su potencial de diferenciación y a su origen (Bongso y Eng, 2011) (Figura 18). Atendiendo a su potencial de diferenciación, podemos clasificar a las células madre en:

- Totipotentes: tienen potencial para dar lugar a un organismo vivo completo.
- Pluripotentes: pueden diferenciarse a tipos celulares de cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo.
- Multipotentes: son capaces de diferenciarse a distintos tipos de células especializadas presentes en un tejido u órgano
- Unipotentes: pueden diferenciarse a un solo tipo celular especializado.

Como se puede deducir de esta clasificación, la capacidad de diferenciación de las células madre va a depender de donde se encuentren, es decir, de su origen:

- Células madre embrionarias: son las células encontradas en las primeras fases del embrión. Se trata de células madre totipotentes por ser capaces de dar lugar a un organismo completo (Bongso y Eng, 2011).
- Células germinales embrionarias: son las células germinales primordiales, que existen sólo de forma transitoria en el embrión antes de asociarse con las células somáticas gonadales para dar lugar a las células germinales. Estas células son de tipo pluripotente (Shamblott et al., 1998).
- Células madre fetales: son tipos celulares primitivos que se encuentran en los órganos fetales. Algunos ejemplos son las células madre de la cresta neural (en el cerebro fetal), las células madre hematopoyéticas fetales (en sangre fetal, placenta y cordón umbilical) y los progenitores de las isletas pancreáticas (Beattie et al., 1997; Villa et al., 2000).
- Células madre del cordón umbilical: la sangre del cordón umbilical contiene células madre cuyas características parecen diferir de las halladas en médula ósea y sangre del individuo adulto, mostrando mayor capacidad de proliferación y de inmunorregulación. Son células de tipo multipotente pero pueden dar lugar a algunos tipos celulares de otras capas germinales. En el cordón umbilical también existen otras células madre, tanto en la sangre

como presentes en la matriz del mismo, que se conoce como gelatina de Wharton. Se trata de células madre mesenquimales (MSCs), pero algunas de sus propiedades difieren de las MSCs presentes en los tejidos adultos (Mitchell et al., 2003).

- Células madre adultas: se encuentran en diversos tejidos del individuo adulto y poseen diferente potencial de diferenciación, pudiendo ser multipotentes o unipotentes, y existiendo varios tipos. Las células madre mesenquimales (MSCs) son el objetivo de la presente Tesis Doctoral y por tanto serán vistas con más detalle en el siguiente apartado. Las células madre hematopoyéticas están presentes principalmente en la médula ósea y son multipotentes, encargándose de producir y mantener a las células madre sanguíneas, que se diferenciarán a las distintas células de la sangre (Eaves, 2015). También existen células madre adultas hepáticas (Alison et al., 2004), pancreáticas (Zulewski et al., 2001), epidérmicas (Blanpain et al., 2004), neuronales (De Filippis y Binda, 2012), oculares (Dhamodaran et al., 2014), del sistema gastrointestinal (Li y Jasper, 2016), del hueso o del cartílago (Akiyama et al., 2005). Su papel principal es reponer las células de los distintos tejidos durante la vida del individuo. Algunos de estos tipos celulares son multipotentes y otros, como las del hueso y el cartílago, se consideran células progenitoras: participan en los procesos de reparación del tejido en el que residen, pero su capacidad para diferenciarse es limitada (Metsaranta et al., 1996).
- Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs): Aunque estas células no son una población presente de forma natural en el organismo, merecen ser citadas en este apartado. Hace pocos años se descubrió que las células adultas ya diferenciadas, como los fibroblastos de la piel, pueden ser reprogramadas a un estado embrionario en el que son pluripotentes mediante la introducción de los factores Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, mostrando estas células las características fenotípicas de las células madre embrionarias (Takahashi y Yamanaka, 2006). Su descubrimiento ha supuesto un gran avance y, aunque su uso terapéutico todavía es controvertido por la posibilidad de formación de teratomas, su utilidad como modelo para ciertas enfermedades y para testar fármacos es de gran importancia (Avior et al., 2016).

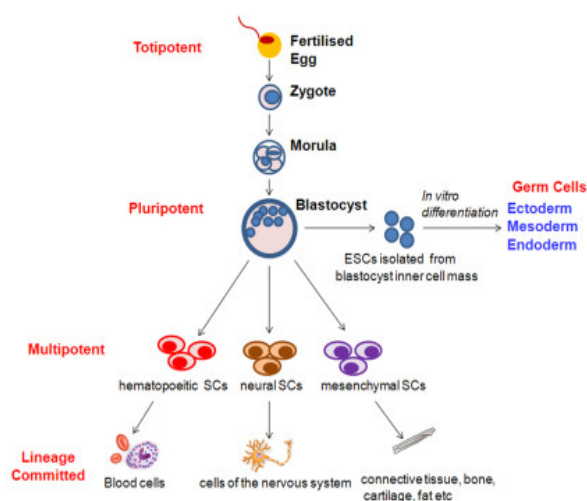


Figura 18: Representación esquemática de la jerarquía de las células madre según su capacidad de diferenciación y su origen. Tomado de Hayes et al., (2012).

5.1. Células madre mesenquimales

Como se ha descrito anteriormente, uno de los objetivos para el tratamiento óptimo de la OA actualmente inalcanzable es el de promover la regeneración de las estructuras afectadas, principalmente el cartílago, obteniendo un tejido que no sea de tipo cicatricial sino que tenga las propiedades del tejido original. Aunque, como se ha comentado, existen distintos productos biológicos considerados con potencial regenerativo, son las células madre mesenquimales (MSCs) las que más interés despiertan por sus múltiples propiedades.

Las MSCs fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1970, siendo originalmente denominadas como unidades formadoras de colonias con morfología fibroblástica (CFU-F) por sus propiedades observadas *in vitro* (Friedenstein et al., 1970). Desde entonces, su estudio ha ido en aumento y se han observado en ellas distintas propiedades capaces de conferirles potencial terapéutico y regenerativo. Aunque en la presente Tesis Doctoral el estudio de las MSCs se centra en el tratamiento de patologías articulares en el caballo, como paciente y como modelo animal, son muchas las enfermedades en las que se estudia su uso a día de hoy. Como ejemplo, existen en la actualidad 688 ensayos clínicos en distintas fases de ejecución que utilizan MSCs aplicadas a diversas patologías (U.S.N.I.H, 2017).

Las MSCs pueden encontrarse en una gran variedad de tejidos del individuo, como médula ósea, tejido adiposo, músculo, periostio (Radtke et al., 2013), sangre periférica (Li et al., 2015b), corazón (Zhang et al., 2015b), pulmón (Gong et al., 2014), riñón (Jiang et al., 2015), cerebro (Lojewski et al., 2015), timo (Wang et al., 2015), páncreas (Lee y Jeong, 2016), piel (Li et al., 2015a), tejidos dentales (Mensing et al., 2011; Tang et al., 2011), tendón (Rui et al., 2010), membrana sinovial y líquido sinovial (de Sousa et al., 2014), entre otros. De hecho, y por su gran capacidad de migración, se considera que las MSCs están presentes en prácticamente todo el organismo, encontrándose en los nichos perivasculares, listas para salir al torrente sanguíneo y desplazarse a donde sean necesarias (da Silva Meirelles et al., 2006). Además, también pueden encontrarse MSCs en algunos tejidos neonatales y asociados al nacimiento, como las anteriormente mencionadas sangre y gelatina de Wharton del cordón umbilical, el líquido amniótico o la placenta.

Aunque las MSCs estén presentes en una gran variedad de tejidos, no todos ellos son apropiados para su aislamiento con fines terapéuticos, teniendo que seleccionarse los menos invasivos. En la actualidad, las MSCs más frecuentemente estudiadas por su fácil acceso son las derivadas de médula ósea (BM-MSCs) y grasa (AT-MSCs), con un creciente interés en las derivadas de tejidos neonatales por su obtención no invasiva, su mayor potencial de proliferación y su baja inmunogenicidad, lo que las hace atractivas sobre todo de cara a su uso alogénico (De Schauwer et al., 2014; Li et al., 2015c). Las BM-MSCs han sido las mayoritariamente empleadas para su estudio aplicativo a patologías músculo-esqueléticas tanto en medicina humana (Mafi et al., 2011) como equina, mostrando en esta especie un mayor potencial terapéutico que las AT-MSCs (Schnabel et al., 2013). El incremento cada vez mayor en el número de fuentes alternativas de MSCs, como las de tejidos neonatales, y el mayor conocimiento sobre los potenciales mecanismos de acción terapéuticos de las MSCs podrían cambiar esta tendencia hacia el uso de otros orígenes.

Esta gran variedad de distribuciones de las MSCs refleja que en realidad no se trata de un único tipo celular, sino que son una población heterogénea, lo que ha convertido en un desafío el caracterizarlas por completo.

5.1.1. Caracterización de las células madre mesenquimales

En un intento por estandarizar el estudio de las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso los requisitos que las células deben cumplir para ser consideradas como MSCs (Dominici et al., 2006):

1. Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo
2. Expresión de ciertos marcadores de superficie (inmunofenotipo):
 - Positivos: más de un 95% de las células deben mostrar en su superficie las moléculas CD105 (endoglina), CD73 (SH2 y SH3) y CD90 (Thy-1).
 - Negativos: debe haber menos de un 2% de células positivas para CD45 (marcador de leucocitos y células endoteliales), CD34 (marcador hematopoyético), CD14 o CD11b y CD79 α o CD19 o HLA-DR (complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, MHC-II).
3. Multipotencia: capacidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito.

Aunque estos criterios han sido de gran ayuda para estandarizar el estudio de las MSCs, se ha visto que éstas pueden diferir en sus características según cual sea el tejido de origen. Además, estos criterios se definieron para la especie humana, pero el uso de modelos animales y la potencial aplicación terapéutica a los mismos ha hecho que también sea necesaria la caracterización de las MSCs en otras especies, arrojando aún más variabilidad. Por ello, es importante el estudio del inmunofenotipo y de la multipotencia de las MSCs de los distintos orígenes y de las distintas especies, con el fin de estandarizar lo máximo posible las terapias celulares. Además, a la hora de elegir las MSCs más apropiadas para un fin, también deberá tenerse en cuenta el estudio de otras de sus propiedades, como el potencial de proliferación, la eficiencia de diferenciación a un linaje concreto, la capacidad de inmunosupresión o la potencial inmunogenicidad.

5.1.1.1. Inmunofenotipo

En el caso del caballo, la falta de anticuerpos con reactividad específica para algunas de las moléculas de superficie descritas en las MSCs humanas ha dificultado su caracterización (Ranera et al., 2011). Afortunadamente, cada vez es posible encontrar más anticuerpos comerciales que muestren reactividad con la especie equina, facilitando esta tarea (Ranera y Barry, 2014).

En un estudio comparativo del inmunofenotipo de MSCs equinas derivadas de médula ósea (BM-MSCs), tejido adiposo (AT-MSCs), tendón, y sangre y tejido del cordón umbilical (UCB-MSCs y UCT-MSCs), se encontró variación en su patrón de expresión entre los distintos orígenes e individuos, sobre todo para CD90 y CD105. Las MSCs de todos los orígenes fueron robustamente positivas para CD29 y CD44 y negativas para CD14, CD34, CD45, CD79 α y MHC-II, y la mayoría además también lo fue para CD73 (Paebst et al., 2014). En otro estudio

comparando BM- y AT-MSCs equinas, las células de ambos orígenes mostraron un patrón similar por citometría de flujo y PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), pero las AT-MSCs mostraron una marcada expresión génica de CD34 mientras que las BM-MSCs no lo hicieron, sugiriendo que esta molécula podría ser un marcador clave a la hora de diferenciar las MSCs de ambos orígenes (Ranera et al., 2011).

Parte de las diferencias encontradas entre estudios comparativos de MSCs procedentes de distintos orígenes se atribuyen a distintas metodologías en la obtención, aislamiento y cultivo de las células, otorgando además un efecto importante sobre la expresión de las moléculas de superficie a la digestión enzimática de los tejidos utilizada para aislar las células (Paebst et al., 2014). Esto pone en relieve la importancia de estandarizar los métodos de procesamiento de las MSCs, pero continúa dejando una clara evidencia de que existe una variabilidad considerablemente alta en el inmunofenotipo de las MSCs equinas entre distintos orígenes e incluso entre distintos individuos, remarcando así que la caracterización de estas células debe seguir siendo investigada.

5.1.1.2. Multipotencia

Las MSCs deben poseer la capacidad para diferenciarse a linajes celulares mesenquimales cuando son sometidas al estímulo apropiado. Además de los tipos celulares ya citados (osteoblasto, condroblasto, adipocito), las MSCs han mostrado capacidad para diferenciarse a tenocitos (Gomiero et al., 2016), miocitos del músculo esquelético (Gang et al., 2004) y otras células del mesodermo visceral (Kim y Cho, 2013). Algunos estudios han mostrado que las MSCs son además capaces de dar lugar *in vitro* a linajes celulares de las otras capas, como hepatocitos (Aurich et al., 2009), cardiomiocitos (Toma et al., 2002) o neuronas (Cruz Villagran et al., 2014) (Figura 19). Se desconoce el papel biológico de la diferenciación a estos tipos celulares, y puesto que esta propiedad sólo se ha observado para ciertos linajes de otras capas, las MSCs se siguen considerando multipotentes.

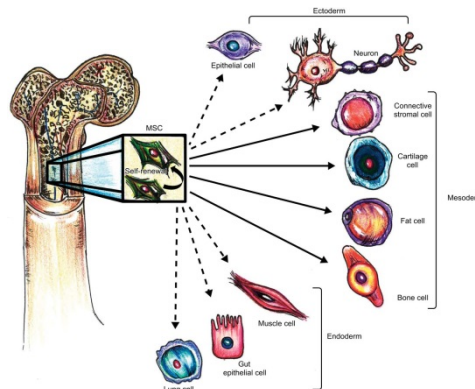


Figura 19: Representación esquemática del potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs). Además de su capacidad para diferenciarse a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, las MSCs son capaces de dar lugar a células de linajes derivados de otras capas embrionarias. Tomado de Golpanian et al., (2016).

La capacidad de diferenciación tri-linaje ha sido confirmada en las MSCs equinas derivadas de distintos tejidos. Aunque en general las MSCs de todos los orígenes presentan esta cualidad, no todas la muestran con la misma consistencia para todos los linajes (Ranera et

al., 2011; Ranera et al., 2012; Burk et al., 2013; Barberini et al., 2014). El potencial de diferenciación de las MSCs ha promovido el estudio de su aplicación a distintas patologías, como las de aparato locomotor, bajo la premisa de que las MSCs se diferenciarán a células del tejido diana afectado y se integrarán en el mismo. De esta forma, serían capaces de regenerar de forma verdadera la lesión al dar lugar a un tejido de características muy similares a las del original, y no a un tejido cicatricial de pobres propiedades biomecánicas (Prockop, 1998; Ohgushi y Caplan, 1999).

5.1.2. Mecanismos de acción terapéuticos de las células madre mesenquimales

A medida que la investigación sobre las MSCs ha ido avanzando, se ha comprobado que solo un bajo porcentaje de éstas son capaces de integrarse en el tejido y diferenciarse, lo cual no bastaría para justificar los efectos beneficiosos observados (Prockop, 2007). Aunque el potencial de diferenciación de estas células sigue considerándose implicado en su mecanismo terapéutico, se ha demostrado que las MSCs tienen además otras propiedades responsables de sus efectos beneficiosos, sin limitarse únicamente a reemplazar a las células del tejido dañado y producir matriz extracelular. Estos mecanismos son principalmente paracrinós y se basan en la secreción por parte de las MSCs de diversas moléculas con funciones reguladoras, lo que además ha abierto las puertas al estudio de la aplicación de estas células en un número creciente de patologías (da Silva Meirelles et al., 2009).

5.1.2.1. Capacidad de migración, integración y diferenciación

Las MSCs son capaces de migrar hacia los tejidos dañados cuando son administradas de forma sistémica. Esta propiedad se atribuye a la expresión de distintos factores de crecimiento, quimioquinas y receptores de la matriz extracelular en la superficie celular. La migración de las MSCs mediante quimioquinas es estimulada por la citoquina proinflamatoria TNF α , lo que sugiere que las MSCs pueden ser dirigidas hacia los lugares de inflamación. Además, las MSCs son capaces de adherirse al endotelio. Las células endoteliales son activadas en situación de daño tisular, expresando la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1 o CD106) y la E-selectina, entre otras, para las cuales las MSCs expresan los ligandos CD29 y CD44, respectivamente. De esta forma, las MSCs pueden unirse a las células endoteliales activadas para pasar del torrente sanguíneo al tejido dañado. Estos ligandos de las MSCs también pueden unirse a componentes de la matriz extracelular como la osteopontina y el HA expresados por los tejidos dañados, por lo que se consideran claves en la migración y anidamiento en el tejido de las MSCs (Ruster et al., 2006; Ponte et al., 2007).

La capacidad de diferenciación de las MSCs se estudia *in vitro* de forma habitual, mediante el uso de distintos medios de cultivo suplementados con ciertas moléculas y factores de crecimiento que inducen el proceso de diferenciación. Pese a que esta propiedad está bien documentada *in vitro* y sugiere un potencial terapéutico de estas células, es complicado evaluar esta capacidad *in vivo*. De hecho, una cuestión todavía sin elucidar por completo es la supervivencia de las MSCs cuando son administradas *in vivo*, es decir, por cuanto tiempo son capaces de permanecer en un estado funcional en el lugar de la lesión. Este es un aspecto clave en la terapia con MSCs, ya que la supervivencia de las mismas puede ser una potencial limitación de su capacidad terapéutica (Ankrum et al., 2014).

En diversos modelos animales se ha observado que las células permanecen en el sitio de inyección cuando son administradas localmente de 2 a 4 semanas, mientras que la administración sistémica (intravenosa) conduce a un importante secuestro de las células en el pulmón dentro de las horas siguientes a la administración, pero los efectos sistémicos pueden ser observados durante semanas (Lee et al., 2009; Consentius et al., 2015). En caballos con tendinopatía natural, el marcaje de las MSCs ha mostrado que tras la administración intravenosa la mayoría de MSCs son retenidas en el pulmón, sin que llegue un número significativo a los tendones lesionados. Por otra parte, tras la administración intralesional las MSCs fueron retenidas en la lesión tendinosa, pero 24h después sólo un 24% de éstas continuaban en el tendón (Becerra et al., 2013). En otro estudio en que también se administraron MSCs en un modelo equino de tendinopatía, éstas no migraron a otras localizaciones pero mostraron menos de un 5% de supervivencia en la zona de la inyección a los 10 días y su número continuó decreciendo (Guest et al., 2010). En el caso de la articulación, parece ser que las MSCs son capaces de integrarse en tejidos como el menisco o la membrana sinovial, pero no en el cartílago (Murphy et al., 2003), aunque otros estudios en modelo equino mostraron anidamiento de las MSCs en el cartílago hasta 6 meses después de su administración (Mokbel et al., 2011).

En resumen, los estudios sugieren que la administración sistémica conlleva que sólo un bajo porcentaje de MSCs lleguen a la lesión y además va asociada a una vida media corta de las células. Por otra parte, parece que la administración intra-lesional y, en concreto en los tejidos del sistema músculo-esquelético, permite una retención en la lesión y una supervivencia más prolongadas (Kurtz, 2008). Diferentes estrategias han sido estudiadas para facilitar la integración de las MSCs en la lesión, como embeberlas en distintos geles y andamiajes (Steinert et al., 2012). Sin embargo, queda pendiente de resolver si estas estrategias podrían limitar la viabilidad y las propiedades reguladoras de las MSCs (Colbath et al., 2017b). La capacidad de integración y diferenciación de las MSCs en las estructuras articulares, así como la supervivencia en las mismas, todavía plantean varias preguntas. Se sigue considerando que este mecanismo juega un papel en la acción terapéutica de las MSCs en las patologías articulares, pero la tendencia actual está atribuyendo sus efectos beneficiosos principalmente a los mecanismos paracrinos de estas células (Barry y Murphy, 2013).

5.1.2.2. Acción paracrina: secreción de mediadores

Como se ha comentado anteriormente, las MSCs son capaces de secretar una gran variedad de mediadores que van a participar en la regulación de distintos procesos. Los efectos derivados de esta actividad paracrina pueden dividirse en tróficos, anti-fibróticos, de quimioatracción e inmunomoduladores. Dentro de los efectos tróficos, pueden diferenciarse mecanismos anti-apoptóticos, de soporte (estimulación de los propios mecanismos de reparación del tejido) y angiogénicos (da Silva Meirelles et al., 2009) (Figura 20).

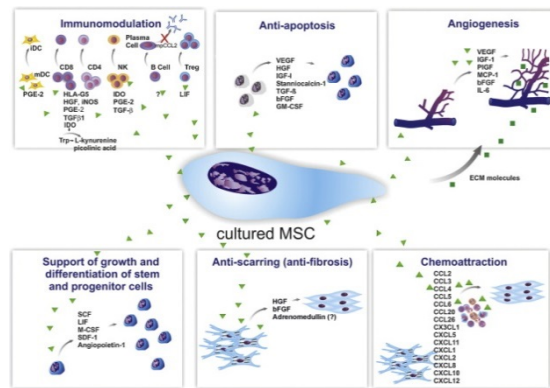


Figura 20: Representación esquemática de las diferentes acciones que pueden ejercer las células madre mesenquimales (MSCs) mediante la secreción paracrina de diversas moléculas. Tomado de da Silva Meirelles et al., (2006).

5.1.2.2.1. Efectos tróficos

Las MSCs secretan moléculas capaces de limitar la apoptosis de otros tipos celulares sometidos a diferentes condiciones de daño, lo que se traduciría terapéuticamente en un efecto anti-apoptótico, reduciendo la muerte celular en el tejido dañado. Algunas de las moléculas implicadas en este mecanismo son el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), VEGF e IGF-1, encargados de mejorar el crecimiento y la supervivencia de las células endoteliales. Otras moléculas implicadas son el TGF- β , el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Se ha descrito que la expresión de estos factores por parte de las MSCs aumenta en situación de hipoxia, como la que tendría lugar en los primeros momentos del daño tisular. Estos hallazgos sugieren que las MSCs podrían actuar limitando el daño en la fase más inicial de la lesión (Rehman et al., 2004).

En situación de daño tisular, las MSCs son capaces además de reclutar y mantener a precursores de las células del tejido dañado, presentes en el mismo, mediante la secreción de factores solubles como el stem cell factor (SCF), LIF, IL-6, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor derivado del estroma 1 (SDF-1 o CXCL12) (Sugiyama et al., 2006).

Por otra parte, reestablecer el riego sanguíneo al tejido dañado es fundamental para su recuperación. Las MSCs desarrollan también acciones pro-angiogénicas, implicando a factores como bFGF, VEGF, el factor de crecimiento placentario (PIGF) o la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Kinnaird et al., 2004). Los factores anti-apoptóticos mencionados anteriormente también participan en este mecanismo, al limitar la muerte de las células endoteliales expuestas a hipoxia (Rehman et al., 2004). Las MSCs, además de los mediadores pro-angiogénicos y anti-apoptóticos, aportan componentes de la matriz extracelular que sirven como sustrato para las células endoteliales en los nuevos vasos (Sorrell et al., 2009).

5.1.2.2.2. Efecto anti-fibrótico (anti-cicatricial)

Uno de los problemas que presentan diferentes tejidos, como los del sistema locomotor, es que el proceso de reparación iniciado tras la lesión va a conducir a la formación de un tejido cicatricial de características inferiores a las del original. Las MSCs son capaces de promover efectos anti-fibróticos, pero los mecanismos moleculares implicados en este proceso no se conocen totalmente. En un modelo murino de daño por isquemia/reperfusión del tejido adiposo, se ha visto que las MSCs pueden contribuir a evitar la fibrosis exagerada del tejido mediante la secreción de los factores bFGF y HGF (Suga et al., 2009). Esta propiedad además explicaría los mejores resultados obtenidos cuando las MSCs se administran de forma temprana, antes de que la fibrosis del tejido sea excesiva (da Silva Meirelles et al., 2009).

5.1.2.2.3. Quimioatracción

La gran variedad de moléculas quimioatrayentes que son secretadas por las MSCs incluye, entre otras: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3a), CCL26 (eotaxin-3), CX3CL1 (fractalquina), CXCL5 (ENA-78), CXCL11 (i-TAC), CXCL1 (GRO α), CXCL12 (SDF-1), CXCL8 (IL-8), CXCL2 (GRO β) y CXCL10. Las células diana de estas moléculas son los monocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T y B, células natural killer (NK), células dendríticas y progenitores hematopoyéticos y endoteliales, que van a ser atraídos al lugar de la lesión para ejercer sus correspondientes funciones. Algunas investigaciones plantean que el patrón de expresión de estas moléculas se ve influenciado por la exposición de las MSCs a otros tipos celulares, sobre todo de tipo inmune (da Silva Meirelles et al., 2009).

Las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs, por constituir un tema central de la presente Tesis Doctoral, serán abordadas en detalle en la siguiente sección.

6. PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Una de las características atribuidas a las MSCs que está adquiriendo especial relevancia en la investigación actual es su potente capacidad inmunosupresora, demostrada por la inhibición de la proliferación de los linfocitos T activados y de la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los mismos (Aggarwal y Pittenger, 2005). Además, las MSCs son capaces de inhibir la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B y su proliferación (Corcione et al., 2006), así como la maduración, activación y presentación antigénica por parte de las células dendríticas (DCs) (English et al., 2008). También pueden regular las funciones de las células T reguladoras (T reg) y el balance Th1/Th2 de las células T efectoras (Th) (Aggarwal y Pittenger, 2005). Las MSCs son capaces de inhibir la activación de las células *natural killer* (NK) mediada por IL-2 (Spaggiari et al., 2006) y de modular las funciones de los macrófagos (Abumaree et al., 2013). Aunque se considera que estos efectos son ejercidos principalmente mediante mecanismos paracrinós, también se ha visto que la participación de mecanismos de contacto directo célula-célula es fundamental (English et al., 2010; Gao et al., 2016; Uccelli et al., 2008).

Estos efectos han sido primero observados *in vitro*, pero está creciendo el número de estudios que los trasladan también a modelos experimentales *in vivo*. Como se ha comentado anteriormente, esto confiere a las MSCs un gran potencial para el tratamiento de patologías en las que el sistema inmune y la inflamación tienen un papel central. A modo de ejemplo, las MSCs han mostrado ser efectivas en modelos experimentales de rinitis alérgica (Cho et al., 2009), asma (Bonfield et al., 2010), colitis (Zhang et al., 2009a), enteropatía autoinmune (Parekkadan et al., 2008), trombocitopenia inmune (Xiao et al., 2012), encefalomiелitis autoinmune (Liu et al., 2009), lupus sistémico eritematoso (Chang et al., 2011) o la enfermedad de “injerto contra huésped” (*Graft versus Host Disease*, GvHD) (Baron et al., 2010), entre otros. La artritis reumatoide humana, de carácter inmunomediado, también ha sido una patología objeto de estudio para la aplicación de terapia celular basada en MSCs, con resultados prometedores (El-Jawhari et al., 2014). Como ya se ha abordado en el apartado sobre la fisiopatología de la OA, en esta enfermedad se presenta un complejo ambiente de desequilibrio anabólico y catabólico en el que la inflamación tiene un papel central. Por ello, las propiedades reguladoras y antiinflamatorias de las MSCs conforman una potencial herramienta terapéutica (Barry y Murphy, 2013), lo que además explicaría los efectos beneficiosos observados en el cartílago osteoartístico pese a la baja capacidad que parecen tener las MSCs para implantarse en el mismo (Murphy et al., 2003). Para comprender las posibilidades terapéuticas que brindan las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs, es necesario estudiar los mecanismos por los cuales tienen lugar.

Dada la enorme complejidad de las interacciones entre las MSCs y las diferentes células inmunes, que a día de hoy todavía presentan varias cuestiones pendientes de resolución, y con el objetivo de clarificar las acciones que sí se conocen, se realizará en primer lugar una revisión de las principales células inmunes sobre las cuales las MSCs ejercen sus funciones. Este apartado también tiene como finalidad clarificar cuestiones relacionadas con la inmunogenicidad y su implicación en el uso alogénico de las MSCs, temas que serán abordados más adelante.

6.1. Aspectos fundamentales de la respuesta inmune

El sistema inmune consta de dos líneas defensivas principales: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata se caracteriza por que no requiere un reconocimiento específico del antígeno, por lo que es rápida, inespecífica, y no genera “memoria” en el sistema inmune del individuo. Además de ser la primera línea de defensa, el sistema inmune innato es también el encargado de activar al sistema inmune adaptativo mediante la presentación de antígenos. La inmunidad adaptativa sí requiere de un reconocimiento previo y específico del antígeno y sí es capaz de “memorizar” dicho antígeno para detectarlo de forma más rápida y eficaz cuando el individuo se vea expuesto a él de nuevo. La respuesta inmune adaptativa puede ser celular, cuando es mediada por células (linfocitos T y B) y humoral, cuando es mediada por anticuerpos. Todos estos mecanismos no son independientes sino complementarios (Warrington et al., 2011).

Antes de pasar a revisar aquellas células inmunes para las que se han observado interacciones relevantes con las MSCs, se comentará brevemente la participación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la respuesta inmunitaria. El MHC, además de ser

crucial para entender tanto la respuesta innata como la adaptativa, facilitará la posterior comprensión de los aspectos relacionados con la inmunogenicidad de las MSCs.

6.1.1. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

Las moléculas del MHC tienen un papel fundamental en el reconocimiento y diferenciación entre lo “propio” y lo “ajeno”. Existen dos tipos de MHC, el tipo I y el tipo II. En la especie humana, el MHC se conoce como HLA por las siglas en inglés de *human leukocyte antigen*, correspondiendo el MHC-I al sistema HLA-A, -B y -C, y el MHC-II al HLA-DP, -DQ y -DR. El MHC-I es expresado por todas las células nucleadas del organismo y su función es portar proteínas endógenas sintetizadas por la célula. Estas proteínas pueden ser componentes propios de la célula o bien, por ejemplo, partículas víricas que la célula está sintetizando por que ha sido infectada por un virus. Así, los MHC-I llevan un “muestrario” de lo que la célula está sintetizando, sea propio o ajeno. El MHC-I es reconocido por las células T CD8+ (citotóxicas), que son capaces de detectar si lo mostrado es propio o extraño, ya que durante su proceso de maduración han sido expuestas a distintos componentes endógenos. Si la proteína mostrada por MHC-I no es propia del organismo, las células T citotóxicas desencadenarán la destrucción de la célula portadora. El MHC-II sólo es expresado por las células presentadoras de antígeno (CPA), que muestran en su MHC-II antígenos extraños que han captado del medio y externalizado, y su función va a ser presentarlos de forma específica a las células T para activarlas y que intervengan en la respuesta inmune (Trowsdale y Knight, 2013).

La activación de las células T, además del complejo MHC-antígeno presentado por las CPAs, requiere de una segunda señal en la que interaccionan otras moléculas, conocidas como co-estimuladoras. Las moléculas co-estimuladoras están presentes en la superficie de las CPAs y se unen a receptores específicos de las células T. La vía de co-estimulación más conocida es en la que interactúan los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) de las CPAs con el receptor CD28 de las células T (Sharpe y Abbas, 2006). Otra vía de co-estimulación es la del receptor CD40 con el ligando CD40L. CD40 es expresado por las CPAs y su ligando se expresa de forma transitoria en las células T en condiciones inflamatorias. Tanto CD40 como CD40L pueden además ser expresados por otras células no inmunes en determinadas situaciones (Elgueta et al., 2009).

6.1.2. Células *natural killer* (NK)

Los linfocitos *natural killer* (células NK) son capaces de ejercer su citotoxicidad frente a células infectadas o tumorales sin necesitar activación previa, como la requieren las células T citotóxicas, por lo que se consideran parte de la inmunidad innata y su nombre procede de su capacidad innata (natural) para destruir estas células. Para ejercer su citotoxicidad, las células NK necesitan reconocer a la célula objetivo. Para ello, poseen receptores tanto inhibidores como activadores. A los receptores activadores (*toll like receptors*, TLRs) se unen ligandos expresados por las células en distrés, como aquellas infectadas por un virus. Esta unión, además, induce la producción de interferón gamma (IFN γ) por parte de las células NK, lo que aumenta más su citotoxicidad. Los receptores inhibidores de las células NK se unen a ligandos propios de las células del organismo, de forma que al reconocer a la célula como propia, la activación de este receptor inhibe el mecanismo citotóxico. El principal ligando para estos

receptores es el MHC-I. La ausencia de expresión de MHC-I es típica de las células en distrés, y la falta de activación de la inhibición puede desencadenar la citotoxicidad. El equilibrio entre la activación de receptores activadores e inhibidores determinará la respuesta de las células NK frente a una célula diana. Además de su función citotóxica, las células NK también son capaces de producir diversas citoquinas, principalmente IFN γ , cuando son activadas por otras moléculas como IL-2, IL-12, IL-15 o IL-18. Estas células también tienen un papel regulador y son capaces de influir sobre las funciones de otras células inmunes como las DCs, las células T o las células B (Vivier et al., 2008).

6.1.3. Macrófagos

La función principal de los macrófagos es la fagocitosis, participando en la inmunidad innata, pero también forman parte de la conexión entre inmunidad innata y adaptativa al poder funcionar como CPAs. En cada tejido hay macrófagos residentes como primera línea de defensa, pero éstos también son reclutados desde la sangre durante la inflamación en su forma inmadura, los monocitos. Los macrófagos derivados de los monocitos llegan más tarde al lugar de la inflamación y tienen una actividad predominantemente proinflamatoria, encargándose de eliminar los microorganismos que quedan y los restos de la apoptosis de los neutrófilos, primeras células fagocíticas en acudir. Estos macrófagos se dice que tienen una activación clásica o M1. Tras la fase de destrucción tisular sigue una fase de reparación en la que predominan los fenómenos antiinflamatorios. En esta fase, los macrófagos van a producir poliaminas y prolina a partir de la arginina, moléculas necesarias para la síntesis del fibrinógeno y de otras fibras de la matriz extracelular. Este tipo de activación se denomina alternativa o M2. El balance entre ambas actividades, M1 y M2, pro- y antiinflamatoria, es crítico: el exceso de M1 puede dar lugar a una inflamación crónica mientras que el exceso de M2 puede producir una fibrosis excesiva del tejido (Martinez y Gordon, 2014).

6.1.4. Células dendríticas

Como se ha indicado al hablar del MHC, las células CPAs son cruciales para la activación de los linfocitos T. Distintos tipos celulares ejercen la función de CPAs, como los macrófagos ya mencionados y las células B que se verán a continuación, siendo las DCs las principales CPA por presentar una mayor capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos del medio. La característica principal de estas células, como ya se ha mencionado, es que poseen MHC-II, mediante el cual son capaces de presentar antígenos extraños específicos a las células T para desencadenar su activación. Se considera que las DCs tienen un papel fundamental en el equilibrio entre células T citotóxicas y efectoras y como mediadores de la tolerancia inmunitaria (Liu y Nussenzweig, 2010).

6.1.5. Células T

Estas células expresan un tipo único de receptor para antígeno (TCR, *T-cell receptor*) y requieren de la activación por parte de las CPAs para reconocer de forma específica un antígeno. El complejo MHC-antígeno de la CPA activa el TCR de las células T y, en respuesta, estas secretan citoquinas que controlarán la respuesta inmune. Una vez activadas, las células T puede diferenciarse a células T citotóxicas CD8+ o efectoras (*helper*, Th) CD4+.

Las células T citotóxicas reconocen a las células infectadas con el antígeno que les han presentado las CPAs al mostrarlo en su MHC-I y las destruyen mediante lisis. Además, se expanden formando clones específicos para el antígeno detectado, de forma que, al final del proceso, algunas de estas células permanecen como células de memoria para proporcionar una respuesta más rápida en caso de re-exposición al antígeno, contribuyendo así a la respuesta adaptativa.

Las células Th no tienen acción citotóxica ni fagocítica, ni son capaces de eliminar células infectadas o patógenos: su función es la de mediar la respuesta inmune dirigiendo a otras células mediante la secreción de distintas citoquinas. Existen dos tipos principales de células Th: Th1 y Th2. Las células Th1 se caracterizan por la producción de IFN γ , que activa a los macrófagos, y de otras citoquinas que inducen a las células B a producir anticuerpos opsonizantes y neutralizantes. La respuesta Th2 se caracteriza por la liberación de IL-4, IL-5 e IL-13, que participan en la activación y reclutamiento de eosinófilos, mastocitos y de células B productoras de inmunoglobulina E (IgE). Estas células y los anticuerpos IgE están implicados en respuestas inflamatorias agudas y procesos alérgicos. Por ello, un desequilibrio en la producción de citoquinas por parte de las células Th2 se asocia con el desarrollo de condiciones alérgicas (Warrington et al., 2011). Se ha descrito otro tipo de células Th que producen IL-17, la cual no es producida por las células Th1 y Th2, y que se conocen como Th17. Estas células Th17 desempeñan un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Además, ejercen un efecto proinflamatorio que les permite mediar entre la inmunidad innata y la adaptativa (Serrano Hernandez, 2009). Al igual que las células T citotóxicas, algunas células Th permanecen como células de memoria.

Existe un tercer tipo de células T, las células T reguladoras (Treg), encargadas de limitar y suprimir al sistema inmune para controlar las respuestas inmunes aberrantes o dirigidas contra antígenos propios que conllevan el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Warrington et al., 2011).

6.1.6. Células B

A diferencia de las células T, las células B son capaces de reconocer un antígeno libre de forma directa, sin que las CPAs medien la presentación. La función principal de las células B es la producción de anticuerpos específicos contra antígenos extraños. Cuando las células B son activadas por el antígeno extraño, proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos o células B de memoria. Estas células son de vida larga y permanecen una vez se ha superado la infección para proporcionar una respuesta rápida y eliminar los antígenos si hay una re-exposición, contribuyendo a la inmunidad adaptativa humoral (Warrington et al., 2011).

6.2. Mecanismos de contacto directo célula-célula en la inmunorregulación de las células madre mesenquimales

El contacto directo célula-célula es un factor clave implicado en los efectos inmunomoduladores de las MSCs. Aunque los mecanismos concretos no son del todo

conocidos, se ha descrito que este proceso participa en la inducción y regulación de las células Treg y en el efecto inhibitorio sobre las células T. En el proceso de contacto participan diferentes moléculas de adhesión, como CD274, galectina 1, CCL2, CCL8, CXCL10, ligandos de los receptores CXCR3 y CCR5, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) y VCAM-1. Mediante estas moléculas, las MSCs median la quimioatracción de neutrófilos y monocitos en condiciones no inflamatorias, mientras que en condiciones inflamatorias atraen a monocitos, DCs, células T y células NK. El papel de estas moléculas en conjunto es atraer a las diferentes células inmunes a las inmediaciones de las MSCs, por lo que se considera que su papel sería el de facilitar la acción de los mecanismos paracrinos mediante la aproximación de las células diana (Hoogduijn et al., 2010; Ma et al., 2014; Gao et al., 2016).

6.3. Mecanismos paracrinos en la inmunorregulación de las células madre mesenquimales

Cada vez se conocen más mediadores secretados por las MSCs y se sabe más sobre sus funciones. De los mediadores descritos hasta la fecha, destacan la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), PGE2, IL-6, TGF- β , HGF, IL-10, LIF, antígeno leucocitario humano G (HLA-G) y la proteína inducida por TNF α 6 (TSG-6). Algunas de estas moléculas, como IDO, iNOS o PGE2, parecen tener un papel central por sí solas en determinadas especies, mientras que otras como TGF- β , HGF, IL-10, LIF y HLA-G parecen ser mediadores “parciales”, es decir, pueden ejercer acciones en conjunto pero cada molécula por sí sola no es capaz de desempeñar acciones inmunosupresoras. Es interesante destacar el hecho de que no en todas las especies predomina siempre la acción del mismo mediador. Como ejemplo, el papel de IDO ha sido ampliamente demostrado en las MSCs humanas, mientras que no ha sido descrito de forma consistente en el ratón. En las MSCs murinas, en cambio, parece predominar la acción de iNOS, que por otra parte es poco expresada por las MSCs humanas. Por ello, es importante estudiar los mecanismos inmunorreguladores que son ejercidos de forma predominante por las MSCs de cada especie. Pese a que haya moléculas más sobresalientes en la mediación de este proceso, conviene recordar que los efectos reguladores de las MSCs son finalmente el resultado de la combinación de las acciones de varios mediadores (Hoogduijn et al., 2010). En la Tabla 7 se recogen de forma resumida las acciones conocidas de cada mediador sobre los diferentes tipos de células inmunes (Corcione et al., 2006; Djouad et al., 2007; Nasef et al., 2007; Nasef et al., 2008; Ghannam et al., 2010; Blanc y Mougiakakos, 2012; Carrade y Borjesson, 2013; Gao et al., 2016) y en la Figura 21 se representan las principales interacciones.

	Células T	Células B	Células NK	Macrófagos	Células dendríticas
IDO	↓ Proliferación ↓ Secreción citoquinas ↓ Citotoxicidad ↓ Diferenciación a Th17	↓ Proliferación ↓ Producción anticuerpos	↓ Activación ↓ Citotoxicidad	↑ Activación M2	↓ Maduración
iNOS	↓ Proliferación ↓ Secreción citoquinas ↓ Citotoxicidad			Afecta a su función	
PGE2	↓ Proliferación ↓ Secreción citoquinas (IL-2) ↓ Citotoxicidad -Induce Th2 -Induce Treg		↓ Activación ↓ Citotoxicidad	↑ IL-10	↓ Diferenciación ↓ Maduración ↓ Activación ↓ Presentación antigénica
IL-6	-Inhibe proliferación				↓ Diferenciación
TGF-β	-Inhibe proliferación -Induce Tregs		↓ Activación ↓ Citotoxicidad		
HGF	↓ Proliferación ↓ Secreción citoquinas ↓ Citotoxicidad				
IL-10	↓ Diferenciación a Th17 ↓ Secreción citoquinas por Th1 -Inducción Tregs				↓ Maduración ↓ Citoquinas proinflamatorias (IL-2)
LIF	-Inhibe proliferación -Inducción Tregs				
HLA-G	-Inhibe proliferación -Inducción Tregs				
TSG6					↓ Activación ↓ Citoquinas proinflamatorias

Tabla 7.- Acciones paracrinas más relevantes atribuidas a las principales moléculas inmunorreguladoras secretadas por las células madre mesenquimales (MSCs) sobre los distintos tipos de células inmunes

El papel de IDO en la mediación de la inmunorregulación ejercida por las MSCs ha sido ampliamente descrito y se ha sugerido que su mecanismo de acción deriva de la depleción de

triptófano, aminoácido esencial para la proliferación de los linfocitos, y de la acumulación del metabolito kinurerina, que posee propiedades inmunorreguladoras (Tse et al., 2003; Meisel et al., 2004).

La enzima iNOS es inducida por la señal inflamatoria y produce NO como metabolito. El NO es un compuesto gaseoso bioactivo con distintas propiedades sobre las células del sistema inmune y con efecto pro-angiogénico (Sato et al., 2007).

PGE2 es un producto derivado del metabolismo de ácido araquidónico por la enzima COX-2 capaz de regular las funciones de distintas células inmunes (Bouffi et al., 2010).

El papel de IL-10 es controvertido. Algunos estudios han mostrado que las MSCs no lo producen mientras que otros han descrito la secreción de altos niveles de esta molécula, aunque no queda claro si IL-10 es producida directamente por las MSCs o si deriva de las células inmunes co-cultivadas con éstas. También se ha sugerido una retroalimentación entre la producción de IL-10 y HLA-G por las MSCs que requeriría contacto directo (Ma et al., 2014; Castro-Manrreza y Montesinos, 2015; Chen et al., 2017).

Se ha observado la implicación de TSG-6 en la mediación de la reparación en modelos de infarto de miocardio y de daño corneal, además de haber mostrado capacidad para reducir la inflamación en la peritonitis experimental mediante la modulación de los macrófagos residentes. Sin embargo, el papel de TSG-6 en la inmunomodulación de las MSCs requiere más investigación (Prockop y Oh, 2012; Qi et al., 2014; Sala et al., 2015).

6.3.1. Acción de las células madre mesenquimales sobre los distintos tipos celulares del sistema inmune

Las moléculas secretadas por las MSCs que se han comentado en el subapartado anterior tienen capacidad para influir sobre distintas funciones (proliferación, maduración, activación, producción de citoquinas, etc.) de varias células inmunes. Estos mecanismos se explicarán a continuación de forma global (Figura 21):

a) Las MSCs inhiben la proliferación de las células T y suprimen la respuesta de las células T alogénicas

Las principales características de la respuesta de las células T, como se ha visto en el subapartado correspondiente, son la proliferación y la liberación de citoquinas. Inhibir la proliferación de las células T es el efecto más significativo del mecanismo inmunorregulador de las MSCs, observándose efectos supresores similares tanto frente a células T autólogas como alogénicas. Además, las MSCs son capaces de modular la respuesta inmune mediante la inducción de células Treg, siendo éstas capaces de inhibir la proliferación de linfocitos alogénicos. De hecho, se ha descrito que las células Treg expuestas a MSCs tienen mayor potencial inmunosupresor que las Treg no expuestas, pudiendo estar implicada en este efecto la IL-10. Aunque el mecanismo exacto detrás de este efecto inmunosupresor no está claro, parece que los responsables son los factores solubles secretados por las MSCs, principalmente IDO, PGE2, TGF- β 1 y HGF. Además, las MSCs pueden inhibir la proliferación y/o las funciones

de las células T citotóxicas y efectoras Th1 y Th17, principalmente mediante TGF- β y HGF (Di Nicola et al., 2002; Le Blanc et al., 2003b; Tse et al., 2003; Djouad et al., 2007; Yan et al., 2014).

b) Las MSCs afectan a la proliferación y maduración de las células B

Las MSCs pueden inhibir varias funciones de las células B, desde su proliferación mediante el arresto del ciclo celular en fase G0/G1, hasta su diferenciación y la consiguiente producción de anticuerpos. La expresión de varios factores quimiotácticos por las células B es reducida por las MSCs, sugiriendo que éstas pueden afectar a sus capacidades de quimioatracción y migración a la zona del daño (Corcione et al., 2006). Además, las MSCs pueden contribuir a suprimir la liberación de Igs en respuesta a un antígeno. Sin embargo, otros estudios han mostrado un papel estimulador de la proliferación y diferenciación de las células B por parte de las MSCs (Rosado et al., 2015), por lo que los efectos de las MSCs sobre las células B necesitan ser aclarados.

c) Las MSCs bloquean la proliferación y citotoxicidad de las células NK

Las MSCs alteran el fenotipo de las células NK y disminuyen su proliferación y sus funciones citotóxicas y de liberación de citoquinas. Algunos de estos efectos requieren el contacto directo célula-célula, mientras que otros están mediados únicamente por factores solubles como TGF- β 1 y PGE2, lo que sugiere que hay distintos mecanismos implicados en el efecto supresor de las MSCs sobre las células NK, incluyendo diversos mediadores y vías de señalización (Spaggiari et al., 2006; Godfrey et al., 2010). Las relaciones entre MSCs y células NK requieren más investigación.

d) Las MSCs inducen la transformación del fenotipo de los macrófagos (M1/M2)

La regulación de los macrófagos mediada por las MSCs parece tener un papel muy importante en la reparación del tejido dañado. Las MSCs pueden reclutar macrófagos M2, de fenotipo antiinflamatorio, y además pueden interactuar con los monocitos y macrófagos circulantes y residentes y reprogramarlos, haciendo que produzcan grandes cantidades de IL-10 y reduciendo los niveles circulantes de TNF α . Además, las MSCs pueden cambiar el fenotipo de los macrófagos M1 hacia M2 sin requerir contacto directo, lo que tiene una gran significación para el tratamiento de patologías inflamatorias (Nemeth et al., 2009; Abumaree et al., 2013).

e) Las MSCs modulan la generación y maduración de las células dendríticas

La presencia de MSCs es capaz de bloquear la diferenciación de los precursores a DCs maduras, así como de disminuir la expresión de factores quimiotácticos afectando a su migración. Las MSCs también son capaces de inhibir el incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 y del propio MHC-II por parte de las DCs durante su proceso de maduración, así como de reducir su expresión y la secreción de IL-12 en las DCs ya maduras. La molécula PGE2 secretada por las MSCs parece jugar un papel central en la ejecución de estos efectos. Además de la proliferación y maduración, las MSCs también pueden interferir con las funciones de las DCs, incluidas el procesamiento y presentación de

antígenos a las células T, y en su capacidad de anidamiento en los órganos linfoides (Zhang et al., 2004; Jiang et al., 2005; English et al., 2008).

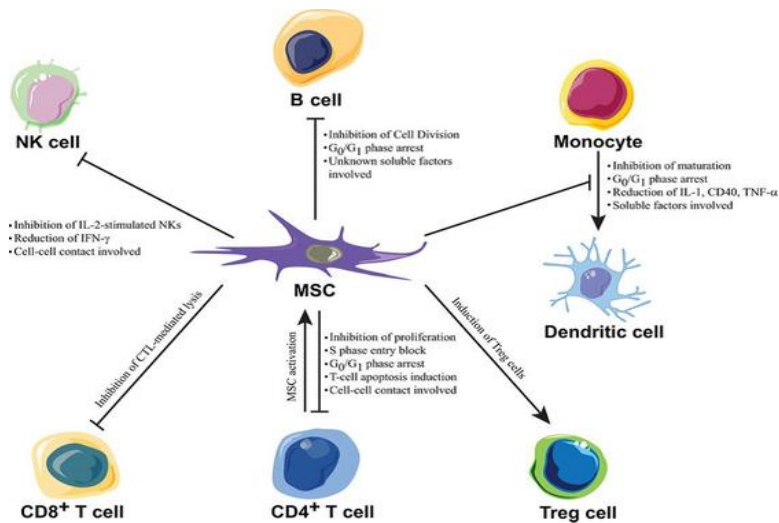


Figura 21: Representación esquemática de las principales funciones ejercidas por las células madre mesenquimales (MSCs) sobre los distintos tipos de células inmunes. Tomado de Yi y Song, (2012).

7. PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EQUINAS

Las propiedades referentes a la capacidad inmunomoduladora de las MSCs han sido principalmente descritas en la especie humana y en roedores de laboratorio (rata y ratón). Sin embargo, debido a que las MSCs son aplicadas en los animales domésticos incluso con más frecuencia, es necesario caracterizar también los mecanismos inmunorreguladores en estas especies (Carrade y Borjesson, 2013). La capacidad de las MSCs para inhibir a las células T *in vitro* ha sido descrita en primates no humanos (Bartholomew et al., 2002; Berman et al., 2010), perros (Kang et al., 2008; Kim et al., 2010), conejos (Moreno et al., 2010), cerdos (Poncelet et al., 2007), oveja (Mrugala et al., 2008) y caballos (Peroni y Borjesson, 2011; Carrade et al., 2012b; Ranera et al., 2016; Colbath et al., 2017a).

En algunas de estas especies se han estudiado los mediadores secretados por las MSCs de distintos orígenes, encontrando variabilidad en los tipos producidos y en su implicación reguladora dependiendo tanto de la especie como del origen. Como se ha comentado anteriormente, parece queIDO e iNOS son mediadores especie-dependiente (Carrade y Borjesson, 2013). En el caballo, se ha encontrado que las MSCs de origen hemático (médula ósea y sangre del cordón umbilical) producen NO, pero no las derivadas de tejidos sólidos (grasa y tejido del cordón umbilical) (Carrade et al., 2012a). No se conoce hasta qué punto esta diferencia en la secreción de mediadores *in vitro* puede influir sobre el potencial terapéutico de las MSCs *in vivo*, aunque podría ser que la mayor rapidez observada en la reparación de tendinopatías tratadas con UCB-MSCs comparadas con aquellas tratadas con MSCs derivadas de tejidos sólidos estuviera relacionada con que la producción de NO incrementara la angiogénesis (Carrade y Borjesson, 2013). En cambio, la expresión y secreción de IDO no han sido detectadas en las MSCs equinas en los orígenes estudiados ni de forma basal ni tras la

exposición a linfocitos T. Por otra parte, TGF- β 1 y HGF se expresan y producen de forma constitutiva pero no cambian frente a la exposición a células T activadas, mientras que IL-6 y PGE2 sí lo hacen (Carrade et al., 2012a; De Schauwer et al., 2014). El bloqueo de PGE2 suprimió la capacidad inhibitoria de las MSCs equinas sobre la proliferación de los linfocitos, mientras que el bloqueo de IL-6 y NO no inhibió el efecto supresor sobre estas células (Carrade et al., 2012a; Carrade Holt et al., 2014), sugiriendo que PGE2 tiene un papel central en la inmunorregulación de las MSCs equinas. Sin embargo, las MSCs procedentes de distintos orígenes no utilizan los mismos mecanismos para llevar a cabo este efecto, viéndose que aquellas derivadas de tejidos sólidos (AT-MSCs y UCT-MSCs) inducen la apoptosis de las células T, mientras que las de origen hemático (BM-MSCs y UCB-MSCs) lo hacen mediante arresto del ciclo celular (Carrade et al., 2014).

Las UCB-MSCs equinas también han demostrado la supresión de la proliferación de linfocitos T alogénicos activados (Williams et al., 2014; Tessier et al., 2015). Además, la criopreservación de las UCB-MSCs no afecta a su capacidad de inmunosupresión, no requiriendo un tiempo de reacondicionamiento tras la descongelación como sucede con la capacidad de proliferación (Williams et al., 2014) y como sí se ha observado en MSCs humanas (Francois et al., 2012). La supresión de células T por las BM-MSCs equinas es dependiente del ratio pero no de la compatibilidad entre donante y receptor para el MHC, no siendo ésta requerida para ejercer su efecto inhibitorio (Ranera et al., 2016). De forma similar, la implicación de PGE2 en la supresión de la proliferación de linfocitos T ha sido demostrada en cocultivo tanto con BM-MSCs autólogas como alogénicas, siendo ambos tipos igualmente capaces de inhibir la respuesta linfocitaria en términos de proliferación y liberación de IFN γ , lo que sugiere que tanto las MSCs autólogas como las alogénicas tienen potencial para modular la inflamación en problemas músculo-esqueléticos del caballo (Colbath et al., 2017a).

La aplicación más extendida de las MSCs a patologías equinas es su uso en problemas músculo-esqueléticos, pero al igual que ha ido sucediendo en la especie humana, el estudio de sus propiedades inmunorreguladoras ha abierto la posibilidad de aplicación a otros desórdenes inflamatorios. Como ejemplo, se ha visto el potencial regulador de las AT-MSCs en un modelo *ex vivo* de endometriosis equina (Falomo et al., 2015). Así mismo, la aplicación *in vivo* de MSCs alogénicas en yeguas disminuyó la respuesta inflamatoria que se produce en el útero tras la exposición a espermatozoides, sugiriendo que éste podría ser un tratamiento para la endometritis persistente (Ferris et al., 2014b). El uso de BM-MSCs también empieza a surgir como una terapia potencial en procesos alérgicos o inmunomediados en el caballo, como la obstrucción recurrente de vías aéreas (ORVA), para la que parecen ser buenas candidatas por su capacidad de modular la respuesta inmune (Barussi et al., 2016). Como valor añadido, esta patología equina podría ser un modelo potencial para el asma humano (Leclere et al., 2011).

8. ACTIVACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNORREGULADORA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Algunas propiedades inmunorreguladoras de las MSCs son constitutivas, pero el desarrollo completo de su potencial requiere de una activación previa. Por ejemplo, algunos de los mediadores descritos no son producidos, o lo son en baja cantidad, en condiciones basales, pasando a secretarse o a aumentar su producción cuando las MSCs son activadas. La

necesidad de activación para que las MSCs puedan desarrollar todo su potencial inmunorregulador es un proceso bien descrito. Ahora bien, ¿qué requieren las MSCs para ser activadas?

8.1. Estímulos activadores de las células madre mesenquimales

Dada la implicación de las MSCs en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, no es de extrañar que su activación vaya a necesitar del estímulo inflamatorio propio de estos ambientes (Ghannam et al., 2010) (Figura 22).

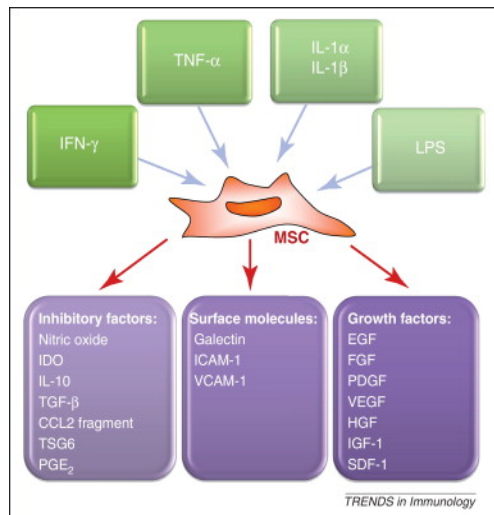


Figura 22: Representación de la respuesta de las células madre mesenquimales (MSCs) a distintos estímulos inflamatorios inductores de su capacidad inmunorreguladora. Tomado de Shi et al., (2012).

En un estudio en el que se testó el efecto *in vitro* de las MSCs sobre condrocitos y sinoviocitos procedentes de articulaciones osteoartríticas, la expresión génica de TNF α , IL1 β y COX2 fue reducida en ambos tipos celulares únicamente cuando éstos producían altos niveles de factores inflamatorios (Manferdini et al., 2013). En un modelo murino de OA, sólo se detectó efecto beneficioso tras la aplicación de MSCs cuando la inflamación sinovial era alta en el momento de la administración (Schelbergen et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que el efecto terapéutico de las MSCs en la OA podría depender de la inflamación con la que se encuentren al administrarlas. Puesto que dicho nivel inflamatorio puede ser variable, la activación *ex vivo* de las MSCs mediante citoquinas proinflamatorias podría ser una estrategia para mejorar la efectividad de la terapia celular (Cuerquis et al., 2014). Como ejemplo, en un modelo murino de GvHD, las MSCs pre-activadas con IFN γ fueron cinco veces más eficaces suprimiendo el proceso que las MSCs no activadas, logrando el 100% de supervivencia de los ratones (Polchert et al., 2008). En un modelo de daño intestinal en rata se administró medio condicionado por MSCs, habiendo sido éstas pre-activadas o no por TNF α , IL-1 β y NO, y se encontró una mejoría remarcable y mayor supervivencia de los animales cuando se pre-activaban las MSCs (Chen et al., 2015).

Se ha sugerido que el propio líquido sinovial podría tener efecto sobre la activación de las MSCs. En la especie humana, la exposición de las MSCs a líquido sinovial aumenta la expresión de IL-6 e IDO, cuya sobreexpresión es significativamente mayor si el líquido sinovial procede de una articulación con OA. Además, al exponer linfocitos activados a medio condicionado por MSCs solas o cultivadas con líquido sinovial, la inhibición de la proliferación es mayor en el caso de las células expuestas a líquido sinovial, sugiriendo que éste aumenta el potencial inmunorregulador de las MSCs (Leijs et al., 2012). En el caballo, tanto el líquido sinovial normal como el procedente de articulaciones afectadas por OA, aumenta la expresión de VEGF y disminuye la de IL-1 β (Vézina Audette et al., 2013). Sin embargo, el nivel de activación de las MSCs por el líquido sinovial puede ser variable ya que la estimulación depende del nivel inflamatorio del mismo, el cual es heterogéneo incluso dentro del mismo grupo de patología (Leijs et al., 2012).

Las MSCs, al igual que las células inmunes, poseen *toll-like receptors* (TLRs) mediante los cuales pueden ser reclutadas al sitio de inflamación. Los TLRs se encargan de captar señales de “peligro” emitidas por la mayoría de tejidos en situación patológica y de activar seguidamente la movilización de las células al lugar del daño. Las MSCs expresan principalmente los TLR-3 y TLR-4 y la activación de uno u otro va a “polarizar” a la célula hacia el fenotipo MSC1, de carácter proinflamatorio, o hacia el fenotipo MSC2, de perfil predominantemente inmunosupresor. De esta forma, la activación de TLR-4, que se puede inducir por la exposición a lipopolisacárido (LPS), da lugar al fenotipo MSC1, mientras que la activación de TLR-3 (mediante ácido poliinosínico-policitídílico, Poly (I:C)) polariza a las MSCs al fenotipo MSC2 (Waterman et al., 2010). La estimulación de las MSCs con LPS ha mostrado la inducción de la secreción de IL-6, IL-1 β e IL-8 en MSCs humanas (Montzka et al., 2010) y de las dos últimas en MSCs equinas (Vézina Audette et al., 2013). Estos hallazgos evidencian que las MSCs pueden cambiar su fenotipo frente a distintos estímulos.

La inmunorregulación en las MSCs se ha visto inducida por su exposición a células inmunes activadas. Éstas pueden activarse mediante el uso de mitógenos como la fitohemaglutinina (Demircan et al., 2011) o, de una forma más equiparable a lo que sucedería *in vivo*, exponiéndolas a otras células inmunes alogénicas, lo que se conoce como reacción mixta de leucocitos (*mixed leukocyte reaction*, MLR) (Fasslrunner et al., 2012). La activación de las MSCs en presencia de linfocitos parece estar mediada principalmente por la citoquina proinflamatoria IFN γ , que es producida por las células T activadas (Sheng et al., 2008). Se considera pues que IFN γ juega un papel esencial en la inducción de la inmunosupresión mediada por MSCs, pero además, otras citoquinas proinflamatorias producidas por las células T, como TNF α , IL-1 α o IL-1 β , podrían intervenir en dicha activación (Krampera et al., 2006; Ren et al., 2008). El efecto de IFN γ solo o en combinación con otras citoquinas sobre la activación de las MSCs se ha estudiado en distintas especies, observándose que la combinación con TNF α es sinérgica (Zimmermann y McDevitt, 2014). En el caballo, la estimulación de BM-MSCs equinas sólo con IL-1 β incrementó la expresión de IL-8 e IL-1 β (Vézina Audette et al., 2013), mientras que la estimulación con IFN γ reguló la supresión de la proliferación y de la secreción de citoquinas por los linfocitos T, aunque este efecto no fue significativamente diferente del producido por las MSCs no estimuladas (Paterson et al., 2014). Sin embargo, recientemente se ha visto que las AT-MSCs equinas pre-estimuladas con IFN γ son más eficaces en la supresión

de la proliferación de células T y en prevenir la destrucción del cartílago en un modelo *ex vivo* utilizando explantes (Maumus et al., 2016). Por otra parte, el efecto de la combinación de varias citoquinas sobre las MSCs equinas no ha sido estudiado.

8.2. Posibles efectos no deseables derivados de la activación de las células madre mesenquimales

La estimulación mediante citoquinas proinflamatorias puede aumentar el potencial inmunorregulador de las MSCs, pero también puede conllevar otros efectos no deseables sobre las mismas, como serían disminución en su viabilidad, interferencia con su capacidad de diferenciación o aumento de su inmunogenicidad. Estos tres potenciales efectos pueden tener consecuencias significativas en la supervivencia y en la acción terapéutica de las MSCs cuando son administradas *in vivo* (Liu et al., 2011; Ankrum et al., 2014).

La secreción de TNF α e IFN γ por parte de las células T tiene un efecto sinérgico en la inducción de la apoptosis de las MSCs mediante la vía extrínseca (Liu et al., 2011) e interfiere en su diferenciación osteogénica, condrogénica (Murakami et al., 2000; Gilbert et al., 2002; Dighe et al., 2013;) y adipogénica (Lacey et al., 2009). Además, TNF α convierte la señalización del receptor no-apoptótico Fas activado por IFN γ en una cascada proapoptótica mediada por la caspasa 8 en MSCs (Liu et al., 2011; Wang et al., 2013b). De estos hallazgos se deduce que un entorno inflamatorio puede suponer un detrimento para la viabilidad de las MSCs y su supervivencia *in vivo*.

La reducción de la capacidad de diferenciación tri-linaje de las MSCs mediada por citoquinas proinflamatorias ha sido descrita en varias especies. En ratón, la exposición de MSCs a TNF α o IL-1 β reduce significativamente la expresión de marcadores osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos (Lacey et al., 2009). En la especie humana y en ratas, estas citoquinas inhiben la expresión del factor de transcripción de diferenciación de los osteoblastos RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*), pero en MSCs humanas también son capaces de aumentar la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y de la mineralización durante la diferenciación osteogénica (Gilbert et al., 2002; Ding et al., 2009). De hecho, se ha descrito que TNF α puede aumentar el potencial osteogénico de las MSCs de forma dosis-dependiente, pero este efecto es abolido por la presencia de agentes antiinflamatorios como la dexametasona, habitualmente utilizada para la inducción *in vitro* de la diferenciación a este linaje (Mountziaris et al., 2010). Se ha propuesto que la inhibición de la diferenciación de las MSCs a osteoblastos mediada por TNF α tiene lugar mediante el receptor p55 TNF (Gilbert et al., 2005). Por otra parte, una alta secreción de IFN γ por parte de las células inmunes también puede interferir con la osteogénesis de las MSCs mediante la disminución en la expresión génica de ALP y RUNX2, como se vio *in vivo* en un modelo murino en que se implantaron MSCs alogénicas en soportes (Dighe et al., 2013).

Un nivel alto de citoquinas proinflamatorias también conlleva la reducción en la expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ) en las MSCs de rata, interfiriendo con su diferenciación a adipocitos (Cortez et al., 2013).

TNF α e IFN γ han sido descritos además como inhibidores de la formación de colágeno (Nanes et al., 1989) y estas citoquinas proinflamatorias son capaces de afectar a la diferenciación condrogénica de las MSCs murinas (Lacey et al., 2009) y disminuyen la producción de colágeno tipo II y agregano por los condroblastos derivados de MSCs equinas (Zayed et al., 2016).

Pese a que los mecanismos paracrinos parecen ser los principales implicados en las acciones terapéuticas de las MSCs, su capacidad de diferenciación se sigue considerando implicada en las mismas. Por ello, el potencial efecto negativo de las citoquinas proinflamatorias sobre su diferenciación debe ser considerado cuando se administran *in vivo* en un entorno inflamatorio y cuando se estudia la aplicación de un estímulo inflamatorio *ex vivo* para aumentar su potencial inmunorregulador.

IFN γ se considera además un inductor de la expresión del MHC en MSCs (Chan et al., 2008), lo que puede afectar a la seguridad y a la efectividad de la administración *in vivo* por un potencial aumento en la inmunogenicidad de las mismas. Por su relevancia en la presente Tesis Doctoral, los aspectos relacionados con la inmunogenicidad de las MSCs serán revisados con más detalle en la siguiente sección.

9. INMUNOGENICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

9.1. Interés de la terapia celular alogénica

La terapia alogénica con MSCs ha despertado siempre un gran interés. Se trata de una estrategia muy interesante, dado que permite una mayor y más rápida disponibilidad de las células. Las MSCs pueden aislarse a partir de donantes sanos para caracterizarlas y estudiar su viabilidad y sus propiedades potencialmente implicadas en el mecanismo terapéutico, para después criopreservarlas hasta el momento de su utilización. De esta forma, pueden crearse bancos celulares para tener siempre disponible y de forma rápida una fuente suficiente de células bien caracterizadas, evitando así el retraso asociado a la obtención y expansión de MSCs autólogas que limita su uso en fases tempranas de la lesión. Además, las MSCs alogénicas permitirían el uso de terapia celular en aquellos casos en los que hay limitaciones con las células autólogas. Por ejemplo, en los pacientes de edad avanzada las MSCs suelen estar en baja cantidad y tener menor viabilidad y capacidad de expansión. Otro caso sería el de los pacientes con enfermedades genéticas, cuyas MSCs tendrían el mismo defecto genético y por tanto no serían apropiadas para la terapia (Chen and Tuan, 2008; Zhang et al., 2015a). Sin embargo, ciertas consideraciones deben tenerse en cuenta respecto al uso alogénico de MSCs, como se verá a continuación.

9.2. El concepto de inmuno-evasión

Debido a la baja expresión de MHC-I y a la ausencia de expresión de MHC-II, tradicionalmente se ha considerado a las MSCs como “inmuno-privilegiadas”, es decir, incapaces de producir una respuesta inmune en el receptor cuando se administran de forma alogénica. Esta propiedad es una de las que ha hecho atractivas a las MSCs, por saltarse las

barreras del MHC que dificultan el trasplante celular y abrir así la puerta al uso de la terapia alogénica, con las ventajas que ya se han comentado. Sin embargo, a medida que la investigación ha ido avanzando, se ha visto que esta concepción sobre las MSCs no es del todo correcta. Se ha observado que las MSCs administradas de forma alogénica sí son capaces de producir cierto nivel de respuesta inmune, tanto a nivel celular como humoral (mediada por la producción de anticuerpos alo-específicos), por lo que estrictamente hablando, el adjetivo “inmuno-privilegiadas” debería ser abandonado. Sin embargo, es cierto que estas células son menos inmunogénicas que otros tipos celulares. Esto es debido en parte al ya mencionado patrón de expresión del MHC, pero también en buena medida a las propiedades inmunosupresoras anteriormente descritas. El tiempo para que se desarrolle el rechazo inmunológico y la severidad del mismo parecen ser dictados por el balance entre la expresión de factores inmunogénicos e inmunorreguladores por las MSCs (Ankrum et al., 2014). Por ejemplo, si no se induce la capacidad inmunorreguladora de las MSCs, parece ser que éstas tienden a actuar como CPAs y que son capaces de promover la inflamación *in vivo* (Chan et al., 2006). Sin embargo, si las MSCs están activadas y son capaces de influir sobre el microambiente en que se encuentran, pueden suprimir al sistema inmune de manera local (Kidd et al., 2009) y de esta forma “pasar desapercibidas”, enmascarando su inmunogenicidad. Es por ello que recientemente se ha comenzado a utilizar un término más apropiado para estas propiedades inmunológicas de las MSCs: inmuno-evasión (Ankrum et al., 2014) (Figura 23).

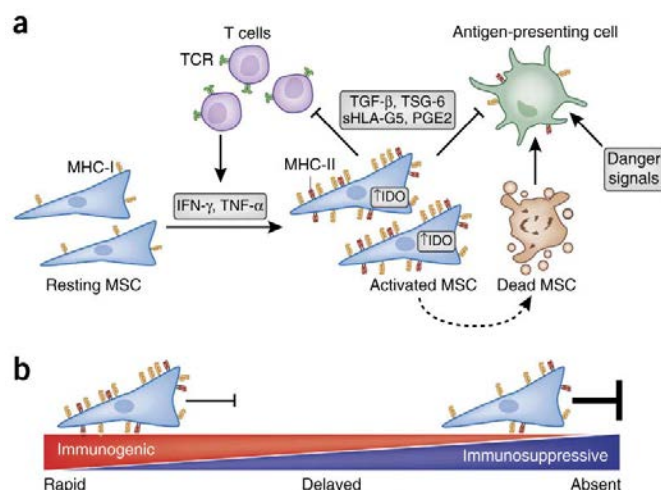


Figura 23: Las células madre mesenquimales (MSCs) tienen potencial para evadir al sistema inmune del receptor mediante la activación de sus propiedades inmunosupresoras por citoquinas proinflamatorias, pese a que éstas también inducen la expresión del MHC (a). El balance entre la expresión de factores inmunogénicos e inmunosupresivos determina el reconocimiento de las MSCs por el sistema inmune (b). Tomado de Ankrum et al., (2014).

En resumen, aunque las MSCs no se pueden considerar realmente como “inmuno-privilegiadas”, el rechazo alogénico frente a ellas ocurre más despacio y de forma menos severa que en otros tipos celulares alogénicos gracias a sus propiedades “evasivas”. De cualquier modo, no se conoce de forma exacta hasta qué punto el rechazo inmunológico por parte del receptor influye sobre la eficacia de las MSCs alogénicas, no habiendo sido demostrada con absoluta certeza una ventaja clínica definitiva del uso de MSCs autólogas sobre el uso de alogénicas (Ankrum et al., 2014). Por ello, el número de estudios utilizando

MSCs alogénicas continua incrementando, mas deben tenerse presentes las consideraciones sobre su inmunogenicidad.

9.3. Mecanismos de inmuno-evasión de las células madre mesenquimales

El reconocimiento inmunológico de las MSCs alogénicas por parte del sistema inmune del receptor tendría como consecuencias la eliminación de las mismas, la alteración de su capacidad de anidamiento si son opsonizadas por anticuerpos alo-específicos, y el desarrollo de una respuesta inflamatoria local. Estos sucesos se traducirían en una pérdida de la eficacia de las MSCs y en posibles efectos adversos. Además, estas consecuencias indeseables podrían acelerarse por la generación de memoria inmunológica en caso de utilizar administraciones repetidas de MSCs (Consentius et al., 2015), estrategia estudiada para aumentar la efectividad de la terapia celular (Hatsushika et al., 2014). Mientras que algunos estudios han evidenciado la inducción de alo-inmunidad al administrar MSCs alogénicas (Nauta et al., 2006), otros han mostrado una aplicación segura y efectiva de las mismas (Wang et al., 2013^a; Hatsushika et al., 2014; Vega et al., 2015). Estos resultados contradictorios indican que las MSCs alogénicas son capaces de generar rechazo inmunitario, pero que en ciertas ocasiones no sólo no lo hacen sino que además ejercen efecto terapéutico, lo que parece indicar que bajo ciertas condiciones son capaces de “burlar” al sistema inmune. Indudablemente, hay una gran cantidad de variables que pueden influir en las relaciones entre MSCs y sistema inmune, confirmando una enorme complejidad al proceso. El estudio de estas interacciones es crucial para lograr terapias celulares seguras y efectivas.

9.3.1. Interacción de las células madre mesenquimales con la respuesta inmune celular

Aunque aún quedan muchas cuestiones abiertas, de los estudios realizados hasta la fecha pueden inferirse algunos mecanismos mediante los cuales las MSCs serían capaces de evadir al sistema inmune mediante la interacción con la respuesta celular. Algunos de los mecanismos ejercidos sobre las células inmunes ya han sido abordados en la sección sobre la inmunomodulación, por lo que en este apartado sólo se remarcarán los aspectos más relevantes referidos a la evasión del sistema inmune, aunque cabe recordar que todos estos procesos están estrechamente ligados y conducen al mismo fin: regular la respuesta inmune.

Cuando las MSCs están presentes durante el proceso de diferenciación de las DCs, las primeras son capaces inducir un fenotipo tolerogénico en las segundas (Jiang et al., 2005). Es decir, las MSCs son capaces de influir sobre las DCs antes de su maduración, pero se desconoce cómo interactúan con las DCs ya maduras y con su capacidad de migración.

Las MSCs pueden inhibir la activación de las células NK mediada por receptores o por interleuquinas. La inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios por las células NK es dirigida de forma paracrina por las MSCs, mientras la inhibición de la citotoxicidad requiere contacto directo. En este punto cabe remarcar que, si bien la baja expresión de MHC-I por parte de las MSCs es algo deseable para “esquivar” al sistema inmune, en el caso de las células NK se convierte en lo contrario: como se ha descrito anteriormente, las células NK tienen

receptores activadores e inhibidores y los segundos son activados por la unión del MHC-I de células del mismo individuo, por lo que las MSCs serían susceptibles de ser lisadas por las células NK (Spaggiari et al., 2006).

La relación entre células B y MSCs ha sido poco estudiada, pero los resultados publicados sugieren que las MSCs serían capaces de disminuir la proliferación y la producción de anticuerpos por las células B, aunque este proceso requeriría de la presencia de células T (Rosado et al., 2015).

Las MSCs son capaces de inhibir la proliferación tanto de las células T citotóxicas como efectoras. Dentro de las células efectoras, las MSCs pueden disminuir la proliferación de las células Th1 y su secreción de IFN γ medianteIDO y PGE2 y aumentar la población de Th2 y su habilidad para secretar mediadores antiinflamatorios como IL-4 mediante TGF- β 1 y PGE2 (Aggarwal y Pittenger, 2005). Las MSCs incluso pueden “reprogramar” a la célula Th convirtiéndola del fenotipo 1 al 2 en ciertas circunstancias. Por otra parte, las MSCs pueden aumentar la generación de células Treg, asociadas con la protección frente a distintos procesos autoinmunes y frente a inducción de alo-inmunidad (Consentius et al., 2015).

Sin embargo, aunque la mayoría de estudios haya mostrado un efecto supresor y regulador de las MSCs sobre las células T, algunos estudios sugieren que, bajo ciertas condiciones, las MSCs se pueden comportar como CPAs y activar a las células T (Chan et al., 2006). Esta potencial actuación como CPAs de las MSCs es incrementada por la pre-activación con IFN γ al inducir la expresión de MHC-II (Chan et al., 2008). Sin embargo, esta habilidad se vería limitada por la falta de expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, CD40 o CD40L por parte de las MSCs (Najar et al., 2012; Tse et al., 2003). La relación entre la activación de las MSCs mediante IFN γ , su inmunomodulación y su inmunogenicidad es compleja. IFN γ ha mostrado ser esencial en inducir la capacidad inmunosupresora de las MSCs y, por tanto, la inhibición de las células inmunes (Chinnadurai et al., 2014; Krampera et al., 2006). Sin embargo, la exposición a IFN γ aumenta la expresión de MHC-I e induce la de MHC-II, pudiendo facilitar el reconocimiento alogénico de las MSCs y aumentar su inmunogenicidad (Chan et al., 2008).

En el caballo, se ha visto que la expresión de MHC-II por las MSCs no está siempre ausente en condiciones basales, sino que puede darse de forma constitutiva y además es variable entre individuos, pese a que sean homogéneas en otros marcadores y en su capacidad de diferenciación tri-linaje. La estimulación con IFN γ de las MSCs negativas para MHC-II resultó en un aumento marcado de su expresión. Cuando se enfrentaron MSCs positivas para el MHC-II (sin estimulación) con células T alogénicas, la incompatibilidad entre donante y receptor resultó en un aumento de la proliferación de células T, comparado con el producido por MSCs negativas para MHC-II o positivas pero compatibles. Estos hallazgos sugieren que la expresión de MHC-II debería ser comprobada antes del uso alogénico de MSCs e, idealmente, también debería serlo la compatibilidad para el MHC entre donante y receptor. Además, se debe considerar que un entorno inflamatorio en el que haya IFN γ presente puede cambiar el perfil inmunogénico de las MSCs equinas (Schnabel et al., 2014).

9.3.2. Interacción de las células madre mesenquimales con la respuesta inmune humoral

Pese a que parecen tener un efecto supresor de la producción de anticuerpos sobre las células B, las MSCs son capaces de provocar una respuesta inmune no solo celular sino también de tipo humoral, induciendo la producción de alo-anticuerpos específicos (Badillo et al., 2007). Este hallazgo podría obstaculizar el uso de dosis repetidas de MSCs alogénicas.

La inyección de MSCs alogénicas en ratón es capaz de inducir títulos altos de anticuerpos con reactividad específica contra las células inyectadas. Además, al someter a estos animales a un injerto de piel alogénico, éste fue rechazado en todos los receptores, incluso si el donante y receptor eran compatibles para el MHC (Badillo et al., 2007). En cambio, otros estudios han mostrado un uso seguro de administraciones repetidas de MSCs alogénicas (Poh et al., 2007). La producción de respuesta humoral frente a MSCs alogénicas en el caballo se ha descrito muy recientemente. La administración intradérmica de MSCs incompatibles para el MHC (en el caballo llamado ELA, *Equine Leukocyte Antigen*) resultó en una reacción inflamatoria local y en la producción de anticuerpos con capacidad citotóxica frente a leucocitos del mismo ELA que las MSCs administradas, viéndose además en un animal reactividad cruzada con otro tipo de ELA también incompatible. La respuesta humoral fue variable entre individuos (Pezzanite et al., 2015). Una continuación reciente de este estudio mostró que los anticuerpos anti-ELA generados por la exposición a MSCs ELA-incompatibles eran citotóxicos también frente a las propias MSCs. De forma interesante, el suero del caballo control inyectado con MSCs alogénicas pero ELA-compatibles no mostró anticuerpos citotóxicos frente a MSCs del mismo tipo de ELA (Berglund y Schnabel, 2016). Además, la exposición por distintas vías (intra-arterial, intra-tendinosa e intra-ocular) a BM-MSCs o AT-MSCs alogénicas sin compatibilidad comprobada para ELA también se ha mostrado capaz de generar respuesta humoral alo-específica en el caballo (Owens y Kol, 2016).

9.4. Propiedades inmunológicas de las células madre mesenquimales después de su diferenciación

Hasta ahora se ha descrito que las principales propiedades por las que las MSCs parecen ejercer su efecto beneficioso son sus capacidades para diferenciarse e implantarse en el tejido y su habilidad para regular el entorno mediante sus mecanismos paracrinos e inmunorreguladores, que además les confieren la posibilidad de evadir al sistema inmune, junto con su patrón de expresión del MHC, cuando son administradas de forma alogénica. Una pregunta que surge cuando se estudian estos mecanismos terapéuticos es: si las células son capaces de diferenciarse y también de inmunomodular, ¿qué sucede con sus propiedades inmunológicas cuando se diferencian? Una estrategia terapéutica propuesta para facilitar su anidamiento *in vivo* es el uso MSCs pre-diferenciadas (Ham et al., 2015), en ese caso ¿seguirán siendo capaces de evadir al sistema inmune o causarán una reacción mayor que si se administraran de forma indiferenciada? ¿Qué pasará si además se encuentran con un entorno inflamatorio? Varios estudios han tratado de esclarecer estas preguntas, aunque los resultados

mostrados son bastante contradictorios y actualmente no se conoce de forma certera el efecto *in vivo* de la diferenciación de MSCs alogénicas sobre su perfil inmune.

Al estudiar la expresión de MHC-I y MHC-II en MSCs humanas diferenciadas a los tres linajes y el efecto de la estimulación con IFN γ sobre ellas, se observó que la diferenciación adipogénica disminuía la expresión de MHC-I y que MHC-II no era detectado incluso tras la estimulación con IFN γ . Lo mismo sucedió en la osteogénesis, pero en este caso IFN γ sí incrementó la expresión de MHC-I en los osteoblastos, mientras que las MSCs inducidas a condrocitos expresaron MHC-I pero no MHC-II. Ninguna de estas células indujo una reacción de proliferación en las células T alogénicas y, de hecho, en algunos casos hubo un efecto supresor, aunque podría ser debido a que en el cultivo todavía se encontraran MSCs sin diferenciar. Esto sugiere que las MSCs continuarían teniendo propiedades inmunosupresoras tras la diferenciación, por lo que serían capaces de evadir al sistema inmune (Le Blanc et al., 2003a). En otro estudio, se mostró que las BM-MSCs murinas indiferenciadas y diferenciadas a osteoblasto y estimuladas o no con IFN γ no inducían reacción proliferativa por parte de las células T alogénicas *in vitro*, pese a que la expresión de MHC-II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 aumentó tanto en las MSCs diferenciadas como en las indiferenciadas tras la estimulación con IFN γ , lo cual sugiere que las MSCs diferenciadas a osteoblastos seguirían siendo capaces de evadir al sistema inmune (Zhang et al., 2009b). La diferenciación a linaje neuronal de BM-MSCs humanas produce el aumento en la expresión de MHC-I, MHC-II y CD80, aumentando además la expresión de las dos primeras si las células se someten a IFN γ . Sin embargo, estas células no inducen respuesta proliferativa por parte de células T alogénicas, indicando que la diferenciación al linaje neuronal de las MSCs no afectaría a su inmunogenicidad (Liu et al., 2006a). En otro estudio se observó que los osteoblastos derivados de la diferenciación de las MSCs no expresaron MHC-II y no indujeron proliferación por parte de células T alogénicas, fueron capaces de suprimir su proliferación y secretaron las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- β 1, sugiriendo que las MSCs pueden mantener sus propiedades inmuno-evasivas e inmunomoduladoras *in vitro* tras la diferenciación a osteoblasto. Sin embargo, al utilizarlas en un modelo *in vivo* de injerto de piel, las MSCs diferenciadas parecieron perder sus propiedades inmunorreguladoras (Liu et al., 2006b).

Por otra parte, otros estudios más recientes han mostrado que las MSCs humanas diferenciadas a osteoblasto sí serían capaces de estimular la proliferación de células T alogénicas y además, de expresar las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 sin ser estimuladas con IFN γ , sugiriendo que el proceso de diferenciación de las MSCs las haría más inmunogénicas (Shi et al., 2010). En un modelo murino de infarto de miocardio, la administración de MSCs alogénicas pre-diferenciadas a miocardiocito produjo una reacción de rechazo inmune, mientras que las MSCs alogénicas indiferenciadas persistieron hasta un mes en el miocardio, sin generar efectos adversos e incluso produciendo una mejora funcional (Xia y Cao, 2013). La diferenciación condrogénica de las MSCs condujo a una pérdida en su capacidad para inhibir la proliferación de las células T *in vitro*, lo cual se vio asociado a la disminución en la secreción de NO y PGE2. Además, la diferenciación condrogénica alteraría la inmunogenicidad de las MSCs, haciéndolas capaces de inducir la proliferación de células T alogénicas y aumentando su susceptibilidad a ser lisadas por linfocitos T citotóxicos alo-específicos. La implantación *in vivo* de condrocitos alogénicos derivados de MSCs y

encapsulados en alginato indujo además una respuesta local y sistémica de memoria de las células T (Ryan et al., 2014).

Aunque la bibliografía sobre el tema muestra resultados contradictorios, deja evidencia de que el perfil secretor de las MSCs se ve alterado por la diferenciación, lo que se traduciría en consecuencias negativas para la supervivencia de las MSCs alogénicas *in vivo* una vez diferenciadas, pudiendo afectar potencialmente a su efecto terapéutico. La respuesta de rechazo inmune podría además tener efectos adversos para el individuo, y muchos de los estudios muestran un incremento en la expresión de moléculas inmunogénicas que podría conducir a esta reacción. Sin embargo, otros estudios muestran que no hay un aumento en la inmunogenicidad o en la expresión de MHC y de moléculas co-estimuladoras. La pre-activación con IFN γ de las MSCs diferenciadas podría aumentar su capacidad inmunosupresora *in vivo*, de forma que mantuvieran sus propiedades inmuno-evasivas. Otras estrategias podrían ser la administración de estas células encapsuladas en soportes que las protegieran del reconocimiento por el sistema inmune, o bien la manipulación genética para inhibir la expresión del MHC. Se necesitan más estudios para aclarar las implicaciones de la diferenciación en las propiedades inmunológicas de las MSCs, comenzando por investigar si la respuesta inmune frente a MSCs alogénicas afecta a su potencial terapéutico, cómo afecta la diferenciación a las propiedades paracrinas de las MSCs *in vivo*, o cual es la supervivencia y el estado funcional a largo plazo de las MSCs trasplantadas (Lohan et al., 2014).

10. USO TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PATOLOGÍAS ARTICULARES

10.1. Potencial de las células madre mesenquimales en el tratamiento de la osteoartritis

En Secciones anteriores de esta Memoria ya se ha destacado la importancia de patologías articulares como la osteoartritis, por su carácter degenerativo y progresivo con un papel central de la inflamación y por el elevado número de personas y animales que se ven afectados, así como por la falta de tratamientos realmente eficaces a día de hoy. Una vez vistas las propiedades de las MSCs y en qué mecanismos se basa su potencial terapéutico, es fácil llegar a la conclusión de que éstas constituyen una herramienta prometedora para el tratamiento de la osteoartritis, como ha demostrado su uso en modelos pre-clínicos de lesión articular. Mucho se ha investigado hasta ahora y mucho se debe seguir investigando para comprender totalmente las acciones de la terapia celular y aprender a optimizar variables como el origen, el modo de administración, la dosis a utilizar, el momento de administración o el número de administraciones, así como para lograr aclarar las implicaciones de su uso alogénico y seguir buscando estrategias que puedan mejorar el potencial terapéutico de las MSCs. Actualmente, se considera que el potencial terapéutico de las MSCs en la osteoartritis reside principalmente en sus propiedades paracrinas, por lo que se debe continuar investigando sobre las mismas para mejorar las estrategias terapéuticas (Barry y Murphy, 2013; Schnabel et al., 2013; Wyles et al., 2015).

El interés en usar MSCs como terapia regenerativa en patologías osteoarticulares ha sido ampliamente discutido. Las MSCs se han utilizado asociadas a soportes o andamiajes para facilitar su implantación en defectos focales del cartílago, como las lesiones traumáticas condrales y los defectos osteocondrales, con evidencia clínica de efectividad. Sin embargo, pocos estudios han demostrado un claro beneficio derivado de la aplicación de MSCs en la OA. Hasta la fecha, no se ha encontrado mayor efectividad del trasplante de MSCs frente al trasplante de condrocitos cuando se combinan con el uso de soportes (Nejadnik et al., 2010). Sin embargo, las MSCs ofrecen la posibilidad de un abordaje más sencillo inyectándolas directamente de forma intraarticular sin necesitar sistema de andamiaje (Soler et al., 2016).

Las propiedades paracrinas de las MSCs parecen jugar un papel esencial en su potencial terapéutico mediante la estimulación de la regeneración endógena y de la proliferación de progenitores del tejido, contrarrestando la apoptosis y contribuyendo a la protección y reparación del cartílago (da Silva Meirelles et al., 2009). La proliferación de condrocitos en cocultivo con MSCs ha sido demostrada *in vitro* (Wu et al., 2013), así como la reducción en la expresión de marcadores hipertróficos, fibróticos e inflamatorios en condrocitos de pacientes con OA (Maumus et al., 2013). Estos efectos, como ya se ha expuesto anteriormente, parecen dirigidos por diversos mediadores secretados por las MSCs (Manferdini et al., 2013). Pero además del potencial antiinflamatorio y de estimulación de la regeneración endógena del cartílago, cabe recordar que las MSCs podrían diferenciarse *in vivo* y reemplazar de forma directa al cartílago dañado, aunque este mecanismo podría conllevar una reducción en su potencial inmunosupresor y un posible aumento en su inmunogenicidad (Lohan et al., 2014). Distintos modelos experimentales de OA han mostrado el potencial regenerativo de las MSCs, pero los mecanismos exactos por los cuales desarrollarían su efecto beneficioso en el cartílago no están del todo claros, así como tampoco lo están las implicaciones de su diferenciación condrogénica *in vivo*. Sin duda, la variedad de modelos empleados y las diferencias entre los protocolos utilizados (origen de las MSCs, dosis, forma y momento de administración, etc.) dificultan la obtención de conclusiones definitivas, pero en su conjunto aportan evidencia del potencial de esta terapia (Pers et al., 2015).

10.2. Uso de las células madre mesenquimales en patologías articulares equinas

Como ya se ha mencionado, el caballo tiene un gran valor en la investigación de tratamientos articulares, tanto como paciente como modelo animal con potencial aplicación a la especie humana, lo que hace que la investigación en este área sea activa y de particular importancia (Figura 24).



Figura 24: Paciente equino con osteoartritis temprana en las articulaciones distales del tarso recibiendo tratamiento intraarticular con células madre mesenquimales equinas en el HV-UZ.

Existe un número creciente de estudios sobre el efecto de la administración intraarticular de MSCs como tratamiento de distintas condiciones patológicas de la articulación equina. Mientras que la mayoría de ellos se centra en el uso autólogo de MSCs (Frisbie et al., 2009; McIlwraith et al., 2011; Ferris et al., 2014a; Goodrich et al., 2016;), algunos comienzan también a explorar el efecto de las MSCs alogénicas (Broeckx et al., 2014a; Broeckx et al., 2014b) como estrategia terapéutica por las ventajas ya descritas. Además, la administración de varias dosis de MSCs puede aumentar sus efectos beneficiosos (Hatsushika et al., 2014), lo que podría conformar otro abordaje terapéutico. Sin embargo, las consideraciones sobre la inmunogenicidad de las MSCs y la posibilidad de que induzcan memoria inmunológica deben ser tenidas en cuenta. Hasta la fecha, el uso repetido de MSCs alogénicas combinadas de varios donantes en articulaciones equinas sanas ha demostrado ser seguro en términos de respuesta clínica (Ardanaz et al., 2016). Otros estudios en articulaciones sanas de caballo han mostrado una ligera reacción inflamatoria local tras la inyección intraarticular de MSCs, tanto autólogas como alogénicas (Carrade et al., 2011). Además, la administración intraarticular en articulaciones sanas de MSCs autólogas, autólogas genéticamente modificadas, alogénicas o xenogénicas produce una reacción inflamatoria local transitoria, que es mayor para las MSCs alogénicas y xenogénicas. Sin embargo, la respuesta inmune observada fue similar entre MSCs autólogas y alogénicas, pero mayor para xenogénicas (Pigott et al., 2013a, Pigott et al., 2013b). En resumen, la administración única o repetida de MSCs autólogas o alogénicas en articulaciones equinas sanas ha mostrado ser segura, pero en ocasiones produce una respuesta inflamatoria local transitoria de ligera a moderada.

El uso de soportes o andamiajes para vehiculizar las MSCs ha sido estudiado como estrategia en el tratamiento de defectos focales del cartílago y del menisco en caballos. La reparación de lesiones de grosor completo del cartílago en un modelo equino fue mejorada mediante el uso de soportes de fibrina generados utilizando plaquetas, sin encontrar diferencias entre el uso del soporte por sí solo o cargado con MSCs autólogas (Goodrich et al., 2016). El uso de AT-MSCs y BM-MSCs autólogas en soportes de colágeno reveló eficacia para “rellenar” el defecto en un modelo de daño de menisco (Gonzalez-Fernandez et al., 2016) y el uso de esponjas bicapa de gelatina y fosfato de tri-calcio cargadas con MSCs autólogas, PRP y BMP-2 mejoró la reparación de defectos osteocondrales en la babilla y el tarso equino (Seo et al., 2013; Tsuzuki et al., 2013; Seo et al., 2015;). La administración de MSCs autólogas en un soporte de fibrina auto-polimerizante en defectos del grosor completo del cartílago proporcionó mejor calidad del tejido de reparación un mes tras la implantación, incluyendo un

mayor contenido en colágeno tipo II. Sin embargo, 8 meses después no hubo diferencias entre el grupo control y el tratado. Estos resultados sugieren que las MSCs son capaces de mejorar la respuesta de reparación temprana del cartílago, pero no logran proveer mejores hallazgos bioquímicos o histopatológicos a largo plazo (Wilke et al., 2007).

La inyección de MSCs autólogas libres (sin soporte) en lesiones naturales de la babilla (en menisco, ligamentos o cartílago) tras la intervención artroscópica mostró mejores resultados, en términos de retorno al nivel de actividad previo, que el uso aislado de la cirugía. Los resultados fueron especialmente buenos en aquellos casos en que la afección estaba en el menisco, sugiriendo de nuevo que las MSCs parecen ejercer mayores beneficios en tejidos blandos. En términos de reacción inflamatoria a la administración de MSCs, sólo se encontró en 3 de los 33 caballos tratados (Ferris et al., 2014a). La administración intraarticular de MSCs tras usar la técnica artroscópica de microfractura para tratar defectos focales del cartílago en un modelo equino experimental reveló hallazgos clínicos e histopatológicos similares empleando o no MSCs, pero la calidad del cartílago reparado fue mayor en los animales que recibieron células tras la cirugía (McIlwraith et al., 2011). Estos resultados sugieren que las MSCs podrían mejorar los resultados en combinación con técnicas quirúrgicas.

En resumen, las MSCs vehiculizadas en soportes y/o combinadas con el uso de cirugía han mostrado buenos resultados en lesiones focales del cartílago y menisco, aunque se debe seguir investigando para aclarar el efecto de introducirlas en soportes sobre su viabilidad, capacidad de migración y propiedades paracrinas (Colbath et al., 2017b).

Además de en modelos de lesión focal del cartílago, las MSCs se han estudiado como tratamiento para la OA equina en modelos experimentales y casos naturales, pero el número de estudios evaluando su efecto en esta patología es más limitado y los resultados menos concluyentes. El uso de BM-MSCs autólogas en un modelo experimental de OA equina post-traumática no mostró efectos beneficiosos excepto por una reducción en la concentración de PGE2 en líquido sinovial (Frisbie et al., 2009). Por otra parte, el uso de MSCs autólogas en un modelo experimental distinto con mayor componente inflamatorio (OA inducida por inyección intraarticular de Anfotericina-B) sí mostró efectos beneficiosos de las MSCs sobre el cartílago, especialmente a corto plazo y si las MSCs se administraban de forma temprana. En este estudio se administró una dosis de MSCs autólogas a las 3, 6 o 9 semanas tras haber inducido la lesión, y se realizó el seguimiento hasta 1, 2 y 6 meses después. La administración más temprana de MSCs produjo mejores resultados, que comenzaron a verse para la mayoría de parámetros estudiados a partir de los dos meses (Mokbel et al., 2011). Los diferentes resultados entre uno y otro estudio pueden ser debidos a varias diferencias entre ellos, como el tipo de modelo utilizado. El efecto más potente de las MSCs observado en el modelo creado con Anfotericina-B puede ser debido a que se crea una inflamación articular más severa (Colbath et al., 2017b). Como ya se ha mencionado anteriormente, esta mayor efectividad de las MSCs en situación inflamatoria ha sido descrita *in vitro* y en otros modelos experimentales *in vivo* de patología articular (Manferdini et al., 2013; Schelbergen et al., 2014), pudiendo ser debida a una mayor activación de las MSCs. El uso de MSCs autólogas en OA natural equina se ha evaluado en casos de esparaván, donde las AT-MSCs proporcionaron un mejor resultado clínico a los tres meses que el uso intraarticular de córtico-esteroides (betametasona) (Nicpon et al., 2013).

El uso alogénico de MSCs también se ha comenzado a estudiar en patologías articulares equinas. En un modelo de sinovitis inducida por LPS, el uso de MSCs alogénicas redujo significativamente el recuento de células nucleadas y de neutrófilos en líquido sinovial (Williams et al., 2016). En casos naturales de OA en distintas articulaciones, la administración de MSCs alogénicas indiferenciadas o diferenciadas a condrocito, solas o en combinación con PRP, reveló que la combinación de células (especialmente las pre-diferenciadas a condrocitos) y PRP mejoraba el resultado clínico tanto a corto plazo (6 semanas) como a largo (12 meses) (Broeckx et al., 2014b). El mismo grupo de investigación mostró resultados alentadores en términos de retorno al trabajo también en casos de OA natural después el uso de MSCs alogénicas indiferenciadas o diferenciadas a condrocitos sin combinar con otros productos. El uso de MSCs diferenciadas a condrocitos logró un mayor porcentaje de animales recuperando su actividad previa. Además, cabe remarcar que solo 3 de los 165 caballos incluidos en el estudio desarrollaron una respuesta inflamatoria tras la administración intraarticular de MSCs alogénicas. Por otra parte, la eficacia de las MSCs pareció depender del tipo de articulación tratada, mostrando los mejores resultados en menudillos e interfalangianas distal y proximal con MSCs inducidas a condrocito, mientras que estas mismas células en la babilla disminuyeron la tasa de retorno al trabajo (Broeckx et al., 2014a).

Las MSCs equinas se han empleado además de forma xenogénica en otros modelos animales de patología articular como el conejo (Saulnier et al., 2015) y el ratón (Maumus et al., 2016). En ninguno de los dos estudios las MSCs equinas produjeron reacción adversa al ser administradas xenogénicamente. La administración temprana de MSCs en el modelo cunícola mostró mejores resultados en cuanto a mayor expresión de colágeno tipo II en cartílago, remarcando de nuevo la importancia del tratamiento temprano. Los resultados de este estudio sugirieron además que la principal diana de las MSCs en la articulación es la membrana sinovial, en la que fueron capaces de disminuir la expresión de enzimas de degradación (MMP-1, MMP-3 y MMP-13) y de mediadores inflamatorios (IL-1 β). De esta forma, las MSCs serían capaces de promover un ambiente anti-catabólico mediante la regulación de los sinoviocitos (Saulnier et al., 2015). En el modelo murino de OA inducida por colagenasa, las AT-MSCs equinas pre-estimuladas con IFN γ no produjeron efectos adversos y, de hecho, mostraron mayor efecto condroprotector que las MSCs no estimuladas (Maumus et al., 2016).

La variabilidad entre modelos y protocolos de estudio no permiten extraer conclusiones firmes del uso de MSCs en el tratamiento de la OA equina, pero de los resultados obtenidos hasta ahora se puede concluir que el momento de administración es importante y que es más efectivo realizarla de forma temprana, lo que en ocasiones puede estar limitado por el uso autólogo. El estudio del uso de MSCs alogénicas en patologías articulares equinas es más limitado, pero parece que su administración intraarticular es segura en términos de efectos adversos, aunque se desconoce la supervivencia de estas células en el ambiente *in vivo* del receptor y la posible limitación sobre su efectividad que el reconocimiento alogénico podría suponer. Otro hallazgo importante en estos modelos es que el uso de las MSCs parece generar beneficios principalmente a corto plazo, pero éstos no logran mantenerse de forma prolongada, lo que quizá podría mejorarse empleando dosis repetidas de MSCs. El uso de dosis repetidas de MSCs alogénicas ha mostrado ser clínicamente seguro en articulaciones sanas equinas (Ardanaz et al., 2016) y en otros modelos animales de patología articular (Hatsushika

et al., 2014), pero se desconoce la respuesta inmunológica o el efecto en situación patológica en el caballo.

10.3. Futuro en la investigación de las células madre mesenquimales como tratamiento para la osteoartritis

En el caballo, la heterogeneidad entre estudios dificulta la obtención de conclusiones extrapolables a la práctica clínica. Sin embargo, los resultados obtenidos están de acuerdo en que esta terapia celular podría aportar grandes beneficios, por lo que su investigación debe continuar. Un paso difícil, aunque crucial para poder avanzar, es la estandarización en el uso de modelos, de parámetros evaluados o de protocolos de administración. Respecto a estos últimos, varias preguntas necesitan respuesta para poder mejorar el uso clínico de las terapias celulares. Algunos puntos clave son el momento de administración, la dosis a utilizar, la mejor fuente de MSCs, la mejor forma de vehicularlas o el uso de administraciones repetidas para mejorar los resultados a largo plazo (Pers et al., 2015; Wyles et al., 2015).

Las ventajas del tratamiento alogénico ya han sido expuestas, pero cabe incidir de nuevo en que la inmunogenicidad de las MSCs es un punto clave a estudiar para lograr terapias alogénicas seguras y efectivas. El desarrollo de estrategias para reducir la inmunogenicidad, como el estudio de la compatibilidad entre donante y receptor o la manipulación genética de las MSCs, necesitan seguir siendo investigadas (Lohan et al., 2014).

De todo lo discutido a lo largo de la Revisión Bibliográfica de la presente Tesis Doctoral, queda claro que la OA es una patología de gran impacto tanto en personas como en caballos, siendo éstos además un buen modelo experimental, y que a día de hoy no tiene un tratamiento definitivo. Las diversas propiedades mostradas por las MSCs han despertado el interés de su uso como terapia regenerativa para esta patología. Sin embargo, muchas cuestiones necesitan seguir siendo investigadas. Algunos puntos clave para el avance en el diseño de estrategias terapéuticas son la optimización de variables en el protocolo de tratamiento, investigar las implicaciones de la inmunogenicidad de las MSCs en su uso alogénico y seguir estudiando las propiedades de estas células en las que residen sus beneficios. Aunque los mecanismos de acción exactos no están totalmente claros, parece que las propiedades paracrinas de las MSCs serían las principales responsables de su potencial terapéutico, mediante la estimulación de la reparación endógena y por su capacidad para regular el ambiente inflamatorio y catabólico de la articulación osteoartítica. De aquí se desprende la necesidad de seguir investigando sobre estas propiedades en modelos pre-clínicos, así como de diseñar estrategias que permitan aumentar este potencial terapéutico mediante la estimulación de las propiedades inmunomoduladoras. Una herramienta para este fin que ya se ha comentado en apartados anteriores podría ser la pre-estimulación de las MSCs con citoquinas proinflamatorias, que constituye el tema central de la presente Tesis Doctoral. En esta potencial estrategia terapéutica se basa la hipótesis de partida de esta Tesis y se derivan los objetivos que se plantean a continuación.

II. HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS



La hipótesis de partida de la presente Tesis Doctoral es que las MSCs equinas pueden aumentar sus propiedades inmunorreguladoras mediante un estímulo inflamatorio adecuado *in vitro*, lo que se podría traducir en un mayor potencial terapéutico *in vivo*, aunque también debe valorarse la posibilidad de que la estimulación inflamatoria pudiera acarrear efectos no deseables sobre las MSCs, como pueden ser un aumento en la inmunogenicidad o una disminución de su viabilidad y plasticidad.

Por lo tanto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es estudiar el efecto *in vitro* de distintos estímulos inflamatorios sobre las propiedades de las BM-MSCs equinas, con especial énfasis en su inmunogenicidad y su capacidad inmunomoduladora, así como analizar la seguridad y eficacia *in vivo* tanto de MSCs sin estimular como pre-estimuladas en un modelo de patología articular equina.

Para la consecución de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Valorar el efecto *in vitro* sobre las propiedades de las BM-MSCs equinas de un entorno inflamatorio que simule las condiciones naturales de inflamación articular.
2. Estudiar el efecto *in vitro* de la activación con citoquinas proinflamatorias de las propiedades de las BM-MSCs equinas.
3. Determinar las condiciones de estimulación *in vitro* apropiadas que permitan aumentar el potencial inmunorregulador de las BM-MSCs equinas sin detrimento de otras de sus propiedades.
4. Evaluar el uso de nuevos biomarcadores en suero y líquido sinovial en un modelo de lesión articular en el caballo, con la finalidad de contribuir a la monitorización de la respuesta inflamatoria durante el tratamiento con BM-MSCs.
5. Estudiar el efecto *in vivo* de las BM-MSCs equinas alogénicas, tanto no estimuladas como estimuladas con las condiciones establecidas en el objetivo 3, en un modelo de patología articular equina.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



A continuación, se procederá a describir brevemente y de forma general las técnicas y materiales usados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, indicando el objetivo con el que se emplearon y en qué Manuscritos han sido utilizados. Dentro de cada Manuscrito podrá encontrarse de forma más detallada el material y la metodología, así como el diseño experimental y el análisis estadístico, propios de cada uno de ellos.

1. Animales

El caballo ha sido el animal objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Los animales se utilizaron con tres finalidades:

- Obtención de médula ósea a partir de la cual se aislaron las BM-MSCs para los ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- Estudio del uso de la proteína de fase aguda haptoglobina como biomarcador inflamatorio en el caballo.
- Creación de un modelo de lesión articular en el que se estudiaron *in vivo* los efectos de las BM-MSCs.

En los Manuscritos I y II, los caballos utilizados fueron pacientes del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HV-UZ) con diferentes tipos de lesiones del aparato locomotor, de los que se obtuvieron muestras de médula ósea y líquido sinovial. Se utilizaron cuatro caballos machos castrados de diferentes razas y de entre 6 y 12 años de edad y 450-500 kg de peso.

Para la elaboración del Manuscrito III se obtuvo médula ósea de cuatro de los animales incluidos en el ensayo *in vivo* descrito en el Manuscrito V (ponis Shetland, machos castrados de entre 4 y 7 años de edad y entre 138 y 162 kg de peso).

En el Manuscrito IV se obtuvieron muestras de sangre y líquido sinovial de 12 ponis Shetland incluidos en el ensayo *in vivo* recogido en el Manuscrito V (machos castrados, 100-150 kg de peso, edad 3-5 años). Además, en este Manuscrito se utilizaron muestras de sangre y líquido sinovial obtenidas con fines diagnósticos de cinco pacientes equinos del HV-UZ con distintas patologías (cólico médico o quirúrgico, patología articular).

Para el ensayo *in vivo* llevado a cabo en el Manuscrito V se utilizaron 18 ponis Shetland de entre 3 y 7 años de edad y 100-165 kg de peso para la creación de una lesión articular. En este grupo se incluyen los animales que fueron utilizados para los ensayos realizados en los Manuscritos III y IV ya que parte de las muestras obtenidas durante el desarrollo del Manuscrito V (médula ósea, sangre, líquido sinovial) se aprovecharon para llevar también a cabo los estudios recogidos en los Manuscritos III y IV.

Se determinó el buen estado de salud general en los animales donantes de médula ósea, así como en todos los animales experimentales antes de iniciar el estudio. En éstos, además, se determinó la ausencia de anomalías en las articulaciones radio-carpales. Todos los procedimientos de toma o cesión de muestras implicando a pacientes del HV-UZ se realizaron con consentimiento informado de los propietarios y de acuerdo a la regulación de

bienestar animal de la Universidad de Zaragoza. Todos los procedimientos realizados sobre los animales experimentales incluidos en el ensayo *in vivo* del Manuscrito V (cuyas muestras también se emplearon en el desarrollo de los Manuscritos III y IV) recibieron la aprobación de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza PI 31/11 (Anexo 4). El uso y cuidado de todos los animales se realizó de acuerdo a la legislación española sobre Protección Animal RD53/2013, en cumplimiento con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 para la protección de animales utilizados en experimentación y con otros fines científicos.

2. Aislamiento, cultivo, caracterización y criopreservación de células madre mesenquimales equinas de médula ósea

Estos procedimientos se han empleado en los Manuscritos I, II, III y V con el objetivo de disponer de BM-MSCs equinas caracterizadas tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo*. Toda la metodología referente a cultivo celular (incluida la caracterización, proliferación y diferenciación) fue puesta a punto y descrita previamente por el propio grupo de investigación. La metodología fue la misma en todos los estudios y se describe brevemente a continuación.

Se obtuvieron entre 20 y 40 ml de médula ósea del esternón en jeringas heparinizadas utilizando una aguja Jamshidi de 11G con el animal bajo sedación. Las células mononucleares se aislaron por gradiente de centrifugación con Lymphoprep (Atom) y se sembraron en medio de cultivo consistente en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) bajo en glucosa suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (FBS) (todo de Sigma-Aldrich). A las 24, 48 y 72 horas tras la extracción, las células se lavaron con PBS (Gibco) y se reemplazó el medio de cultivo para eliminar las células no adherentes al plástico. Las células se expandieron cambiando el medio de cultivo cada 3 días hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. En este punto, las células se separaron de la superficie de la placa de cultivo utilizando 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) y se contaron con un hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizando azul de tripano para excluir las células muertas. Las células volvieron a sembrarse y se expandieron en las mismas condiciones hasta el pase 3. Las condiciones de cultivo fueron siempre 37°C y 5% de CO₂.

Al llegar al pase 3, las células se caracterizaron por su fenotipo y su capacidad de diferenciación tri-linaje. El fenotipo se estudió mediante el análisis de la expresión génica de los marcadores *CD90*, *CD105*, *CD44*, *CD73*, *CD34*, *CD45*, *MHC-I* y *MHC-II* utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y por la expresión en la superficie celular de las moléculas *CD90*, *CD105*, *CD44*, *MHC-I* y *MHC-II* mediante citometría de flujo. Las técnicas de RT-qPCR y citometría de flujo se verán con mayor detalle en los apartados correspondientes.

La diferenciación a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico se indujo utilizando medios de cultivo suplementados con las moléculas apropiadas y se comprobó mediante tinciones específicas y RT-qPCR, como se describirá más adelante. Las BM-MSCs caracterizadas en pase 3 se crio-preservaron a -80°C en un medio consistente en 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) y 90% de FBS hasta el momento de su utilización.

3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Esta metodología se ha empleado en el desarrollo de los experimentos incluidos en los manuscritos I, II, III y V con distintas finalidades. En todos ellos se ha utilizado en el proceso de caracterización de las BM-MSCs para estudiar su fenotipo y su capacidad de diferenciación a los distintos linajes. En los manuscritos I, II y III esta técnica se ha empleado además para analizar el cambio en el perfil de expresión génica relacionado con las diversas propiedades estudiadas en las MSCs (inmunomodulación, inmunogenicidad, viabilidad, apoptosis). En el Manuscrito V, la RT-qPCR se empleó además para el estudio de la expresión génica en muestras de cartílago y membrana sinovial.

La técnica de la RT-qPCR se basa en el uso de fluorocromos que se intercalan en la molécula de DNA, de forma que a mayor número de copias de un fragmento durante la amplificación, mayor fluorescencia se registrará.

Los métodos para la extracción del RNA mensajero (mRNA) y su posterior retro-transcripción a DNA complementario (cDNA) dependieron del tipo de muestra. Para la extracción de mRNA a partir de cultivos celulares, se utilizaron los kits RNASpin Mini RNA Isolation (GE Healthcare) y Cells-to-cDNA II (Ambion). En el caso de los tejidos sólidos (cartílago y membrana sinovial), las muestras se pulverizaron previamente y se aplicó el método del Trizol (Qiazol, Qiagen)/Cloroformo/Isopropanol (Chou et al., 2013). Una vez obtenido el mRNA, el DNA genómico se eliminó con el kit DNase Turbo (Ambion) y la retrotranscripción a cDNA se realizó con el kit Superscript Reverse Transcriptase II (Life Technologies). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicado en un StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem) utilizando el Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) y los cebadores correspondientes (Tabla 8). Todos los protocolos se realizaron según las especificaciones del fabricante. El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: 20'' a 95°C para la activación, seguidos de 40 ciclos de 3'' a 95°C y 30'' a 60°C. Al final de los 40 ciclos de cada reacción se realizó una curva de disociación para comprobar la especificidad de los cebadores. Los niveles de expresión génica se obtuvieron mediante cuantificación relativa empleando los métodos comparativos Δ Ct (Manuscritos I, II y III) y $\Delta\Delta$ Ct (Manuscrito V). El factor de normalización para cada muestra se calculó como la media geométrica de la expresión de dos genes normalizadores, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y beta-2 microglobulina (*B2M*).

GEN	Número de acceso / Bibliografía	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño amplicon (pares de bases)
HOUSE-KEEPING			
GAPDH	NM_001163856	F:GGCAAGTTCATGGCACAGT R:CACAACATATTCAGCACCAGCAT	128
B2M	NM_001082502.2	F:TCGTCCTGCTCGGGCTACT R:ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
MOLÉCULAS DE SUPERFICIE UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN			
CD90	EU881920	F:TGCGAACTCCGCCTCTCT R:GCTTATGCCCTCGCACTTG	93
CD105	XM_001500078	F:GACGGAAAATGTGGTCAGTAATGA R:GCGAGAGGCTCTCCGTGTT	100

GEN	Número de acceso / Bibliografía	Secuencia del cebador (5'–3')	Tamaño amplicon (pares de bases)
MOLÉCULAS DE SUPERFICIE UTILIZADAS EN LA CARACTERIZACIÓN			
CD73	XM_001500115	F:GGGATTGTTGGATACACTTCAAAG R:GCTGCAACGCAGTGATTCA	90
CD44	NM_001085435	F: CCCACGGATCTGAAACAAGTG R: TTCTGGAATTTGAGGTCTCCGTAT	95
CD45	AY_114350	F:TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R:ACATTTTGGGCTTGTCTGTAAC	100
CD34	XM_001491596	F:CACTAAACCTCTACATCATTTTCTCCTA R:GGCAGATACCTTGAGTCAATTCA	150
MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA			
ALP	XM_001504312	F: GATGGCCTGAACCTCATCGA R: AGTTCGGTCCGGTCCAGAT	92
RUNX2	XM_001502519.3	F: CTCCAACCCACGAATGCACTA R: CGGACATACCGAGGGACATG	80
MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA			
LPL	XM_001489577	F:TGTATGAGAGTTGGGTGCCAAA R:GCCAGTCCACCACAATGACAT	70
PPAR γ	XM_001492411	F:TGCAAGGGTTTCTCCGGA R:GCAAGGCATTTCTGAAACCG	104
MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA / SÍNTESIS ECM CARTÍLAGO			
ACAN	AF019756	F: CTACGACGCCATCTGCTACA R: ACCGTCTGGATGGTGATGTC	96
COL2A1	XM_005611082.1	F: TTAGACGCCATGAAGGTTTTCTG R: CTCTTGCTGCTCCACCAGTTCT	101
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS			
VCAM-1 (CD106)	DQ246452	F: TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R: TTGATGGTCTCCCCGATGA	127
ALCAM (CD166)	XM_001494152	F: TCACGACTCATCGAGCACATC R: GGCGAACTTAAAGTCAGTGGCA	118
CXCR4	XM_001490165	F: TGCAGCAGCAGGTAGCAAAGT R: ATATACGGAACCCGTCCATGG	97
MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LOS MECANISMOS INMUNOMODULADORES PARACRINOS			
COX-2	AB041771	F: GTTTGCAATTTTTGCCAGC R: ACTTAAATCCACCCGTGACC	103
IDO	XM_001490681	F: TCATGACTACGTGGACCCAAA R: CGCCTTCATAGAGCAGACCTTC	104
iNOS	AY027883	F: CCAACAATGGCAACATCAGGT R: TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
IL-6	EU438770	F: AACAGCAAGGAGGTAAGGCA R: CAGGTCTCCTGATTGAACCCA	95
TGF β -1	AF175709	F: GTCCTTTGATGTCACCGGAGT R: TGGAAGTGAACCCGTT	137
TSG-6	AY919871.1	F: GGAAGAGGCTCACGGATGG R: TTCCAGACCGTCTCTCTGT	101
IL-10	EU438771	F: GACATCAAGGAGCACGTGAACT R: TGGAGCTTACTGAAGGCACTCT	140
MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA			
MHC-I	AB525081	F: CGTGAGCATCATTGTTGGC R: TCCCTCTTTTTACCTGAGG	92
MHC-II	NM_001142816	F: AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R: CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172

GEN	Número de acceso / Bibliografía	Secuencia del cebador (5'–3')	Tamaño amplicon (pares de bases)
MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA			
CD40	AY514017	F: ACAAATACTGCGACCCCAACC R: TTTCACAGGCATCGCTGGA	114
CD40L	XM_001490011	F: AGTTCGAAGGCTTCGTCAAGG R: CGCAATTTGAGGCTCCTGAT	101
CD80	Krampera 2006	F: CAGGAAAGTTGGCTCTGACCA R: TCTCCATTGTGATCCTGGCTC	135
CD86	De Schauwer 2014	F: AGTATAAAGGCCGACAAGC R: CCTGGGTAGATGAGCAGGT	247
ENZIMAS RELACIONADAS CON LA PROLIFERACIÓN CELULAR			
COX1	DQ246452	F: TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R: TTGATGGTCTCCCGATGA	127
Ciclina D2	XM_001494152	F: TCACGACTTCATCGAGCACATC R: GGCGAACTTAAAGTCAGTGGA	118
MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA APOPTOSIS			
BAX	XM_005596728.1	F: AGTGTCTCAAGCGCATCGG R: CACTCGGAAAAAGACCTCGC	104
BCL-2	Ryhner, 2008	F: GCCTATCTGGGCCACAAGT R: TTTCCCTTTGGCAGTAAATAGC	200
BCL-XL	XM_001499714	F: GTCGGATCGCAACCTGGAT R: GTTCCCGTAGAGTTCCACAAAGG	100
CASP8	XM_001496753.2	F: CAATCCGATAGATGCACCAGG R: AGGAGAATGCAGTCGTTGCC	101
HSP-27	XM_001500212	F: GGCATTATGTAGAATCCATTGATCCT R: CGGGCTGGTGATCTTCT	78
CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS			
TNF α	EU438779	F: CATGTTGTAGCAAACCCCAA R: TACAGCCCATCCAATGGTACC	125
IFN γ	EU000433	F: AACCTAAAGGAATATTTAACGCAAGT R: TTTTGTCACTATCCTTTCCAGTT	101
IL-1 β	NM_001082526.1	F: CCCACCCTACAGCTGGAGAC R: TCCACGTTGCCCTTGATTTT	101
GENES RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE LA ECM DEL CARTÍLAGO			
COL1A1	AF034691	F: ACACAGAGGTTTCAGTGGTTTGG R: CACCATGGCTACCAGGTTTCC	89
COMP	AF325902	F: GGCGACGCGCAAATAGA R: GCCATTGAAGGCCGTGTAA	111
GENES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN/REMODELACIÓN DE LA ECM DEL CARTÍLAGO			
MMP-3	NM_001082495	F: TGATGTGACTGGCATTCAATCC R: ATCGCACATGGCTAGTGTTC	112
MMP-13	NM_001081804	F: CCGAACCTAAACATCCCAA R: GATGTAGGCGCCAGAAGAATCT	121
TIMP-2	XM_005597879.1	F: GAATGCAAGATCACGCGCT R: TGCCCGTTGATGTTCTTCT	101

Tabla 8.- Cebadores empleados en los distintos estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. Se muestran el número de acceso de la secuencia génica a partir de la cual se diseñó cada pareja de cebadores, la secuencia de cada cebador y tamaño del amplicón generado. Los genes están agrupados según las funciones o la implicación de las moléculas que codifican.

4. Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó en la investigación desarrollada en los manuscritos I, II, III y V como parte de la caracterización de las BM-MSCs. En el manuscrito I, además, se utilizó para el estudio de la expresión de moléculas de superficie tras someter a las BM-MSCs a diferentes estímulos. Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos con reactividad frente a la molécula de estudio, a la cual se unen de forma específica. Al hacer pasar a las células marcadas por una fina columna, puede determinarse el porcentaje de células positivas para la molécula de estudio, así como la intensidad de expresión de la molécula (*mean fluorescence intensity*, MFI).

Los anticuerpos utilizados fueron de tipo monoclonal y conjugados directamente con distintos fluorocromos: CD90-PE (BD Pharmingen), CD105-FITC (R&D Systems), CD44-FITC (Abcam), HLA-ABC-FITC (Beckman Coulter), HLA-DR-APC (Immunostep) y IL-6-PE (BD Pharmingen). La reactividad de los anticuerpos frente a la especie equina había sido previamente descrita por nuestro grupo o bien fue testada con anterioridad a su uso. Las BM-MSCs se suspendieron en una solución de 2 mM EDTA en PBS y se incubaron con los anticuerpos monoclonales correspondientes a 4°C durante 15'. Tras la incubación, se lavó el exceso de anticuerpo y las BM-MSCs marcadas fueron analizadas con el citómetro de flujo FACSARIA (BD Biosciences). Los datos fueron analizados con el *software* FACSDIVA 5.0.1 seleccionando en primer lugar la población celular por su tamaño y morfología (FSC vs SSC). Después, se excluyeron las células muertas mediante tinción con SYTOX (ThermoFisher Scientific) y los dobletes y, por último, se obtuvo el porcentaje de células positivas y el valor de MFI en cada muestra mediante el análisis de fluorescencia.

5. Ensayo de proliferación

La proliferación de las BM-MSCs se estudió como parte de los Manuscritos II y III mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Cuando este compuesto es reducido por las células vivas se forma otro compuesto en forma de cristales en una relación directamente proporcional al número de células viables. Estos cristales son posteriormente solubilizados, formándose un compuesto coloreado cuya intensidad puede determinarse mediante espectrofotometría. Utilizando una recta de calibrado, puede extrapolarse la cantidad de células viables según la intensidad del color producido.

Para realizar este ensayo, se cultivaron triplicados de cada muestra utilizando una placa de 96 pocillos para cada tiempo a estudiar (7 días). A de cada tiempo se realizó el ensayo de MTT según las especificaciones del fabricante y la densidad óptica de cada pocillo se leyó utilizando un espectrofotómetro Biotek Synergy HT a 570 nm de longitud de onda. El número de células viables se extrapoló de una recta estándar construida con 9 puntos en triplicado de concentraciones crecientes de BM-MSCs. Además, el tiempo requerido para que la población celular se duplicase (*cell doubling time*, DT) se calculó mediante las fórmulas $CD = \ln \left[\frac{N_f}{N_i} \right] / \ln 2$ y $DT = CT / CD$, donde DT = tiempo de doblaje celular; Nf = número final de células; Ni = número inicial de células; y CD = número de doblajes celulares.

6. Ensayos de diferenciación

Los ensayos de diferenciación tri-linaje se incluyen en los Manuscritos I, II, III y V, bien como parte de la caracterización de las células, o bien para estudiar la influencia de distintas condiciones sobre la capacidad de diferenciación de las BM-MSCs equinas. Los ensayos de diferenciación se basan en la adición de ciertas moléculas al medio de cultivo de las BM-MSCs con el fin de inducir su diferenciación a un linaje concreto.

La valoración del potencial de diferenciación se realizó mediante tinciones específicas de componentes producidos en el proceso de diferenciación y mediante el análisis de la expresión génica de marcadores de diferenciación de cada linaje por RT-qPCR. Los ensayos de diferenciación se realizaron en triplicado y con control negativo (medio de cultivo basal) para cada muestra.

6.1. Diferenciación osteogénica

Se sembraron las BM-MSCs a 20.000 células/cm² con medio osteogénico, consistente en el medio basal previamente descrito suplementado con 10nM de dexametasona, 10mM de β -glicerofosfato y 100 μ M de ascorbato-2-fosfato (todos de Sigma-Aldrich). Las BM-MSCs se mantuvieron en este medio durante 7 días, con cambios de medio cada 3 días, a 37°C y 5% CO₂. Tras este tiempo, la diferenciación osteogénica se comprobó mediante la tinción específica de depósitos de calcio con rojo de alizarina. Para esta tinción, las células se fijaron con etanol 70% frío durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 minutos con rojo de alizarina al 2% y pH 4,6.

6.2. Diferenciación adipogénica

Las BM-MSCs se sembraron a densidad de 5.000 células/cm² y se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 15 días en medio adipogénico, con cambios de medio cada tres días. Éste se compuso del medio de cultivo basal previamente descrito suplementado con 1 μ M de dexametasona, 500 μ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 200 μ M de indometacina y 15% de suero de conejo (todo de Sigma-Aldrich). La tinción específica rojo oleoso se utilizó para visualizar las gotas lipídicas formadas en el interior de las células. Para realizarla, las células se fijaron con formalina al 10% (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se tiñeron con el rojo oleoso (Sigma-Aldrich) diluido al 0,3% en una solución 60:40 de isopropanol : agua destilada durante 30' a 37°C.

6.3. Diferenciación condrogénica

Aproximadamente 300.000 BM-MSCs de cada muestra se colocaron en tubos de polipropileno de fondo cónico y se centrifugaron para formar un pellet y permitir la diferenciación en tres dimensiones. A cada tubo se añadieron 400 μ L de medio de inducción condrogénico, compuesto por DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FBS, 10 ng/mL de TGF- β 3 (R&D Systems), ITS+ premix (Beckton Dickinson), 40 μ g/mL prolina (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL de ascorbato-2-fosfato y 0,1 μ M de dexametasona. Tras 21 días en

cultivo a 37°C y 5% de CO₂ con cambios de medio cada 3 días, se recuperaron los pellets formados y se fijaron en formalina al 10%. Los pellets fijados se embebieron en parafina y se cortaron secciones de 5µm de grosor que a continuación fueron teñidas con hematoxilina-eosina y azul alcian al 3%, tinción específica para los glicosaminoglicanos de la matriz extracelular producida por los condroblastos diferenciados.

7. Técnica de la dispersión de la cromatina

Esta metodología permite valorar el daño del DNA como parte del estudio de la viabilidad celular mediante una técnica de lisis de la membrana nuclear y visualización por microscopía de fluorescencia de la cromatina. El uso de esta técnica está bastante extendido en el área de la reproducción, donde se usa para valorar el daño del DNA de los espermatozoides. Recientemente, se ha extendido su uso también para las células somáticas (Barcena et al., 2015).

Durante el desarrollo la presente Tesis Doctoral se adaptó el uso de esta técnica para la valoración de la viabilidad de las MSCs y se aplicó en el estudio recogido en el Manuscrito III. Esta técnica consiste en embeber las células en un microgel de agarosa y tratarlas con un buffer de lisis que rompe la membrana del núcleo celular. De esta forma, si el DNA está dañado pueden observarse pequeños fragmentos de cromatina dispersos alrededor del núcleo tras teñirlos con fluorocromos. La visualización con microscopía de fluorescencia permite determinar los porcentajes de células viables y de células dañadas.

8. Inducción de lesión articular en los caballos

Este procedimiento fue llevado a cabo como parte del ensayo *in vivo* descrito en el Manuscrito V. Como ya se ha comentado al describir los animales utilizados en esta Tesis Doctoral, algunas muestras de sangre y líquido sinovial procedentes de 12 de los 18 animales de este ensayo fueron además utilizadas para realizar el estudio recogido en el Manuscrito IV, pero en ningún caso se indujo la lesión de forma exclusiva para la obtención de dichas muestras.

El modelo de lesión articular utilizado ya había sido previamente descrito por otros autores (Hulten et al., 2002; Mokbel et al., 2011) y consiste en la inyección intraarticular de Anfotericina-B, la cual rompe los lisosomas celulares liberando a la articulación gran cantidad de enzimas y otros factores que conducen a una rápida inflamación, promoviendo la posterior degradación del cartílago.

Tras sedar a los animales, los carpos se prepararon asépticamente y se inyectaron intraarticularmente 25mg de Anfotericina-B (Sigma-Aldrich) disueltos en 3mL de agua estéril (Gibco) en una articulación radio-carpal, escogida al azar, de cada animal. El mismo procedimiento se repitió 4 meses después en la articulación contralateral de cada animal con la finalidad de evaluar dos tiempos finales en el momento del sacrificio utilizando el menor número de animales posible.

Los animales no recibieron ninguna droga antiinflamatoria que pudiera interferir con el desarrollo de la inflamación articular y sus consiguientes efectos sobre el cartílago. La analgesia se proporcionó mediante la administración de butorfanol (Torbugesic, Pfizer) a 0,1 mg/kg IV desde que comenzaron los signos inflamatorios y cada 8 horas durante 3 días tras la inducción de la lesión. Si los animales presentaban frecuencia cardiaca (FC)>60 pulsaciones/minuto, frecuencia respiratoria (FR)>48 respiraciones/minuto o temperatura rectal (TR)>38.8°C dentro del periodo entre administraciones de analgésico, se proporcionaba una dosis adicional de butorfanol. En caso de ser insuficiente este manejo analgésico, podía recurrirse al bloqueo perineural de los nervios mediano, radial y ulnar con bupivacaína 0,5% (Braun). Los animales se alojaron en boxes durante los primeros 15 días tras la lesión de cada articulación. El resto del tiempo fueron alojados en un *paddock* con libertad de movimientos, excepto en las 24h posteriores a la administración de cada tratamiento del estudio, durante las cuales permanecieron también en boxes para monitorizar cualquier reacción adversa. Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento (heno de raigrás) durante todo el estudio.

9. Valoración clínica de los animales en el ensayo *in vivo*

El seguimiento clínico se realizó como parte del ensayo *in vivo* incluido en el Manuscrito V. Adicionalmente, los datos derivados del seguimiento clínico necesarios para caracterizar la respuesta inflamatoria a corto plazo fueron utilizados en el estudio desarrollado en el Manuscrito IV.

El estado general de salud, la FC, la FR y la TR se determinaron a diario durante los 15 días posteriores a la inducción de cada lesión. Antes de inducir la lesión y a distintos tiempos a lo largo del experimento (según diseño detallado en el Manuscrito V), se realizaron exámenes de cojera estáticos y dinámicos, incluyendo prueba de flexión carpal, y se recogieron la temperatura local y el perímetro carpal.

10. Recogida y análisis de muestras de líquido sinovial y sangre

Estos procedimientos se realizaron a diferentes tiempos durante el estudio reflejado en el Manuscrito V. Parte de las muestras y de los datos obtenidos de estos procedimientos sirvieron además para el desarrollo del Manuscrito IV. El líquido sinovial obtenido de algunos pacientes del HV-UZ se cedió para su uso en los estudios de los Manuscritos I, II y IV. En los Manuscritos I y II, al utilizarse el líquido sinovial para cultivar BM-MSCs en su presencia, su procesado tras la obtención se realizó en condiciones asépticas en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones post-recogida.

La sangre se recogió en tubos sin aditivos de 5 mL (Beckton Dickinson) mediante punción de la vena yugular y se centrifugó a 3.000 g/15' para obtener el suero, que se conservó a -80°C hasta su análisis. Mediante artrocentesis aséptica se obtuvieron 0,5 - 1 mL de líquido sinovial de cada articulación, que se recogieron en tubos con EDTA (Beckton Dickinson). Parte del líquido sinovial se analizó en el momento de la obtención (proteína total, recuento total de células blancas, citología) y parte se centrifugó a 3.000 g/15' y se conservó a -80°C hasta que se utilizó para otros análisis. Tanto las muestras de sangre como de líquido sinovial

se obtuvieron y analizaron al principio y a lo largo del estudio a distintos tiempos, especificados en el Manuscrito V.

11. Determinación de la proteína de fase aguda haptoglobina

Este procedimiento se utilizó en los Manuscritos I y II, donde se determinó el nivel de haptoglobina en el líquido sinovial inflamatorio empleado para el cultivo de las BM-MSCs, en el Manuscrito IV, en el que se describieron los niveles de haptoglobina en suero y líquido sinovial en el modelo de lesión articular, y en el Manuscrito V, donde la haptoglobina se utilizó como parte de la monitorización de la evolución de la lesión y del efecto de los distintos tratamientos.

El suero y el líquido sinovial se analizaron mediante inmunodifusión radial simple en un gel de agarosa al 1% que contenía antisuero policlonal anti-haptoglobina, facilitado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza. Los anillos de precipitado se midieron utilizando una lupa con escala (10X) y la concentración de haptoglobina en las muestras se obtuvo por extrapolación de una recta de calibrado realizada con concentraciones conocidas de haptoglobina equina comercial (Mybiosources).

12. Valoración ecográfica y radiológica de los animales en el estudio *in vivo*

Los exámenes ecográfico y radiológico se realizaron de forma seriada a lo largo del estudio recogido en el Manuscrito V para monitorizar la evolución de los animales y los efectos de los distintos tratamientos.

Para la valoración ecográfica se empleó el ecógrafo Zonare Z One (Zonare, Inc.) con una sonda lineal multifrecuencia de 5 a 14 MHz y un *pad* ecográfico. La sonda se colocó transversalmente en la región dorsal de la articulación radio-carpal, por encima del tendón extensor carpo radial, permitiendo la valoración de los tejidos blandos periarticulares, el engrosamiento de la cápsula articular, la efusión sinovial y la superficie articular de los huesos radiocarpal e intermedio.

El examen radiográfico se realizó mediante radiología digital indirecta. Se obtuvieron proyecciones dorso-palmares (frontales) utilizando un generador de rayos X portátil Orange 8016 HF (M&I Globaltech) y chasis radiológicos FCR Fuji IP Cassette tipo CC de 24 x 30 cm (Fujifilm corporation) que fueron revelados con el sistema de radiología computerizada FCR Prima CR-IR 391RU (Fujifilm corporation). Los parámetros utilizados fueron 60 Kv y 5 mAs y una distancia focal de 60 cm. Las imágenes radiológicas se valoraron por consenso entre cuatro observadores experimentados de forma ciega para el tratamiento recibido y el tiempo de valoración, asignando un grado a cada imagen radiológica según la escala ordinal subjetiva descrita en la Tabla 9, la cual es una adaptación de la previamente publicada por (Mokbel et al., 2011).

GRADO	DESCRIPCIÓN
0	Normal
1	Estrechamiento línea articular muy ligero y/o Remodelación ósea en los márgenes articulares muy ligera (no osteolisis)
	Estrechamiento línea articular ligero y Remodelación ósea en los márgenes articulares ligera (no osteolisis)
3	Estrechamiento línea articular moderado y Remodelación ósea en los márgenes articulares ligera (no osteolisis)
	Estrechamiento línea articular moderado y/o Remodelación ósea en los márgenes articulares moderada (con/sin osteolisis)
5	Estrechamiento línea articular severo y Remodelación ósea en los márgenes articulares moderada (con/sin osteolisis)
	Estrechamiento línea articular severo y Remodelación ósea en los márgenes articulares severa (con osteolisis)

Tabla 9.- Escala empleada para la valoración de las imágenes radiológicas tomadas a lo largo del estudio recogido en el Manuscrito V. Se incluyen 7 grados en total denominados de 0 a 7 (a mayor grado, mayor lesión) y la descripción de cada categoría. Adaptación de Mokbel et al., (2011)

13. Examen *post-mortem* por resonancia magnética

Seis meses tras la inducción de la primera lesión, los animales fueron sedados y eutanasiados con 200 mg/kg IV de pentobarbital sódico (Euthasol, Esteve). Dentro del estudio del Manuscrito V se realizaron distintos exámenes *post-mortem*. Las extremidades delanteras se seccionaron por el tercio proximal del radio y se realizó un estudio por MRI del carpo de cuatro animales (ambas extremidades) de cada grupo. Se utilizó el sistema de Resonancia Magnética Abierta AIRIS II-1 (HITACHI) de campo magnético permanente vertical de 0.3T con una bobina (*coil*) de rodilla. Se utilizaron dos tipos de secuencias T2*. Para los planos sagitales se utilizó una secuencia en eco de gradiente para permitir una mejor visualización del hueso subcondral y cortical. Para los planos coronales se emplearon secuencias de supresión grasa (*fat/water separation, FAT SEP*) con dos Ecos diferentes (Eco 1 y Eco 2) para permitir una mejor valoración del edema óseo y el derrame sinovial. Las secuencias de supresión grasa utilizan técnicas de separación grasa/agua a partir de la discriminación de las frecuencias de precisión de ambos elementos. Los detalles de cada secuencia están recogidos en la Tabla 10.

Secuencia	Plano	Tiempo de eco (ms)	Tiempo de repetición (ms)	Ángulo de desviación	Ancho del corte (mm)	Separación entre cortes (mm)
T2* Eco de gradiente	Sagital	13.0	420.0	30°	3.0	0.5
T2* Supresión grasa Eco 1	Coronal	11.4	430.0	30°	3.5	1.0
T2* Supresión grasa Eco 2	Coronal	22.8	430.0	30°	3.5	1.0

Tabla 10.- Información sobre los parámetros empleados en cada secuencia de MRI utilizada en la valoración *post-mortem* de las articulaciones en el Manuscrito V: plano sagital (lateral) o coronal (frontal), tiempo de eco (milisegundos), tiempo de repetición (milisegundos), ángulo de desviación (°), ancho del corte (milímetros) y separación entre cortes (milímetros).

Todas las secuencias completas de cada carpo fueron evaluadas de forma ciega para los tratamientos por consenso entre dos observadores expertos asignando un valor de 0 a 4 para los siguientes parámetros en cada articulación de forma global: presencia de osteofitos, derrame sinovial, edema óseo y afectación subcondral (adaptado de McIlwraith et al., 2011).

14. Valoración macroscópica del cartílago articular

La anatomía patológica macroscópica de todas las articulaciones radio-carpales incluidas en el estudio del Manuscrito V fueron evaluadas de acuerdo a la escala de puntuaciones presentada en la Tabla 11, la cual es una adaptación al modelo de lesión empleado de la escala de valoración macroscópica recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010). Se asignó, de forma ciega para los tratamientos, una puntuación global para cada articulación por consenso entre cuatro observadores expertos.

GRADO	DESCRIPCIÓN
0	Normal: Cartílago liso y uniforme, no se aprecian lesiones ni irregularidades
1	Lesiones de pequeño tamaño, localizadas y superficiales, presentando uno o varios de estos hallazgos: - Áreas de cartílago descolorido - Zonas con apariencia de "hinchazón" (<i>swelling</i>) y/o fibrilación - Puede haber erosión del cartílago muy superficial
2	Presencia de uno de estos tipos de hallazgos - Lesiones superficiales pero extensas de tipo: cartílago descolorido, <i>swelling</i> y/o fibrilación) - Lesiones más profundas pero localizadas de tipo erosión parcial del grosor del cartílago (sin llegar a exponer el hueso subcondral)
3	Presencia simultánea de estos tipos de hallazgos: - Lesiones superficiales pero extensas de tipo: cartílago descolorido, <i>swelling</i> y/o fibrilación) - Lesiones más profundas pero localizadas de tipo erosión parcial del grosor del cartílago (sin llegar a exponer el hueso subcondral)
4	Lesiones extensas o generalizadas, afectando a la mayor parte de la superficie articular, de tipo erosión parcial o total del grosor del cartílago (en algunas zonas puede quedar expuesto el hueso subcondral)

15. Toma de muestras de cartílago y membrana sinovial

Tras el examen por MRI y la valoración macroscópica de la articulación, se tomaron muestras de cartílago y de membrana sinovial para realizar tanto estudio de expresión génica como análisis histopatológico, estando el primero recogido en el Manuscrito V y encontrándose el segundo de ellos en curso en el momento de presentar esta Tesis Doctoral.

El protocolo de toma de muestras se diseñó de acuerdo a las recomendaciones de la OARSI (Aigner et al., 2010). Se tomó una muestra de la membrana sinovial junto con la parte fibrosa de la cápsula articular en la región dorsal de cada articulación. Del cartílago se tomaron muestras tanto de grosor completo como de cartílago junto con el hueso subcondral subyacente. Las zonas escogidas para la toma de muestras fueron las correspondientes al área de mayor soporte de peso de la articulación, en los aspectos mediales del radio distal y del hueso radiocarpal proximal. Además, se tomaron muestras en las zonas diferentes de las anteriores que presentaron mayor lesión. Cada muestra se dividió para los análisis de histopatología y expresión génica.

16. Análisis histopatológico

Este procedimiento se planteó como parte de la valoración *post-mortem* de los animales del estudio en el Manuscrito V. Pese a que, como ya se ha explicado, no ha sido posible contar con los resultados de este análisis en el momento de finalizar la Tesis Doctoral, la metodología que se está empleando para llevarlo a cabo es la siguiente. Siguiendo las recomendaciones de la OARSI (McIlwraith et al., 2010), las muestras descritas en el apartado anterior destinadas a realizar histopatología se fijaron con formalina al 10% para posteriormente embeberlas en parafina, cortarlas en secciones de 5µm de grosor y teñirlas con hematoxilina-eosina. Las muestras incluyendo hueso subcondral requieren descalcificación previa utilizando ácido fórmico al 10%. Varias secciones de cada muestra se valoran a ciegas por un único observador experto, de acuerdo a una adaptación apropiada para nuestro modelo de las escalas de valoración para cartílago y membrana sinovial propuestas por la OARSI (McIlwraith et al., 2010) (Tablas 12 y 13). Las puntuaciones asignadas a cada parámetro se suman para obtener un valor global de cada muestra, pudiendo ir la puntuación total de 0 a 16 en el cartílago y de 0 a 20 en la membrana sinovial.

PARÁMETRO	GRADO	DESCRIPCIÓN
Necrosis de condrocitos	0	Normal, no necrosis
	1	1 condrocito necrótico cerca de superficie articular/campo 20X
	2	1-2 condrocitos necróticos cerca de superficie articular/campo 20X
	3	2-3 condrocitos necróticos cerca de superficie articular/campo 20X
	4	3-4 condrocitos necróticos cerca de superficie articular/campo 20X
Formación de clústeres (complejos de condronas)	0	Normal, sin formación de clústeres
	1	Clústeres de 2 condrocitos en la misma laguna
	2	Clústeres de 2-3 condrocitos dentro de la misma laguna
	3	Clústeres de 3-4 condrocitos dentro de la misma laguna
	4	Clústeres de >4 condrocitos dentro de la misma laguna
Fibrilación	0	Normal, sin fibrilación
	1	Fibrilación restringida sólo a la zona más superficial del cartílago
	2	Fibrilación que se extiende hasta la zona media del cartílago
	3	Fibrilación que llega hasta la zona profunda del cartílago
	4	Fibrilación que se adentra en la zona profunda del cartílago
Pérdida focal de células	0	Población celular normal a lo largo de la sección
	1	Área acelular del 10-20% /campo 20X
	2	Área acelular del 20-30% /campo 20X
	3	Área acelular del 40-50% /campo 20X
	4	Área acelular >50% /campo 20X

Tabla 12.- Escala propuesta para la valoración de la histopatología del cartílago articular en el Manuscrito V. Se incluyen 5 grados denominados de 0 a 4 (a mayor grado, mayor lesión) para cada uno de los parámetros estudiados y la descripción de cada categoría. Las puntuaciones asignadas a cada parámetro se suman para obtener una puntuación global de la muestra de 0 a 16. La escala de valoración se ha adaptado a partir de la recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010).

PARÁMETRO	GRADO	DESCRIPCIÓN
Infiltración celular (células mononucleares)	0	Normal, sin infiltración de células mononucleares en la sección
	1	Pequeñas áreas ocasionales de células mononucleares a lo largo de la sección
	2	Presencia ligera de células mononucleares (25% de la sección)
	3	Presencia moderada de células mononucleares (25-50% de la sección)
	4	Presencia marcada de células mononucleares (>50% de la sección)
Cambios en la vascularización	0	Normal, sin incremento de la vascularización
	1	Ligero incremento en el número de vasos de forma localizada a lo largo de la sección
	2	Ligero incremento en el número y en la dilatación de los vasos de forma localizada a lo largo de la sección
	3	Incremento moderado en el número y en la dilatación de los vasos en >50% de la sección
	4	Marcado incremento en el número y en la dilatación de los vasos en >50% de la sección
Hiperplasia de la capa íntima de la membrana sinovial	0	Normal, sin hiperplasia
	1	Vellosidades con 2-4 capas de células de la íntima en toda la sección
	2	Vellosidades con 4-5 capas de células de la íntima en 25-50% de la sección
	3	Vellosidades con 4-5 capas de células de la íntima en >50% de la sección
	4	Vellosidades con 5 o más capas de células de la íntima en >50% de la sección

PARÁMETRO	GRADO	DESCRIPCIÓN
Edema de la capa subíntima de la membrana sinovial	0	Normal, sin edema
	1	Ligero edema a lo largo de la sección
	2	Ligero/moderado edema en el 25% de la sección
	3	Edema moderado en el 25-50% de la sección
	4	Edema moderado en más de un 50% de la sección
Fibrosis de la capa subíntima de la membrana sinovial	0	Normal, sin fibrosis
	1	Ligero incremento en la fibrosis a lo largo de la sección
	2	Ligero/moderado incremento en la fibrosis en el 25% de la sección
	3	Moderado incremento en la fibrosis en el 25-50% de la sección
	4	Marcado incremento en la fibrosis en >50% de la sección

Tabla 13.- Escala propuesta para la valoración de la histopatología de la membrana sinovial en el Manuscrito V. Se incluyen 5 grados denominados de 0 a 4 (a mayor grado, mayor lesión) para cada uno de los parámetros estudiados y la descripción de cada categoría. Las puntuaciones asignadas a cada parámetro se suman para obtener una puntuación global de la muestra de 0 a 20. La escala de valoración se ha adaptado a partir de la recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010)

17. Herramientas bioinformáticas

En el desarrollo de los distintos Manuscritos recogidos en la presente Tesis Doctoral se utilizaron diversos programas y bases de datos para el diseño de cebadores para RT-qPCR, el análisis de las amplificaciones de RT-qPCR y el estudio estadístico de los datos obtenidos. Los detalles sobre el análisis estadístico están especificados en cada Manuscrito. Las herramientas bioinformáticas empleadas en la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

- Búsqueda y alineamiento de secuencias para el diseño de cebadores: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).
- Diseño de cebadores: Primer Express Software (Applied Biosystems).
- Análisis de los productos de amplificación de RT-qPCR: StepOne™ software (Applied Biosystems).
- Análisis de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo: FACSDIVA 5.0.1 software (BD Biosciences).
- Análisis estadístico y construcción de gráficos: Paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS, Inc.) y GraphPad Prism 5 (GraphPad, Inc.). Las pruebas estadísticas empleadas fueron Shapiro-Wilk para estudiar la distribución de las muestras (Manuscritos I, II, III, IV y V), las pruebas no pareadas t de Student (Manuscrito IV) y Mann-Whitney (Manuscrito III), las pruebas pareadas t de Student pareada (Manuscritos II, III y IV) y Wilcoxon (Manuscrito V), los test ANOVA de una vía de tipo pareado (test de Friedman, Manuscritos I y V) y de tipo no paramétrico (Krukall-Wallis, Manuscritos I, III y V) siempre con la prueba *post hoc* del test de Dunn, y el coeficiente de correlación de Pearson (Manuscrito IV).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA UNIDAD TEMÁTICA

Fruto del trabajo realizado durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han publicado cuatro artículos indexados en revistas incluidas en el *Journal Citation Reports* (JCR). Además, se ha incluido en esta Memoria un quinto manuscrito que se encuentra en fase avanzada de preparación. Estos cinco manuscritos constituyen el bloque de Resultados y Discusión de la Tesis Doctoral, presentada como compendio de publicaciones. A continuación, introduciremos brevemente el conjunto de trabajos para que la unidad temática de todos ellos quede claramente justificada.

De acuerdo a los objetivos propuestos, se comenzó por estudiar cómo influyen distintos estímulos inflamatorios sobre las propiedades de las células madre mesenquimales (MSCs) equinas, con especial énfasis en sus características inmunológicas. Se valoró en primer lugar el efecto *in vitro* de un entorno simulando las condiciones de una articulación inflamada. Para ello, se añadió líquido sinovial inflamatorio al medio de cultivo y se observó que este ambiente era bien tolerado por las MSCs en términos de viabilidad y diferenciación (Manuscrito II), sin inducir la expresión de moléculas inmunogénicas, pero que constituía un estímulo insuficiente para activar el perfil inmunorregulador de las MSCs (Manuscrito I).

Por ello, y dado que el nivel inflamatorio del líquido sinovial puede ser muy variable incluso dentro de la misma patología, se estudió el efecto sobre estas mismas propiedades de las MSCs de dosis concretas de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ con el fin de proporcionar un estímulo estandarizado y repetible, encontrando que este estímulo era capaz de inducir la expresión génica de moléculas inmunomoduladoras. Sin embargo, también se observó un aumento en la expresión de moléculas inmunogénicas (Manuscrito I) y la viabilidad y capacidad de diferenciación de las MSCs se vieron negativamente afectadas (Manuscrito II).

Pese a que el ambiente inflamatorio de la articulación no tuvo efectos negativos sobre las MSCs, resultó en una estimulación insuficiente de su potencial inmunomodulador. Al contrario, la exposición a concentraciones específicas de TNF α e IFN γ indujo el perfil inmunomodulador de las MSCs, pero tuvo efectos no deseables sobre otras de sus características. En consecuencia, el siguiente paso fue la búsqueda de unas condiciones apropiadas para la estimulación de las MSCs, de forma que aumentara su potencial inmunorregulador sin detrimento de otras de sus propiedades. Para ello, se testaron las mismas citoquinas pero a concentraciones más bajas y durante tiempos de exposición más cortos, encontrando así la combinación de condiciones capaz de lograr estos efectos (Manuscrito III).

Una vez establecidas las condiciones apropiadas para la estimulación de las MSCs, llegó el momento de testar *in vivo* los efectos terapéuticos de la inducción de su perfil inmunorregulador, así como las posibles implicaciones inmunogénicas derivadas de esta estimulación en su uso alogénico. Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vivo* en el que se utilizó un modelo equino de OA. El uso de este modelo y la necesidad de contar con diversas herramientas para monitorizar la inflamación en el mismo, nos llevó a estudiar el uso potencial de la proteína de fase aguda haptoglobina como marcador inflamatorio tanto en suero como

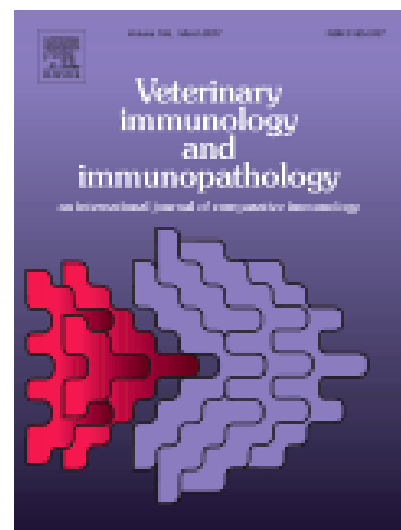
en líquido sinovial equino, mostrando en ambos un incremento marcado y duradero tras inducir la lesión articular (Manuscrito IV).

En el ensayo *in vivo* recogido en el Manuscrito V, se testó el uso de la administración repetida de un *pool* de MSCs alogénicas procedentes de varios donantes, habiendo sido previamente estimuladas con las condiciones determinadas en el Manuscrito III o sin recibir estimulación previa. Además, se incluyó en el estudio un grupo control que no recibió MSCs. El seguimiento clínico y laboratorial del líquido sinovial mostró una normalización más rápida de los parámetros evaluados en los dos grupos que recibieron MSCs. La apariencia macroscópica del cartílago articular fue mejor en ambos grupos tratados, especialmente a los dos meses de evolución y en las articulaciones que recibieron MSCs sin estimular. El análisis de la expresión génica del cartílago y de la membrana sinovial mostró un mayor efecto regulador y antiinflamatorio de las MSCs estimuladas. El beneficio terapéutico derivado del uso de MSCs se encontró principalmente a corto plazo y, aunque sin grandes diferencias entre el uso de MSCs estimuladas o sin estimular, se observó una mayor capacidad reguladora sobre la articulación de las primeras. Además, se detectó una respuesta inflamatoria ligera y transitoria tras la segunda inyección de MSCs estimuladas. Aunque la reacción observada fue leve y se resolvió sin tratamiento, la inmunogenicidad de las células alogénicas estimuladas debe ser tenida en cuenta como posible causa de la misma.

En la Figura 25 se representa de forma esquemática el trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral, con el objetivo de proporcionar una visión global del proceso investigador llevado a cabo, comenzando por la hipótesis de partida y el objetivo general planteado a partir de la misma. Para alcanzar el objetivo general propuesto se plantean cinco objetivos específicos de cuya consecución se han obtenido los cinco Manuscritos presentados en esta Tesis Doctoral por compendio de publicaciones. Como indican las flechas, la consecución de los objetivos y la consiguiente publicación de los Manuscritos ha sido lineal, de forma que los resultados obtenidos al desarrollar cada objetivo han permitido llevar a cabo el siguiente. Las metodologías empleadas para el desarrollo de cada Manuscrito también se indican en esta Figura, resaltando así la interrelación entre todos ellos.



Figura 25: Esquema que muestra la relación entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos recogidos en los cinco Manuscritos que conforman la presente Tesis Doctoral, así como la metodología empleada en cada uno de ellos.



**Effect of inflammatory environment on equine bone marrow
derived mesenchymal stem cells immunogenicity and
immunomodulatory properties.**

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José;
Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel,
Inmaculada; Rodellar, Clementina.

Veterinary immunology and immunopathology. 171, pp. 57-65. 2016. DOI:
10.1016/j.vetimm.2016.02.007

Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties

L. Barrachina, A.R. Remacha, A. Romero, F.J. Vázquez, J. Albareda, M. Prades, B. Ranera, P. Zaragoza, I. Martín-Burriel, C. Rodellar

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are being investigated for the treatment of equine joint diseases because of their regenerative potential. Recently, the focus mainly has addressed to their immunomodulatory capacities. Inflammation plays a central role in joint pathologies, since the release of proinflammatory mediators to the synovial fluid (SF) leads to the activation of enzymatic degradation of the cartilage. MSCs can modulate the local immune environment through direct or paracrine interaction with immune cells, suppressing their proliferation and re-addressing their functions. Proinflammatory molecules can induce MSC immunoregulatory potential, but they could also increase the expression of immunogenic molecules. Studying the effect of inflammatory environment on MSC immunomodulation and immunogenicity profiles is mandatory to improve cellular therapies. The aim of this study was to analyse the response of equine bone marrow MSCs (eBM-MSCs) to three inflammatory conditions. Equine BM-MSCs from three animals were exposed to: a) 20% allogeneic inflammatory SF (SF); b) 50 ng/ml of TNF α and IFN γ (CK50) and c) 20 ng/ml of TNF α and IFN γ (CK20). After 72 hours of exposure, expression of immunogenic and immunomodulation-related molecules, including cell-to-cell contact and paracrine signalling molecules, were analysed by RT-qPCR and flow cytometry.

The gene expression of adhesion molecules was upregulated whereas MSC migration-related genes were downregulated by all inflammatory conditions tested. CK culture conditions significantly upregulated the expression of *COX-2*, *iNOS*, *IDO* and *IL-6*. *MHC-I* gene expression was upregulated by all conditions, whereas *MHC-II* was upregulated only after CK priming. The expression of *CD40* did not significantly change, whereas the ligand, *CD40L*, was downregulated in CK conditions. Flow cytometry showed an increase of the percentage of positive cells and mean fluorescence intensity

(MFI) of the MHC-I and MHC-II molecules at CK50 conditions, supporting the gene expression results. These outcomes reinforce the change of the immunophenotype of the eBM-MSCs according to the surrounding conditions. Inflammatory synovial environment did not lead to significant changes, so the environment found by eBM-MSCs when they are intraarticular administered may not be enough to activate their immunomodulatory potential. CK priming at tested doses enhances the immunoregulatory profile of eBM-MSCs, which may promote a therapeutic benefit. Even if CK priming induced an upregulation of MHC expression, costimulatory molecule expression however was not upregulated, suggesting that immunogenicity might not be increased. This study provides a better understanding about the behaviour of eBM-MSCs inside the inflamed joint and constitutes a first step to improve MSC-based therapies for equine joint diseases.

Introduction

Degenerative joint diseases (DJD), such as osteoarthritis (OA), are prevalent articular pathologies in both equine and human species. In addition, horses have a double role in joint pathologies because, firstly, they commonly suffer from OA and osteochondrosis (OC), important diseases for equine clinicians (Schlueter and Orth, 2004). Moreover, horses are considered the most suitable animal model for testing cell-based therapies for human joint injuries (Cellular, Tissue and Genic Therapies Advisory Committee, 2005). Current therapeutic strategies for DJD are focused on reducing pain, decreasing disability, and limiting deterioration of articular structures (Walker-Bone et al., 2000). Inflammation plays a central role in the pathophysiology of joint diseases like OA, due to the release of proinflammatory molecules like Tumor necrosis factor α (TNF α) or Interleukin 1β (IL- 1β). These cytokines promote inflammation and pain, and drive to cartilage breakdown (Goodrich and Nixon, 2006; Sellam and Berenbaum, 2010). Therefore, an optimal therapeutic approach to OA should try to limit this inflammation, the subsequent cartilage degradation and try to stimulate the regeneration of articular structures. Several studies have focused on MSC intra-articular (IA) based therapies for both horses and human, with promising results (Noth et al., 2008; Broeckx et al., 2014; Ferris et al., 2014) demonstrating their therapeutic potential.

Traditionally, the regenerative role of MSCs was mainly attributed to their differentiation ability into target tissue cells. MSCs seem to engraft in articular tissues like synovium or menisci, but not in the cartilage. However, a delaying effect on progressive degeneration of OA articular cartilage has been observed associated with MSCs administration. This effect has been attributed to the anti-inflammatory and immunoregulatory properties of MSCs (Whitworth and Banks, 2014), suggesting that the MSC therapeutic mechanism may be due to an immunoregulation exerted by cells promoted by the environment (Kode et al., 2009; Meirelles Lda et al., 2009). This phenomenon seems to be a multifactorial process that requires both direct cell-to-cell contact and contact-independent paracrine signalling governed through different molecules such as interleukin 6 (IL-6), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E2 (PGE2), interleukin 10 (IL-10), or tumor

necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6), among others. These molecules are involved in proliferation, differentiation, migration or apoptosis in different immune cells (Ma et al., 2014), varying between species (Ren et al., 2009). The expression of several molecules related to paracrine and cell-contact mechanisms, like chemokines and adhesion molecules, is regulated in MSCs by pro-inflammatory molecules such as interferon γ (IFN γ), especially in combination with TNF α , interleukin 1 α (IL-1 α) or IL-1 β (Ren et al., 2008). This fact suggests that for a full regulatory function of MSCs, MSC activation or licensing through exposure to an inflammatory environment might be needed (Renner et al., 2009; Cuerquis et al., 2014).

Inflammatory synovial fluid (SF) contains variable amounts of several inflammatory molecules that may alter MSC function and characteristics. Some studies in equine and human species have reported that changes in the composition of inflammatory molecules of the SF might affect the expression and production of paracrine signalling molecules by MSCs, acting as inductors of their immunomodulatory potential (Leijs et al., 2012; Vézina Audette et al., 2013). However, the stimulus exerted by SF could be heterogeneous because it depends on the variable amounts of the different mediators, which is defined by the SF inflammatory level (Leijs et al., 2012). *In vitro*, the combination of definite doses of IFN γ with another proinflammatory cytokine, such as TNF α , has demonstrated a change in the immunoregulatory abilities of MSCs, inducing the expression or the secretion of anti-inflammatory and regulatory factors and suppressing T cell proliferation in co-culture experiments (Cuerquis et al., 2014; Paterson et al., 2014). However, an increase of the immunogenicity has also been observed due to this priming (Chan et al., 2006; Chan et al., 2008), indicating a possible limitation to use allogeneic primed MSCs. The enhancement of MSC immunoregulatory properties, without detriment of their immune-evasive status, could improve the MSC therapeutic efficacy and allow their allogeneic use (Ankrum et al., 2014).

Despite the recent findings, little is known about the effects and behaviour of MSCs when they are IA administered within an injured joint. Pre-existing joint inflammation may impact the secretome of MSCs altering their therapeutic efficacy (Roberts et al., 2011), therefore, a deep understanding of the changes induced in MSC

immunogenicity and immunoregulatory abilities by an inflammatory synovial environment is needed. Since immunoregulatory potential of MSCs seems to be crucial for their therapeutic potential, stimulating this ability could be of major interest in order to improve the benefits of regenerative medicine. In consequence, know how the synovial environment affects administered MSCs, and the way in which we can stimulate them to enhance their immunoregulatory potential, will be the key for developing effective joint regenerative treatments.

The aim of the present study was to assess the effect of different inflammatory stimuli on eBM-MSCs immunoregulatory ability and immunogenicity, studying the expression of immunogenic and immunomodulation-related molecules. Firstly, the influence of allogeneic inflammatory SF on eBM-MSCs was investigated, and subsequently, the effect of priming eBM-MSCs with a combination of the two pro-inflammatory molecules IFN γ and TNF α , was tested at two different doses. SF and CK inflammatory conditions were chosen according to previous studies (Ren et al., 2008; Leijts et al., 2012; van Buul et al., 2012; Vézina Audette et al., 2013; Zimmermann and McDevitt, 2014). This work contributes to understand the effects of inflammatory exposure on eBM-MSCs, as a previous step to enhance their use *in vivo* for equine joint diseases.

Materials and Methods

Experimental design

Three repeat experiments were designed to investigate the *in vitro* response of eBM-MSCs to different inflammatory stimuli:

Experiment 1 (SF). The culture medium was supplemented with 20% of equine allogeneic inflammatory SF.

Experiment 2 (CK50). The culture medium was supplemented with pro-inflammatory cytokines: IFN γ (50ng/ml) and TNF α (50ng/ml).

Experiment 3 (CK20). The culture medium was supplemented with pro-inflammatory cytokines: IFN γ (20ng/ml) and TNF α (20ng/ml).

Equine BM-MSCs (n=3) were cultured in triplicate for each inflammatory condition for 72 hours. Subsequently, the expression of molecules related to immunoregulation and immunogenicity was analysed by flow cytometry and RT-qPCR. Controls in triplicate were run in each experiment using the same eBM-MSCs (n=3) cultured with control media.

Animals

Four geldings (age: 6–12 years; weight: 450–500 kg,) were used in this study, named as 057, 059, 060 and 063. Animals 057, 059 and 060 were patients from the Veterinary Hospital of the University of Zaragoza determined to be healthy based on clinical and hematologic examination. Biological samples (BM or SF) were obtained with owner consent and according to local animal welfare regulations. All procedures were carried out under Project License 31/11 approved by the in-house Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Isolation, culture and characterization of eBM-MSCs

Forty ml of BM from sternum were aspirated in heparinized syringes using a 4" 11G Jamshidi needle from horses 057, 059 and 060. Mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation on Lymphoprep (Atom) for 20 min at 1700 rpm. The cells were plated at 2×10^6 nucleated cells/cm² in 6-well plates (Becton Dickinson) in growth medium consisting of low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Glutamine and 1% Streptomycin/ Penicillin (all from Sigma-Aldrich) (Ranera et al., 2011). The cells were expanded until third passage and were characterized by tri-lineage differentiation and phenotype determination as previously described (Ranera et al., 2011). The MSC phenotype was examined by analysing the mRNA levels of six genes coding for the mesenchymal cell markers *CD90*, *CD105*, *CD44* and *CD73*, and the haematopoietic markers *CD34* and *CD45*, using RT-qPCR. Complementary, three mesenchymal surface markers were also analysed by flow cytometry (*CD90*, *CD105* and *CD44*). Osteogenic,

adipogenic and chondrogenic differentiation potentials were induced using specific media as previously described (Ranera et al., 2011). Subsequently, cells were cryopreserved in frozen medium consisting of 10% DMSO and 90% FBS (both from Sigma-Aldrich) until experiments started.

Collection of synovial fluid

Inflammatory SF for the Experiment 1 was obtained from one tarso-crural joint of animal 063, which presented aseptic synovitis. Arthrocentesis was performed to reduce the joint effusion and SF aspirated was collected in heparin-treated tubes (Beckton Dickinson) and used for the Experiment 1. SF inflammatory status was verified measuring total protein (g/dl) with a portable optical refractometer (RHB-32 Hand-held brix refractometer, Spectrum Technologies) and determining the concentration of the acute phase proteins (APP) serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (Hp). The methodology for SAA and Hp determination is described in the Supplementary data 1. Cytological examination of the SF was also performed. SF was centrifuged at 3000g/15 min to remove debris and supernatant was stored at -80°C, whereas cellular fraction was discarded. All processes were carried out in sterile conditions to prevent from culture contamination.

Inflammatory culture media preparation

The growth medium described above was used as basal culture medium. For Experiment 1, 20% inflammatory allogeneic SF was added to the basal culture medium (SF medium). For Experiments 2 and 3, basal medium was supplemented with recombinant equine TNF α and recombinant equine IFN γ (both from R&D Systems). Fifty ng/ml of each proinflammatory cytokine was added to the basal culture medium for Experiment 2 (CK50 medium) whereas 20 ng/ml of every cytokine were added for Experiment 3 (CK20 medium). Basal medium was used as same negative control in the three experiments.

Equine BM-MSC culture in inflammatory conditions

Approximately 10^6 cells in passage 3 from animals 057, 059 and 060 were thawed at 37°C and cultured for 3 days to allow re-adjust conditions prior to being used for the different experiments. In all experiments, eBM-MSCs from each animal were seeded at 5000 cells/cm² with basal medium. The cells were expanded at 37°C and 5% CO₂ with twice-week culture medium change. At 90-100% confluence, SF-, CK50-, CK20- or control media were added to the cells and maintained for 72 hours. Inflammatory and control conditions in all experiments were carried out in triplicate for each animal. After 72 hours, control and inflammatory exposed eBM-MSCs were detached with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), counted and destined for different assays.

mRNA isolation from eBM-MSCs

Total mRNA was isolated from approximately 10^6 of eBM-MSCs from all samples with RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. DNase Turbo (Ambion) was used to remove genomic DNA according to manufacturer's instructions. 1,5 µg of mRNA from each sample were retrotranscribed to cDNA with the Superscript Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies).

Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Primers were designed using Primer Express 2.0 software based on known equine sequences. Primer details, accession numbers for equine mRNA sequences and amplicon sizes are shown in Table 1.

GENE	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size
HOUSE-KEEPING			
<i>GAPDH</i>	NM_001163856	F:GGCAAGTTCATGGCACAGT R:CACAACATATTCAGCACCAGCAT	128
<i>B2M</i>	NM_001082502.2	F:TCGTCCTGCTCGGGCTACT R:ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
CHARACTERIZATION CELL SURFACE MARKERS, ADHESION MOLECULES AND CHEMOKINES RECEPTORS			
<i>CD90</i>	EU881920	F:TGCGAACTCCGCCTCTCT R:GCTTATGCCCTCGCACTTG	93
<i>CD105</i>	XM_001500078	F:GACGGAAAATGTGGTCAGTAATGA R:GCGAGAGGCTCTCCGTGTT	100

GENE	Accession number	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size
CHARACTERIZATION CELL SURFACE MARKERS, ADHESION MOLECULES AND CHEMOKINES RECEPTORS			
<i>CD73</i>	XM_001500115	F:GGGATTGTTGGATACACTTCAAAG R:GCTGCAACGCAGTGATTCA	90
<i>CD44</i>	NM_001085435	F: CCCACGGATCTGAAACAAGTG R: TTCTGGAATTTGAGGTCTCCGTAT	95
<i>CD45</i>	AY_114350	F:TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R:ACATTTTGGGCTTGTCTGTAAC	100
<i>CD34</i>	XM_001491596	F:CACTAAACCCTCTACATCATTTTCTCCTA R:GGCAGATACCTTGAGTCAATTTCA	150
<i>VCAM-1</i> (<i>CD106</i>)	DQ246452	F: TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R: TTGATGGTCTCCCCGATGA	127
<i>ALCAM</i> (<i>CD166</i>)	XM_001494152	F: TCACGACTTCATCGAGCACATC R: GGCGAACTTAAAGTCAGTGGCA	118
<i>CXCR4</i>	XM_001490165	F: TGCAGCAGCAGGTAGCAAAGT R: ATATACGGAACCCGTCCATGG	97
IMMUNOMODULATION-RELATED PARACRINE MOLECULES			
<i>COX-2</i>	AB041771	F: GTTTGCAATTTTTGCCAGC R: ACTTAAATCCACCCCGTGACC	103
<i>IDO</i>	XM_001490681	F: TCATGACTACGTGGACCCAAAA R: CGCCTTCATAGAGCAGACCTTC	104
<i>iNOS</i>	AY027883	F: CCAACAATGGCAACATCAGGT R: TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
<i>IL-6</i>	EU438770	F: AACAGCAAGGAGGTACTGGCA R: CAGGTCTCTGATTGAACCCA	95
<i>TGFβ-1</i>	AF175709	F: GTCCTTTGATGTCACCGGAGT R: TGGAAGTGAACCCGTT	137
<i>TSG-6</i>	AY919871.1	F: GGAAGAGGCTCACGGATGG R: TTCCAGACCGTGCTTCTCTGT	101
<i>IL-10</i>	EU438771	F: GACATCAAGGAGCAGTGAAGT R: TGGAGCTTACTGAAGGCACTCT	140
ANTIGEN PRESENTING-RELATED MOLECULES			
<i>MHC-I</i>	AB525081	F: CGTGAGCATCATTGTTGGC R: TCCCTCTTTTTACCTGAGG	92
<i>MHC-II</i>	NM_001142816	F: AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R: CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
<i>CD40</i>	AY514017	F: ACAAATACTGCGACCCCAACC R: TTTACAGGCATCGCTGGA	114
<i>CD40L</i>	XM_001490011	F: AGTTCGAAGGCTTCGTCAAGG R: CGCAATTTGAGGCTCCTGAT	101

Table 1. Genes analysed by RT-qPCR. GenBank accession numbers of the sequences used for primers design. Primers (F: Forward and R: Reverse) and length of the amplicon in base pair (bp). Genes were grouped in agreement with the functions and implications of encoded molecules, in order to facilitate the posterior analysis: House-keeping, characterization cell surface markers, adhesion molecules and chemokine receptors, immunomodulation-related paracrine molecules and antigen presenting-related molecules.

Genes were grouped based on their functions and implications, in order to facilitate the posterior analysis, as it follows:

Adhesion molecules and chemokine receptors: Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1 or CD106), Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM or CD166), chemokine receptor 4 (CXCR4), CD90, Endoglin (CD105) and Hyaluronate Receptor (CD44).

Immunomodulation-related paracrine molecules: cyclooxygenase 2 (COX-2), indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 6 (IL-6), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (TSG-6), interleukin 10 (IL-10).

Antigen presenting-related molecules: Major Complex of Histocompatibility I (MHC-I), Major Complex of Histocompatibility II (MHC-II). Co-stimulatory molecules: Cluster of Differentiation 40 (CD40), Cluster of Differentiation 40 Ligand (CD40L).

RT-qPCR was performed and monitored using the StepOne Real Time PCR System device (Applied Biosystems). All reactions were carried out in a total volume of 10 μ l with 2 μ l of cDNA as a template and Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). cDNA was amplified following the manufacturer's protocol: 20 s at 95°C of an initial activation and denaturation, followed by 40 cycles consisting of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. Each cDNA sequence was tested in triplicate and a dissociation curve protocol was run after all PCR reactions. The levels of gene expression were determined by the comparative Ct method. A normalization factor (NF) was used to determine the expression level of each gene in each sample. The NF was calculated as the geometric mean of the quantity of 2 housekeeping genes (*GAPDH* and *B2M*). Primers used for housekeeping gene amplification were previously described (Kolm et al., 2006).

Flow cytometry of eBM-MSCs

Flow cytometry was used at two time points. First, for immunophenotyping cells prior to be used in the experiments, and second, to study the surface expression

of the adhesion molecules CD90, CD105 and CD44, the immunomodulatory related molecule IL-6 and the antigen presenting molecules MHC-I and MHC-II, after inflammatory exposure. The cells were suspended in PBS/2mM EDTA at 10^6 cells/ml. Fifty μ l aliquots of cells were transferred to FACS tubes and incubated for 15min at 4°C with CD90-PE (BD Pharmingen), CD105-FITC (R&D Systems), CD44-FITC (Abcam), HLA-ABC-FITC (Beckman Coulter), HLA-DR-APC (Immunostep) and IL-6-PE (BD Pharmingen) monoclonal antibodies. Anti-horse reactivity of antibodies was previously described (Ranera et al., 2011) or tested. Subsequently, cells were washed with PBS (Gibco) and diluted in 500 μ L of PBS/2mM EDTA and analysed with the fluorescence-activated cell sorter (FACSARIA, BD Biosciences). Gating strategy is described in Supplementary data 2 and data were analyzed with FACSDIVA 5.0.1 software.

Statistical analysis

Data obtained from RT-qPCR and flow cytometry analysis were subjected to statistical analysis using SPSS 15.0. Data distribution was tested for normality by the Shapiro–Wilk test. In all experiments, one way repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA) on ranks was used to determine that did not exist significant differences ($P>0.05$) between the control groups from each experiment. Therefore, all control groups were considered as a unique control group for all experiments. The non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA test for multiple comparison of unpaired data was used, with Dunn’s post-hoc test, using a 95% confidence interval, to evaluate the differences in the fold changes in gene expression, and percentage of expression and MFI in flow cytometry between the non-stimulated eBM-MSCs (control group) and the SF-, CK50- and CK20-stimulated eBM-MSCs. Significance level was set at $P<0.05$ for all analyses.

Gene expression data are reported as mean ($n=3$) \pm standard error (S.E.) fold change increase or decrease of stimulated eBM-MSC from each experiment over unstimulated control eBM-MSCs. Flow cytometry data are represented as mean ($n=3$) \pm S.E. of percentage of positive cells and MFI of SF- and CK50-stimulated and unstimulated control eBM-MSCs.

Results

Isolation and characterization of eBM-MSCs

Plastic-adherent fibroblast-like cells were observed in all samples obtained from BM aspirates within the first days of culture. The cells showed capacity for attachment to plastic and the ability to differentiate into osteoblast, adipocyte and chondrocyte (data not shown). Isolated cells from three animals were positive for the surface markers CD90 ($90.80\% \pm 7.51$), CD105 (42.53 ± 1.67) and CD44 ($97.46\% \pm 0.35$) by flow cytometry. All the samples expressed transcripts for *CD90*, *CD105*, *CD44* and *CD73*, but not for *CD34* and *CD45*, by RT-qPCR (data not shown).

Inflammatory synovial fluid obtainment

Total protein measure in the SF obtained from animal 063 was 2,25g/dl. The SAA concentration was 5.85 $\mu\text{g/ml}$ and the Hp concentration was $2.38 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$. These data confirmed the inflammatory status of the SF and along with the cytological examination, a septic origin of the joint inflammation was discarded.

Effect of inflammatory environment on immunomodulatory and immunogenic gene expression of eBM-MSCs

Gene expression data from RT-qPCR analysis are represented in Figure 1. The expression of each gene is represented as relative expression (fold change), respect to control, in eBM-MSCs (n=3) exposed to each inflammatory condition (SF, CK50 and CK20).

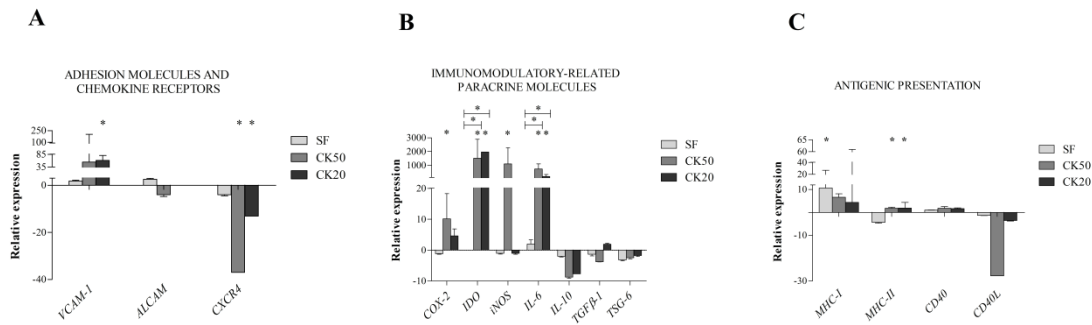


Figure 1. Equine BM-MSCs (n=3) expression of genes coding for immunomodulatory related molecules analysed by RT-qPCR. Expression of all genes in eBM-MSCs from each experiment (SF, CK50 and CK20) are represented as Mean \pm S.E. (n=3) of the relative expression respect to control. **A)** Expression of genes coding for molecules participating in direct cell-cell contact mechanism of MSCs *VCAM-1*, *ALCAM*, *CXCR4*; **B)** Expression of genes coding for immunomodulatory molecules implied in the MSCs paracrine signalling mechanism *COX-2*, *IDO*, *iNOS*, *IL-6*, *IL-10*, *TGFβ-1*, *TSG-6*. **C)** Expression of genes coding for immunogenic molecules participating in the antigenic presentation *MHC-1*, *MHC-II*, *CD40* and *CD40L* (* = p<0.05).

The results for the grouped genes were:

Genes coding for molecules implied in MSC immunomodulatory mechanisms

A) Molecules related with cell-to-cell contact mechanism: adhesion molecules and chemokine receptors

Gene expression data from RT-qPCR analysis are represented in Figure 1.A. Under inflammatory SF condition, the expression of analysed genes did not significantly change. *VCAM-1* expression was significantly upregulated in CK20 conditions, whereas a *CXCR4* significant downregulation in both CK conditions was observed (Figure 1.A). *CD90*, *CD105* and *CD44* gene expression did not display differences between control and inflammatory exposed eBM-MSCs in any Experiment (data not shown).

B) Molecules related with paracrine signalling mechanism

Gene expression data from RT-qPCR analysis are shown in Figure 1.B. In SF-Experiment, non- significant changes in the expression of genes coding for *COX-2*, *IL-6* and *iNOS* were observed. In addition, no expression for *IDO* was detected. The opposite pattern was observed in CK50-Experiment, where *COX-2*, *IDO*, *iNOS* and *IL-6*

gene expression was significantly up-regulated. For CK20 conditions, similar gene expression pattern to CK50-Experiment was shown, although only differences for *IL-6* and *IDO* expression were significant. In addition, *IDO* and *IL-6* gene expression was significantly higher in both CK conditions than in SF-Experiment. Anti-inflammatory molecules *IL-10*, *TGF- β 1* and *TSG-6* presented a similar pattern for three conditions (SF, CK50 and CK20) with no-significant changes.

Antigen presenting-related molecules

Gene expression data from RT-qPCR analysis are represented in Figure 1.C. An increase in *MHC-I* gene expression was observed in all conditions, being significant in SF-Experiment. Gene expression of *MHC-II* was significantly up-regulated by both CK50 and CK20 conditions. *CD40* expression did not significantly change in any conditions, whereas *CD40L* was down-regulated.

Effect of the inflammatory environment on cell immunophenotype

Cell immunophenotype was studied after inflammatory exposure. Due to the difficulty of finding antibodies with reactivity against equine species, not all the molecules analysed by RT-qPCR could have been also analysed by flow cytometry (Ibrahim et al., 2007). Flow cytometry from CD90, CD105 and CD44, immunomodulatory related molecule IL-6 and the antigen presenting molecules MHC-I and MHC-II were performed in control and inflammatory exposed eBM-MSCs (n=3) of experiments SF and CK50, but not in CK20 experiment due to the low number of available cells. The percentage of expression (frequency) and the MFI or density of these markers in control and different inflammatory conditions on eBM-MSCs are provided in Figure 2.

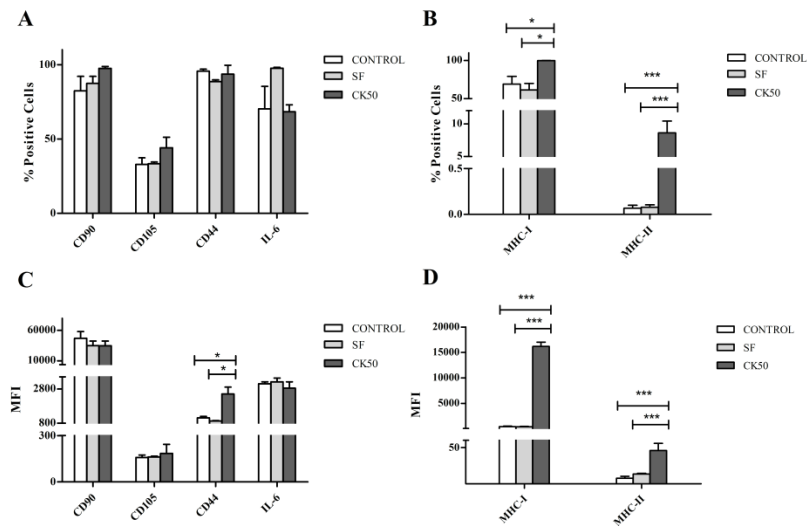


Figure 2. Equine BM-MSCs (n=3) surface expression of molecules related with immunomodulatory functions and immunogenic molecules related with antigenic presentation, analysed by flow cytometry. The expression of each molecule is represented as Mean \pm S.E. (n=3) of percentage of positive cells and MFI from each separate experiment (SF and CK50) and from control group. **A)** Percentage of Control cells, SF-stimulated eBM-MSCs (Experiment 1) and CK50-exposed eBM-MSCs (Experiment 2) positive for CD90, CD105, CD44 and IL-6. **B)** Percentage of Control cells, SF-stimulated eBM-MSCs (Experiment 1) and CK50-stimulated eBM-MSCs (Experiment 2) positive for MHC-I and MHC-II. **C)** MFI values for CD90, CD105, CD44 and IL-6 in Control cells, SF-stimulated eBM-MSCs (Experiment 1) and CK50-exposed eBM-MSCs (Experiment 2) **D)** MFI values for CD90, CD105, CD44 and IL-6 in Control cells, SF-stimulated eBM-MSCs (Experiment 1) and CK50-exposed eBM-MSCs (Experiment 2) (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$).

In both SF and CK50 experiments, the changes between control and stimulated eBM-MSCs in the frequency of expression were consistent with the density (MFI) of the markers. The percentage of positive cells for CD90, CD105, CD44 and IL-6 did not significantly differ in SF- and CK50-stimulated cells from the control (unstimulated) cells (Figure 2.A). However, the MFI of CD44 in CK50-exposed cells was significantly higher than in control and SF-cells (Figure 2.C).

MHC-I and MHC-II surface expression was also assessed after inflammatory stimulation. MHC-I and MHC-II expression (frequency and MFI) in SF exposed cells was very similar to the control cells, whereas significant increase was observed in frequency and MFI in both immunogenic markers in CK50 respect control and SF-cells (Figure 2.B and 2.D).

Discussion

The cultured cells showed capacity for attachment to plastic and the ability of differentiation into osteoblast, adipocyte and chondrocyte, as criteria established to define human MSCs (Dominici et al., 2006). Equine BM-MSCs displayed a gene and cell surface expression pattern similar to previous reports for this species and showed a normal growth pattern, with a proliferation rate and viability similar to other studies (Ranera et al., 2011). Inflammatory conditioned media were prepared based on recent publications on this field. Inflammatory SF was obtained from an allogeneic donor and added at a concentration considered likely to act as an enhancer of the immunoregulatory potential of MSCs (Leijs et al., 2012). SAA and Hp were used to determine the inflammatory status of the SF. Both APP were elevated with regard to described ranges (Basile et al., 2013; Jacobsen et al., 2006) in agreement with the expected changes for these proteins (Jacobsen and Andersen, 2007). For CK-conditioned media, the synergy displayed by the pro-inflammatory cytokines TNF α and IFN γ (Zimmermann and McDevitt, 2014) supported the decision of using them to stimulate the eBM-MSCs. The induction of immunoregulatory properties of BM-MSCs by synergistic cytokine priming is not previously reported in horses. Equine BM-MSCs has been stimulated with 100ng/ml of IFN γ alone in some studies (Paterson et al., 2014; Schnabel et al., 2014), but their gene and surface expression of immunoregulation-related molecules were not studied after the stimulation. Therefore, the tested doses (20 ng/ml and 50 ng/ml) were chosen according to previous studies in human and mouse MSCs showing induction of immunoregulatory factors expression or secretion (Ren et al., 2008; Waterman et al., 2010; Hegyi et al., 2012; van Buul et al., 2012) to determine if the same conditions also operate similar changes in the behaviour of MSC from equine species. The available volume of inflammatory SF did not allow a time course to be performed and thus a single time-point of 72 hours was chosen to maximize potential effects of exposure to SF. This was longer than previous studies on the effects of inflammatory SF (Leijs et al., 2012; Vézina Audette et al., 2013) but longer exposure to individual cytokines has been reported (Paterson et al., 2014) and immunosuppressive effects of IFN γ -activated MSCs have been shown to depend on the exposure time to IFN γ (Chan et al., 2006). Our results are similar to previous reports in other species using shorter times of cytokine stimulation, as it will be further discussed. However, the exposure of eBM-

MSCs to SF did not produce remarkable effects despite of using an exposition time longer than the previously described (Leijts et al., 2012; Vézina Audette et al., 2013).

Several mechanisms have been proposed to participate in the immunoregulatory function of MSCs, including the participation of chemokine axis, adhesion molecules and soluble factors (Ma et al., 2014). The co-culture of MSCs in the presence of T cells triggers the expression of *VCAM-1* (Ren et al., 2010), according to the results obtained in our CK20 conditions. This finding supports the implication of cell-to-cell contact in the MSC immunoregulatory mechanism. Adhesion molecules are also related to MSC migration, a mechanism which could be critical for the recruitment of MSCs into wound sites for tissue regeneration. This process is complex, especially in inflammatory environments, and whereas some studies describe the enhancement of MSC migratory property under inflammatory stimulation (Ries et al., 2007; Shi et al., 2007), others report a decrease in this property depending on the time of exposure (Waterman et al., 2010). The MFI of the hyaluronan receptor CD44, related to cell migration through the extracellular matrix (Zhu et al., 2006), was increased under CK50 conditions, indicating an enhancement in the expression level of this marker, despite the number of positive cells remained similar. However, the gene expression of the chemokine receptor *CXCR4*, also implied in the MSC migration (Honczarenko et al., 2006), was decreased in both CK Experiments, suggesting that MSC migration might be diminished in the tested inflammatory conditions.

Paracrine mechanism plays an important role in the MSC immunomodulation. Inflammatory SF is able to modulate the transcription of paracrine signalling molecules in eBM-MSCs (Vézina Audette et al., 2013) and enhances the ability of human MSCs for suppressing lymphocyte proliferation (Leijts et al., 2012). The slight changes observed in SF exposed MSCs in this study may be due to the inflammatory degree of the SF used, which might be insufficient to induce significant changes. The stimulus exerted by SF could vary depending on the inflammatory level, which is heterogeneous even within the same pathology group (Leijts et al., 2012).

The IDO, iNOS, IL-6 and COX-2, through PGE2 secretion, are consistently reported *in vitro* as the most important mediators in the paracrine signalling MSC

immunoregulatory mechanism to suppress T-cell proliferation (Bouffi et al., 2010), through different mechanisms (Ryan et al., 2007). The anti-inflammatory effects produced by the panel of molecules secreted by MSCs have been reported to act locally inside the inflamed synovium, decreasing the proliferation and function of immune cells (Bouffi et al., 2010), increasing vascular permeability and promoting angiogenesis in the inflamed joint (Sutton et al., 2009), and regulating the gene expression of collagenases and extra-cellular matrix components of the articular cartilage (Sutton et al., 2009). These soluble immunosuppressive factors are demonstrated to be produced or transcribed by MSCs from veterinary species (Carrade and Borjesson, 2013). Proinflammatory cytokines such TNF α and IFN γ induce the gene expression or the secretion of these molecules by MSCs from different species and different sources (Meisel et al., 2004). According to these reports, both of our CK conditions significantly up-regulated the gene expression of these molecules by eBM-MSCs.

IL-10, TGF- β 1 and TSG-6 participation in MSC immune mechanisms is reported (Aggarwal and Pittenger, 2005; Di Nicola et al., 2002; Ma et al., 2014). But, whereas some authors describe an increase in the production of TGF- β 1 (Liu et al., 2006) and TSG-6 (Choi et al., 2011) by cytokine-activated MSCs, other studies have described no change in *IL-10* and *TGF- β 1* gene expression exposure (Yoo et al., 2009) and no TGF- β 1 secretion (Carrade et al., 2012) after different inflammatory stimuli. Variability in immunoregulatory mechanisms has been described associated with the species or the MSC source (Carrade and Borjesson, 2013) and, in our conditions, we did not observed significant changes in the gene expression of these anti-inflammatory molecules. Since several factors could participate in the mechanisms underlying the immune suppression exerted by MSCs, our results suggest that these molecules may not have a major role in eBM-MSCs immunoregulation, but other factors such *COX-2* (PGE2), *IDO*, *iNOS* or *IL-6* would be mainly involved. The differences in immune-regulation mechanisms depending on species, sources and inflammatory stimuli may explain some differences between our results and previous reports. Despite of that fact, our data demonstrate a change in the gene expression and marker surface pattern of eBM-

MSC after tested conditions, confirming that inflammatory environments induce an enhancement in the eBM-MSC immunoregulatory profile.

Preservation of low immunogenicity in MSCs after inflammatory stimulation is important to allow allogeneic transplantation. Allogeneic MSC therapy would be an “off-the-shelf” product when limitations exist for the use of autologous MSCs, especially in cases where MSCs are low and their quality might be committed as it happens in aged individuals and disease, and also in situations where autologous MSCs might have the same genetic defects as the patient (Chen and Tuan, 2008). The three inflammatory conditions tested in the present study induced an increase of *MHC-I* gene expression, but only CK50 and CK20 conditions led to an overexpression of *MHC-II* in eBM-MSCs. The increase in both percentage of positive cells and MFI for MHC-I and MHC-II detected by flow cytometry was only observed for CK50 condition. Induction of MHC expression by inflammatory conditions has been reported (Najar et al., 2012) and IFN γ alone is considered as MHC inducer in MSCs (Chan et al., 2006; Chan et al., 2008; Chinnadurai et al., 2014). IFN γ -upregulated MHC expression might not be accompanied by an immunogenicity increase, due to the lack of expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 (Tse et al., 2003) along with the immune-suppressive properties of MSCs, which attenuate the local immune system response (Ankrum et al., 2014). According to these authors, no change in the expression of CD40 has been observed in the conditions studied. Furthermore, in CK50 conditions we have observed a decrease in *CD40L* gene expression. Blocking CD40L leads to immune-tolerance (Briones et al., 2011), thus the down-regulation of the gene coding for this molecule might be implied in the attenuation of the immunogenicity of eBM-MSCs. The absence of changes in co-stimulatory molecules gene expression, in combination with the up-regulation of immunoregulatory molecules, suggests that eBM-MSC might remain immune-evasive after inflammatory priming.

The upregulation of *COX-2*, *iNOS*, *IL-6* and *MHC-I* was not statistically different between CK50 and CK20 stimulation, but more elevated for the highest dose. In our experimental conditions, a dose-dependent effect of the cytokine stimulation could not be established, but TNF α ability to induce PGE2 secretion by MSCs in a dose-dependent manner (Hegyí et al., 2012) and induction of IDO depending on IFN γ

concentration used for MSCs stimulation (Meisel et al., 2004) have been reported. IFN γ dose-dependent suppressive effect of MSCs on T cell effector function (Chinnadurai et al., 2014) and in the suppression of graft versus host disease (Polchert et al., 2008) has also been reported. In addition, IFN γ upregulates in a dose-dependent manner the expression of the genes implied in the IFN γ signal transduction pathway, leading to the expression of MHC-I and MHC-II by MSCs (Chan et al., 2008). The synergistic dose-dependent effects of IFN γ and TNF α point out the complex effects which might be elicited on MSCs by pro-inflammatory environments in degenerative diseases (Wang et al., 2013), despite the doses used *in vitro* are higher than the cytokine concentrations founded in an *in vivo* inflammatory environment, such diseased SF (Bertone et al., 2001).

In summary, eBM-MSCs are able to change their gene expression profile in response to inflammatory stimuli, and several of these changes are correlated with modifications in the eBM-MSC surface expression profile. Inflammatory synovial environment does not promote significant and homogeneous immunoregulatory changes in the eBM-MSC expression patterns, suggesting that the inflammatory environment present in an injured joint might not be sufficient to activate eBM-MSCs immunosuppressive potential. Equine BM-MSCs priming with specific concentrations of TNF α and IFN γ would induce the changes in a significant and more homogenous manner. In consequence, IA cellular therapy would improve its efficiency by prior *ex vivo* priming of eBM-MSCs. The up-regulation of MHC-I and MHC-II produced by CK priming may lead to an immunogenicity increase, but it might be relieved by the absence of co-stimulatory molecules needed to trigger an immune response and by the enhancement of immunomodulatory factors expression by eBM-MSCs. Further studies, including *in vivo* experiments of immune response, would be needed to elucidate the effect of cytokine priming on the immunogenicity of MSCs.

Conclusion

Several important findings on eBM-MSC behaviour and immunoregulatory responses, relevant to their IA therapeutic applications, were identified in the current investigation. Firstly, the eBM-MSC immunomodulatory gene expression pattern was

modified when exposed to inflammatory environment depending on the type of stimuli. Secondly, cytokine priming induced the expression of MHC, but not of the co-stimulatory molecules, therefore, the immunogenicity was not necessarily increased. The immunomodulatory profile enhancement reached by treating eBM-MSCs with TNF α and IFN γ could be advantageous to the modulation of the immune response, but further studies on the effect on their immune-evasive status are needed.

References

- Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology* 32, 252-260.
- Basile, R.C., Ferraz, G.C., Carvalho, M.P., Albernaz, R.M., Araújo, R.A., Fagliari, J.J., Queiroz-Neto, A., 2013. Physiological Concentrations of Acute-Phase Proteins and Immunoglobulins in Equine Synovial Fluid. *Journal of Equine Veterinary Science* 33, 201-204.
- Bertone, A.L., Palmer, J.L., Jones, J., 2001. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 30, 528-538.
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., Noel, D., 2010. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 5, e14247.
- Briones, J., Novelli, S., Sierra, J., 2011. T-cell costimulatory molecules in acute-graft-versus host disease: therapeutic implications. *Bone marrow research* 2011, 976793.
- Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Marien, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregon, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS One* 9, e85917.
- Carrade, D.D., Borjesson, D.L., 2013. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative medicine* 63, 207-217.
- Carrade, D.D., Lame, M.W., Kent, M.S., Clark, K.C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2012. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell medicine* 4, 1-11.
- Cellular, T.a.G.T.A.C., 2005. Cellular products for joint surface repair. FDA Center for Biologics Evaluation and Research March 3-4.
- Cuerquis, J., Romieu-Mourez, R., Francois, M., Routy, J.P., Young, Y.K., Zhao, J., Eliopoulos, N., 2014. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy* 16, 191-202.
- Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., Rameshwar, P., 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107, 4817-4824.

- Chan, W.K., Lau, A.S., Li, J.C., Law, H.K., Lau, Y.L., Chan, G.C., 2008. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Experimental hematology* 36, 1545-1555.
- Chen, F.H., Tuan, R.S., 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy* 10, 223.
- Chinnadurai, R., Copland, I.B., Patel, S.R., Galipeau, J., 2014. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. *Journal of immunology* 192, 1491-1501.
- Choi, H., Lee, R.H., Bazhanov, N., Oh, J.Y., Prockop, D.J., 2011. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF-kappaB signaling in resident macrophages. *Blood* 118, 330-338.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E., Goodrich, L.R., 2014. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Veterinary surgery : VS* 43, 255-265.
- Goodrich, L.R., Nixon, A.J., 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 171, 51-69.
- Hegy, B., Kudlik, G., Monostori, E., Uher, F., 2012. Activated T-cells and pro-inflammatory cytokines differentially regulate prostaglandin E2 secretion by mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 419, 215-220.
- Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M., Silberstein, L.E., 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24, 1030-1041.
- Ibrahim, S., Saunders, K., Kydd, J.H., Lunn, D.P., Steinbach, F., 2007. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 63-80.
- Jacobsen, S., Andersen, P.H., 2007. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* 19, 38-46.
- Jacobsen, S., Thomsen, M.H., Nanni, S., 2006. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *American journal of veterinary research* 67, 1738-1742.
- Kode, J.A., Mukherjee, S., Joglekar, M.V., Hardikar, A.A., 2009. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11, 377-391.
- Kolm, G., Klein, D., Knapp, E., Watanabe, K., Walter, I., 2006. Lactoferrin expression in the horse endometrium: relevance in persisting mating-induced endometritis. *Veterinary immunology and immunopathology* 114, 159-167.

Leijts, M.J., van Buul, G.M., Lubberts, E., Bos, P.K., Verhaar, J.A., Hoogduijn, M.J., van Osch, G.J., 2012. Effect of Arthritic Synovial Fluids on the Expression of Immunomodulatory Factors by Mesenchymal Stem Cells: An Explorative in vitro Study. *Frontiers in immunology* 3, 231.

Liu, H., Kemeny, D.M., Heng, B.C., Ouyang, H.W., Melendez, A.J., Cao, T., 2006. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *The Journal of Immunology* 176, 2864-2871.

Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y., 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 21, 216-225.

Meirelles Lda, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., Caplan, A.I., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factors Review* 20, 419-427.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., Dilloo, D., 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619-4621.

Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Bron, D., Toungouz, M., Lagneaux, L., 2012. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem cell reviews* 8, 1188-1198.

Noth, U., Steinert, A.F., Tuan, R.S., 2008. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nature clinical practice. Rheumatology* 4, 371-380.

Paterson, Y.Z., Rash, N., Garvican, E.R., Paillot, R., Guest, D.J., 2014. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. *Stem cell research & therapy* 5, 90.

Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., Bartholomew, A., 2008. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European journal of immunology* 38, 1745-1755.

Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vazquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martin-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 144, 147-154.

Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A.I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A.B., Shi, Y., 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 27, 1954-1962.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., Shi, Y., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141-150.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., Shi, Y., 2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *The Journal of Immunology* 184, 2321-2328.

Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F.C., Steinmann, J.F., Slowik, P., Geissler, E.K., Piso, P., Schlitt, H.J., Dahlke, M.H., 2009. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. *Transplantation proceedings* 41, 2607-2611.

Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., Neth, P., 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109, 4055-4063.

- Roberts, S., Genever, P., McCaskie, A., De Bari, C., 2011. Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. *Regenerative medicine* 6, 351-366.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., Mahon, B.P., 2007. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology* 149, 353-363.
- Schlueter, A.E., Orth, M.W., 2004. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 1, 221-231.
- Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J., Fortier, L.A., 2014. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther* 5, 13.
- Sellam, J., Berenbaum, F., 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 6, 625-635.
- Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L., Jia, H., Zhao, R.C., 2007. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica* 92, 897-904.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., Mobasheri, A., 2009. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 179, 10-24.
- Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., Guinan, E.C., 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389-397.
- van Buul, G.M., Villafuertes, E., Bos, P.K., Waarsing, J.H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J.A., Bernsen, M.R., van Osch, G.J., 2012. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20, 1186-1196.
- Vézina Audette, R., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., Laverty, S., 2013. Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 21, 1116-1124.
- Walker-Bone, K., Javaid, K., Arden, N., Cooper, C., 2000. Regular review: medical management of osteoarthritis. *Bmj* 321, 936-940.
- Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., Shi, S., 2013. IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells* 31, 1383-1395.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088.
- Whitworth, D.J., Banks, T.A., 2014. Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? *Vet J* 202, 416-424.
- Yoo, K.H., Jang, I.K., Lee, M.W., Kim, H.E., Yang, M.S., Eom, Y., Lee, J.E., Kim, Y.J., Yang, S.K., Jung, H.L., Sung, K.W., Kim, C.W., Koo, H.H., 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular immunology* 259, 150-156.

Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L.W., Weinberg, K., Barr, M.L., Demetriou, A., Wu, G.D., 2006. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* 24, 928-935.

Zimmermann, J.A., McDevitt, T.C., 2014. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy* 16, 331-345.

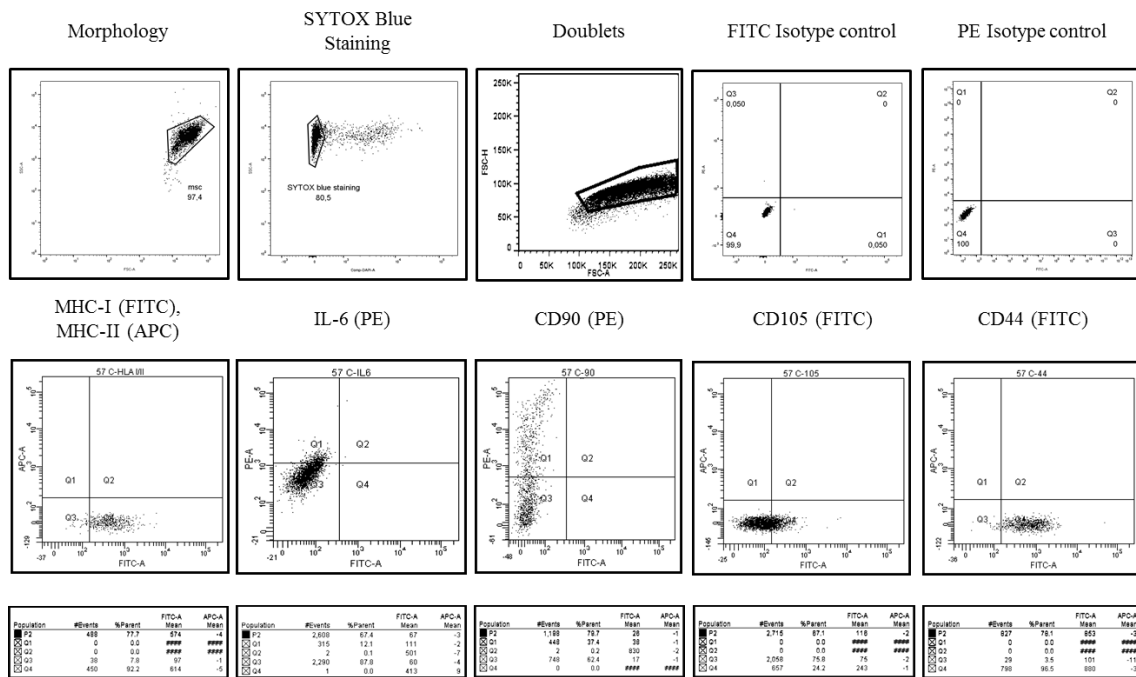
Supplementary data 1

Determination of acute phase proteins in equine synovial fluid

The concentration of equine haptoglobin (Hp) in synovial fluid (SF) from animal 063 was determined by radial immunodiffusion in 1% agarose gel containing specific rabbit polyclonal antisera raised by subcutaneous injection of the purified porcine protein. Serum and SF samples from healthy horses and from animals undergoing an acute process were used to previously test the reactivity between porcine and equine species for the antisera. Western Blott and immunodiffusion techniques were carried on for this purpose. Commercial equine Hp (Mybiosources) was used as standard to construct a standard curve with serial dilutions. Plates were incubated for 2–3 days in a moist chamber at room temperature, stained with Coomassie blue, and their halo diameter was measured.

The concentration of SAA in SF from animal 063 was determined by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative measurement. The sample was 1:500 diluted and added to 96-well plate coated with the specific monoclonal antibody anti-SAA and with biotin-labeled detection antibody. The plate was incubated 1 hour at 37°C. Subsequently, the wells were washed and Streptavidin Horseradish Peroxidase was added and incubated for 30 minutes at room temperature (RT). Then, the wells were washed again and tetramethylbenzidine was added and incubated for 30 minutes at RT. Optical density (450 nm) was determined using a Biotek Synergy HT spectrophotometer. A calibration curve was constructed to test the linearity of the assay using serial dilutions of SAA equine protein (standard) to extrapolate the concentration of our sample.

Supplementary data 2



The targeted events were gated as it follows: first, the cell size and granularity (FSC vs SSC); second, dead cells exclusion with SYTOX blue staining (Thermofisher Scientific). Afterwards, doublets were eliminated (FSC-H vs FSC-A). Negative control samples were stained with isotype control antibodies.



Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments.

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina

Journal of veterinary science. 18 (1), pp.39-49. 2017

DOI:10.4142/jvs.2017.18.1.1

Original Article

J Vet Sci 2017, 18(1), 39-49 · <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.1.39>

JVS

Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implications in intra-articular treatments

Laura Barrachina^{1,2}, Ana Rosa Remacha¹, Antonio Romero^{1,2}, Francisco José Vázquez^{1,2}, Jorge Albareda^{1,3}, Marta Prades^{1,4}, Beatriz Ranera¹, Pilar Zaragoza¹, Inmaculada Martín-Burriel¹, Clementina Rodellar^{1,*}

¹Laboratory of Biochemical Genetics LAGENBIO, and ²Service of Equine Surgery and Medicine, Veterinary Hospital, University of Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

³Service of Orthopedic Surgery and Traumatology, University Clinical Hospital Lozano Blesa, 50009 Zaragoza, Spain

⁴Service of Equine Surgery, Veterinary Hospital, Autonomous University of Barcelona, 08193 Barcelona, Spain

Mesenchymal stem cells (MSCs) are gaining relevance for treating equine joint injuries because of their ability to limit inflammation and stimulate regeneration. Because inflammation activates MSC immunoregulatory function, proinflammatory priming could improve MSC efficacy. However, inflammatory molecules present in synovial fluid or added to the culture medium might have deleterious effects on MSCs. Therefore, this study was conducted to investigate the effects of inflammatory synovial fluid and proinflammatory cytokines priming on viability and plasticity of equine MSCs. Equine bone marrow derived MSCs (eBM-MSCs) from three animals were cultured for 72 h in media supplemented with: 20% inflammatory synovial fluid (SF); 50 ng/mL IFN- γ and TNF- α (CK50); and 20 ng/mL IFN- γ and TNF- α (CK20). Proliferation assay and expression of proliferation and apoptosis-related genes showed that SF exposed-eBM-MSCs maintained their viability, whereas the viability of CK primed-eBM-MSCs was significantly impaired. Tri-lineage differentiation assay revealed that exposure to inflammatory synovial fluid did not alter eBM-MSCs differentiation potential; however, eBM-MSCs primed with cytokines did not display osteogenic, adipogenic or chondrogenic phenotype. The inflammatory synovial environment is well tolerated by eBM-MSCs, whereas cytokine priming negatively affects the viability and differentiation abilities of eBM-MSCs, which might limit their *in vivo* efficacy.

Keywords: horses, mesenchymal stromal cells, joint diseases, proinflammatory cytokines, synovial fluid

Introduction

Articular pathologies such osteoarthritis (OA) are common diseases in both equines and humans, greatly impacting the daily lives of afflicted individuals and acting as a major cause of wastage in the equine industry. Horses have a double role in joint pathologies because they commonly suffer from these diseases [32], and they are considered the most suitable animal model for testing cell based therapies for human joint injuries [3]. Osteoarthritis is a complex condition characterized by damage to the articular cartilage. Inflammation plays an important role in progression of the disease as the secretion of proinflammatory mediators accelerates cartilage degradation. Conventional treatments primarily focus on relieving this inflammation and controlling pain [11]. An ideal therapeutic approach should stop

progressive loss of cartilage and stimulate the regeneration of damaged structures. Treatments for equine joint diseases based on the intra-articular (IA) administration of mesenchymal stem cells (MSCs) are gaining importance because of their regenerative role [8]. MSCs show significant potential for cartilage repair, which is attributed to their trophic and differentiation properties, as well as their immunoregulatory ability [21]. The expression of immunoregulatory molecules by MSCs is regulated by proinflammatory cytokines such interferon- γ (IFN- γ), particularly in combination with tumor necrosis factor- α (TNF- α) [29], which suggests that MSC full immunoregulatory function depends on their activation after inflammatory exposure. Therefore, MSC priming with proinflammatory cytokines prior to their use *in vivo* might enhance their therapeutic efficacy [5]. Joint injuries result in a variable release of different

Received 21 Jan. 2016, Revised 19 Mar. 2016, Accepted 12 May 2016

*Corresponding author: Tel: +34-976-761622; Fax: +34-976-762949; E-mail: rodellar@unizar.es

pISSN 1229-845X
eISSN 1976-555X

Journal of Veterinary Science · © 2017 The Korean Society of Veterinary Science. All Rights Reserved.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

inflammatory molecules into the synovial fluid. Inflammatory synovial fluid may affect the function and characteristics of IA administered MSCs, such as migratory function or differentiation potential [16], or act as inductors of MSC-immune regulation in equine and human species [18,37]. However, the stimulus exerted by synovial fluid could be heterogeneous because variation exists between patients, even within one disease group [18]. Therefore, the combination of definite doses of $\text{INF}\gamma$ with $\text{TNF-}\alpha$ leads to a more homogenous stimulus for inducing MSC immunomodulation, which could improve their therapeutic potential. However, the regenerative potential of MSCs through differentiation could be decreased by inflammatory exposure [7,17,20]. In addition, $\text{INF-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ synergistically impair MSC self-renewal, decreasing their effectiveness [38]. To the best of our knowledge, the effects of these cytokines on these properties in equine MSCs have not yet been elucidated.

Because pre-existing joint inflammation may alter the therapeutic efficacy of MSCs when they are IA administered [31], further knowledge of the changes induced in equine MSCs by an inflammatory environment is necessary. Conversely, the use of $\text{INF-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ priming without detriment of viability and plasticity is of major interest to improve cellular therapies. Thus, this study was conducted to assess the possible effects of different inflammatory stimuli on viability and differentiation potential of equine bone marrow derived MSCs (eBM-MSCs) as a step prior for their clinical use in joint injured patients.

Materials and Methods

Experimental design

Equine BM-MSCs ($n = 3$) were exposed to three different inflammatory conditions and their responses were analyzed: Experiment 1 (SF), 20% allogeneic inflammatory synovial fluid was added to the culture medium to mimic the joint inflammatory environment; Experiment 2 (CK50), $\text{INF-}\gamma$ (50 ng/mL) and $\text{TNF-}\alpha$ (50 ng/mL) were added to the culture medium; and Experiment 3 (CK20), $\text{INF-}\gamma$ (20 ng/mL) and $\text{TNF-}\alpha$ (20 ng/mL) were added to the culture medium. All inflammatory conditions were maintained for 72 h. Subsequently, a proliferation assay was conducted for 7 days. Expression of proliferation and apoptosis related genes was analyzed by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Tri-lineage differentiation potential was examined through specific staining and gene expression by RT-qPCR. Triplicate controls were run in each experiment using the same eBM-MSCs ($n = 3$) cultured with control media.

Animals

Four geldings, named as EQ01, EQ02, EQ03 and EQ04 (weight, 450–500 kg; age, 6–12 years), were used in this study. The horses were patients from the Veterinary Hospital of the

University of Zaragoza suffering from varying types of locomotor system injuries, but determined to be in systemic good health based on clinical and hematologic examination. Biological samples (bone marrow [BM] and synovial fluid) were obtained with owner consent and according to local animal welfare regulations.

All procedures were carried out within the Project License 31/11 approved by the in-house Ethic Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza. The care and use of animals were in accordance with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Harvesting and characterization of eBM-MSCS

A total of 40 mL of BM from the sternum were collected in heparinized syringes using a 11 g \times 101 mm Jamshidi needle (CareFusion, USA) from three donors (EQ01, EQ02 and EQ03). Equine BM-MSCs were isolated using a gradient density separation technique as previously described by our group [27]. The cells were plated and cultured in basal culture medium consisting of low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 1% glutamine, 1% streptomycin/penicillin and 10% fetal bovine serum (FBS) (all from Sigma-Aldrich, USA) [27]. Cells were expanded until the third passage, then characterized by phenotype determination (flow cytometry and gene expression) and tri-lineage differentiation as previously described [27]. Cells were subsequently frozen in 10% DMSO-90% FBS (Sigma-Aldrich) frozen medium and cryopreserved until experiments started.

Inflammatory synovial fluid collection

Synovial fluid was harvested from EQ04, which presented aseptic synovitis in one tarso-crural joint. Arthrocentesis was performed to reduce the joint effusion and aspirated synovial fluid was collected in heparin-treated tubes (Becton, Dickinson and Company, USA) and used for Experiment 1. Synovial fluid inflammatory status was verified by measuring total protein (g/dL) with a portable optical refractometer (RHB-32 Hand-held Brix Refractometer; Spectrum Technologies, USA), by conducting a cytological examination and determine the concentration of the acute phase proteins (APPs) serum amyloid A (SAA) and haptoglobin (Hp) [2]. Subsequently, synovial fluid was centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min, after which the supernatant was stored at -80°C . All processes were performed under aseptic conditions to prevent culture contamination.

Equine BM-MSCs culture under inflammatory conditions

The cytokines used for CK priming were selected based on their described synergy [30]. Synovial fluid and CK inflammatory conditions were determined according to previous reports [29,35,37,39]. The time of exposure was determined to be 72 h

[26] for the three conditions. For Experiment 1, inflammatory synovial fluid was added to the basal culture medium at 20% (SF medium). For Experiments 2 and 3, basal media were supplemented with recombinant equine TNF- α and IFN- γ (R&D Systems, USA) by adding 50 ng/mL of each cytokine in Experiment 2 (CK50 medium), whereas medium was supplemented with 20 ng/mL of each cytokine for Experiment 3 (CK20 medium). Basal medium was used in control eBM-MSCs in the three experiments (control medium).

One million eBM-MSCs at third passage from EQ01, EQ02 and EQ03 were thawed at 37°C and seeded at 5,000 cells/cm² in basal medium at 37°C and 5% CO₂ until confluence reached 80 to 90%, allowing readjustments of conditions prior to initiating the experiments. SF-, CK50-, CK20- or control-media were then added to the cells. Inflammatory exposure and their controls were carried out in triplicate for each animal in each experiment (SF, CK50, and CK20). Cells were cultured for 72 h in their corresponding media at 37°C and 5% CO₂, after which eBM-MSCs were detached with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich), washed three times with PBS (Gibco, USA) to completely remove inflammatory molecules, and then used for the different assays.

Proliferation assay

Cell proliferation after every inflammatory exposure and their controls was evaluated over seven days by MTT proliferation assay as previously described [28]. Viable cell numbers for the different samples were determined using a calibration curve consisting of nine triplicate points of increasing amounts of cells [28]. Basal medium was used as a blank. The cell doubling time for the control and inflammatory-stimulated eBM-MSCs from each experiment was calculated.

Tri-lineage differentiation assay

Control and inflammatory exposed cells were cultured in induction medium (differentiation) and basal medium (control) in triplicate according to each differentiation assay. For osteogenic differentiation, eBM-MSCs from each sample were seeded at 20,000 cells/cm² in 24-well plates. Osteogenic medium consisted of 10 nmol/L dexamethasone, 10 mmol/L β -glycerophosphate and 100 μ mol/L ascorbate-2-phosphate (all from Sigma-Aldrich) supplemented basal medium. After 7 days, typical calcium deposit formation was assessed by Alizarin Red staining. To accomplish this, cells were fixed with 70% ethanol for 1 h at room temperature (RT), stained with 2% Alizarin Red stain (pH 4.6) (Sigma-Aldrich) for 10 min (RT) and washed with PBS.

Equine BM-MSCs from each sample were seeded at 5,000 cells/cm² in 12-well plates for adipogenic differentiation. Adipogenic medium consisted of 1 μ mol/L dexamethasone, 500 μ mol/L 3-isobutyl-1-methylxanthine, 200 μ mol/L indomethacin and 15% rabbit serum (all from Sigma-Aldrich) supplemented basal medium. After 15 days, typical fat droplets were evaluated

by Oil Red O staining. Briefly, cells were fixed with 10% formalin (Sigma-Aldrich) for 15 min at RT, stained with 0.3% Oil Red O (Sigma-Aldrich) (dissolved in 60:40; isopropanol: distilled water) stain for 30 min at 37°C, then washed with distilled water.

Chondrogenic differentiation was conducted in pellet culture. To accomplish this, approximately 300,000 eBM-MSCs from each sample were transferred to conic bottom 15 mL tubes, after which 400 μ L of chondrogenic differentiation medium were added and the samples were centrifuged at 300 \times g for 5 min to pellet the cells. Chondrogenic medium consisted of 10% FBS, 10 ng/mL TGF β -3 (R&D Systems), ITS+ premix (Becton, Dickinson and Company), 40 μ g/mL proline, 50 μ g/mL ascorbate-2-phosphate, and 0.1 μ mol/L dexamethasone supplemented high glucose DMEM (all from Sigma-Aldrich). After 21 days, chondrogenic differentiation was evaluated by specific staining with Alcian blue staining. Pellets were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned into 5 μ m sections. The sections were then hydrated with increasing gradients of alcohol, stained with Mayer's haematoxylin and 3% Alcian blue, rinsed with distilled water, dehydrated with decreasing amounts of alcohols and mounted.

Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Expression of genes coding for molecules related to proliferation (*cyclooxygenase 1 [COX-1]*, *COX-1*, *Cyclin D2*) and apoptosis (*BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP-8*, *HSP-27*, *TNF- α* , *IFN- γ*) was assessed by RT-qPCR to investigate eBM-MSCs viability. A RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, UK) was used to isolate total mRNA from approximately 10⁶ eBM-MSCs from each sample. Genomic DNA was removed using DNase Turbo (Ambion, USA) and 1.5 μ g of mRNA from each sample were retrotranscribed to cDNA with a Superscript Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, USA). mRNA isolation and cDNA retrotranscription from osteogenic and adipogenic differentiation assays were performed using a Cells-to-cDNA II kit (Ambion). mRNA could not be isolated from differentiated CK20-eBM-MSCs or from cells undergoing chondrogenic differentiation because there was not enough sample to perform both staining and mRNA isolation. All processes were conducted according to manufacturer's instructions.

A StepOne Real Time PCR System device (Applied Biosystems, USA) was used to perform and monitor RT-qPCR. All reactions were carried out in a total volume of 10 μ L with 2 μ L of cDNA as the template and Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Amplification and analysis were performed as previously described [27]. The expression levels of all genes in each sample were normalized by a normalization factor (NF), which was calculated as the geometric mean of the quantity of two housekeeping genes, *GAPDH* and *B2M* [15]. The Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems) was used to design primers based on known equine sequences. Information about

Table 1. Primers used for gene expression by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). GenBank accession numbers of the sequences used for primers design. Primers (F: forward and R: reverse) and length of the amplicon in base pairs (bp)

Gene	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
Housekeeping			
GAPDH	NM_001163856	F:GGCAAGTTCCATGGCACAGT R:CACAACATATTACAGCACCAGCAT	128
B2M	NM_001082502.2	F:TCGTCTGCTCGGGCTACT R:ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
Characterization cell surface markers			
CD90	EU881920	F:TGCGAACTCCGCCTCTCT R:GCTTAGCCCTCGCACTTG	93
CD105	XM_001500078	F:GACGGAAAATGTGGTCAGTAATGA R:GCGAGAGGCTCTCCGTGTT	100
CD73	XM_001500115	F:GGGATTGTTGGATACACTTCAAAG R:GCTGCAACGCAGTGATTCA	90
CD44	NM_001085435	F:CCCACGGATCTGAAACAAGTG R:TTCTGGAATTTGAGGTCTCCGTAT	95
CD45	AY_114350	F:TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R:ACATTTTGGGCTTGCTCTGTAAC	100
CD34	XM_001491596	F:CACTAAACCCTCTACATCTTTCTCCTA R:GGCAGATACCTTGAGTCAATTTCA	150
MHC-I	AB525081	F:CGTGAGCATCATTGTTGGC R:TCCCTCTTTTTTACCTGAGG	92
MHC-II	NM_001142816	F:AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R:CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
Proliferation related enzymes			
COX1	DQ246452	F:TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R:TTGATGGTCTCCCCGATGA	127
Cyclin D2	XM_001494152	F:TACGACTTCATCGAGCACATC R:GGCGAAC TAAAGTCAGTGGCA	118
Molecules participating in apoptosis			
BAX	XM_005596728.1	F:AGTGTCTCAAGCGCATCGG R:CACTCGGAAAAAGACCTCGC	104
BCL-2	Ryhner, 2008	F:GCCTATCTGGGGCCACAAGT R:TTTCCCTTTGGCAGTAAATAGC	200
BCL-XL	XM_001499714	F:GTCGGATCGCAACCTGGAT R:GTTCCCGTAGAGTTCACAAAGG	100
CASP8	XM_001496753.2	F:CAATCCGATAGATGCACCAGG R:AGGAGAA TGCAAGTCGTTGCC	101
HSP-27	XM_001500212	F:GGCATTATGTAGAATCCATTGATCCT R:CGGGCTGGTGATCTTCTT	78
Apoptosis-related proinflammatory cytokines			
TNF- α	EU438779	F:CATGTTGTAGCAAACCCCAA R:TACAGCCCATCCAATGGTACC	125
IFN- γ	EU000433	F:AACCTAAAGGAATATTTAAACGCAAGT R:TTTTTGCTACTATCCTCTTTCCAGTT	101
Osteogenic markers			
ALP	XM_001504312	F:GATGGCCTGAACCTCATCGA R:AGTTCCGTCCGGTCCAGAT	92
RUNX2	XM_001502519.3	F:CTCCAACCCACGAATGCACTA R:CGGACATACCGAGGGACATG	80
Adipogenic markers			
LPL	XM_001489577	F:TGTATGAGAGTTGGGTGCCAAA R:GCCAGTCCACCACAATGACAT	70
PPAR γ	XM_001492411	F:TGCAAGGGTTTCTTCCGGA R:GCAAGGCATTTCTGAAACCG	104

Genes were grouped in agreement with the functions and implications of encoded molecules as follows to facilitate the posterior analysis: housekeeping, cell surface markers, proliferation related enzymes, molecules participating in apoptosis, apoptosis-related proinflammatory cytokines, osteogenic markers and adipogenic markers.

primers is shown in Table 1.

Statistical analysis

Data obtained in this study were subjected to statistical analysis using SPSS 15.0 (SPSS, USA). Proliferation data are presented as the means (n = 3) ± SEM cell count of stimulated and unstimulated eBM-MSCs at each time point (7 days) for each experiment. Differences in mean cell numbers between stimulated and unstimulated eBM-MSCs from each day were analyzed by paired Student's t tests separately for each experiment. RT-qPCR data are reported as the means (n = 3) ± SEM fold increase or decrease of stimulated eBM-MSCs gene expression over unstimulated control eBM-MSC. Differences between eBM-MSCs from every inflammatory condition (SF, CK50 and CK20) and their controls were analyzed by paired Student's t-tests. The significance level was set at p < 0.05 for all analyses.

Results

Isolation and characterization of eBM-MSCs

Cells obtained from EQ01, EQ02 and EQ03 BM aspirates showed plastic-adherent fibroblast-like morphology and were positive for the surface markers CD90, CD105, CD44 and MHC-I and negative for MHC-II by flow cytometry. All samples expressed transcripts for CD105, CD90, CD73, CD44 and MHC-I, but not for CD34 and CD45, and low levels for MHC-II by RT-qPCR. The ability of tri-lineage was confirmed in all cases (data not shown).

Inflammatory synovial fluid harvesting

The average total protein measurement in the harvested synovial fluid was 2.25 g/dL. The SAA concentration was 0.585 × 10⁻³ g/dL and the Hp concentration was 0.023 g/dL.

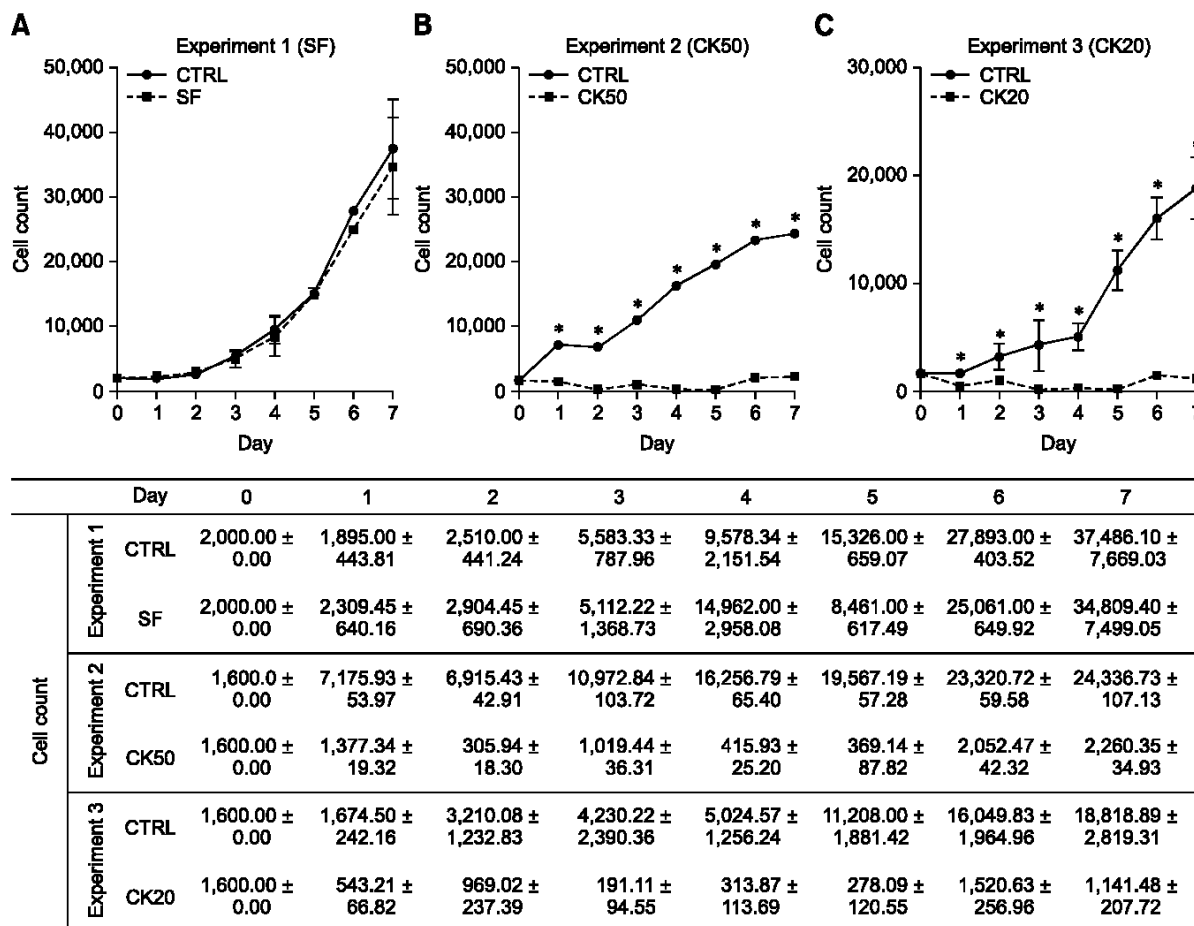


Fig. 1. Proliferation related enzymes of control and inflammatory- exposed eBM-MSCs from Experiment 1 (SF), 2 (CK50) and 3 (CK20) over 7 days. eBM-MSC proliferation potential was unaltered after SF exposure; however, this property was diminished after culturing cells with both CK20 and CK50 media. Proliferation was evaluated by MTT assay. The means ± SEM (n = 3) of the cell count are shown for each experiment at each time-point in both linear graphs (*p < 0.05) and a data table.

These data confirmed the inflammatory status of the synovial fluid, and when combined with the cytological examination discarded a septic origin of the joint inflammation.

Effects of inflammatory environment on eBM-MSCs proliferation

For the MTT assay, the total number of viable cells from every sample was determined by extrapolation from the calibration curve: $y = 9 \times 10^{-6}x + 0.0805$, $r^2 = 0,939$, where y represents the optical density of the well and x represents the amount of cells. Synovial fluid-exposed eBM-MSCs grew in a similar manner to control cells (panel A in Fig. 1). In both CK50 and CK20 experiments, the number of CK-stimulated cells

Table 2. Cell doubling time (DT) for control and inflammatory-stimulated eBM-MSCs.

DT mean \pm SEM (d)	Control	Inflammatory stimulation
Experiment 1 (SF)	2.434 \pm 0.197	2.507 \pm 0.219
Experiment 2 (CK50)	1.857 \pm 0.160	9.001 \pm 2.51
EXperiment 3 (CK20)	2.676 \pm 0.195	10.729 \pm 1.923

Results are shown as the mean \pm SEM (n=3) of DT for control and inflammatory exposed eBM-MSCs from Experiment 1 (SF), 2 (CK50) and 3 (CK20). Cell doubling time was calculated according to the formula: $CD = \ln [(Nf/Ni)/\ln 2]$ and $DT = CT/CD$, where DT, cell doubling time; Nf, final number of cells; Ni, initial number of cells; CD, cell doubling number.

decreased until the fourth day, then increased slightly until the sixth day, but still remained below the initial level (panels B and C in Fig. 1). Significant differences ($p < 0.05$) in the number of cells were observed between control and CK-exposed cells in all days under both CK20 and CK50 conditions. As shown in Table 2, the cell doubling times were also similar between control and SF stimulated eBM-MSCs, but increased greatly in both CK50 and CK20-stimulated eBM-MSCs. The proliferation related genes *COX-1* and *Cyclin D2* were significantly downregulated under the CK50 and CK20 conditions ($p < 0.05$), and their expression remained similar in the SF experiment (Fig. 2).

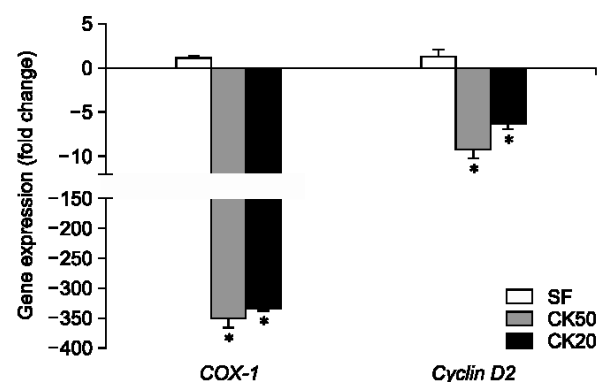


Fig. 2. eBM-MSCs expression of proliferation related enzymes is influenced by inflammatory stimulation. Gene expression of *COX-1* and *CyclinD2* in inflammatory exposed eBM-MSCs is expressed as the mean \pm SEM (n = 3) fold increase or decrease compared to the corresponding control from each experiment (* $p < 0.05$).

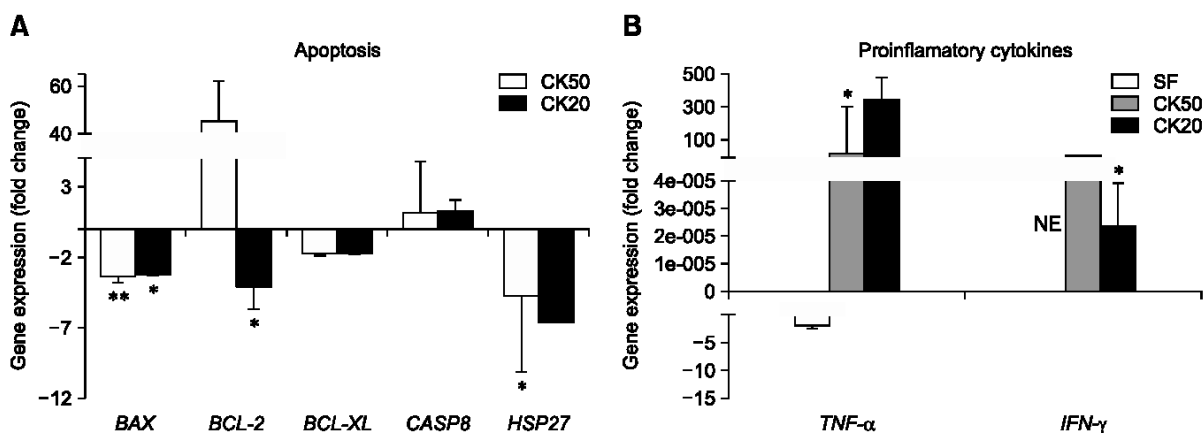


Fig. 3. eBM-MSCs expression of certain genes encoding apoptosis-related molecules can be affected by proinflammatory cytokines. Gene expression of each gene in every experiment is represented as the mean \pm SEM (n = 3) fold increase or decrease compared to the corresponding control from each experiment. (A) Expression of genes encoding molecules directly participating in the apoptosis mechanisms *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *CASP8*, and *HSP27*. (B) Expression of genes encoding proinflammatory cytokines related to apoptosis *TNF- α* and *IFN- γ* . NE, no expression. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Effect of inflammatory environment on apoptosis gene expression of eBM-MSCs

Apoptosis-related gene expression was studied in CK50 and CK20 exposed eBM-MSCs. *BAX* was significantly downregulated under both CK50 ($p < 0.01$) and CK20 ($p < 0.05$) conditions, while *BCL-2* was only significantly downregulated under CK20 conditions. *CASP8* showed a trend to increase its expression under both CK conditions. The anti-apoptotic factor *heat shock protein 27 (HSP27)* was significantly downregulated under CK50 conditions (panel A in Fig. 3). *TNF- α* expression was downregulated and no-expression was found for *IFN- γ* under SF conditions, whereas significant upregulation of *TNF- α* ($p < 0.05$) and *IFN- γ* ($p < 0.05$) was observed in CK50 and CK20, respectively (panel B in Fig. 3).

Effect of inflammatory environment on eBM-MSCs differentiation potential

Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation were achieved in control (unstimulated) cells from the three experiments. Spontaneous differentiation was not observed in any of the non-differentiated controls.

Osteogenic differentiation was confirmed in SF-exposed eBM-MSCs by positive staining of the calcium deposits with Alizarin red. CK-stimulated eBM-MSCs showed irregular morphology, but did not form a calcium-rich matrix (panel A in Fig. 4). *Alkaline phosphatase (ALP)* and *Runt-related transcription*

factor 2 (RUNX2) gene expression was not significantly modified by SF conditions, but the expression of both genes in SF-exposed eBM-MSCs was slightly higher than in the differentiated control (panel A Experiment 1 in Fig. 5). Expression of *ALP* and *RUNX2* was downregulated in CK50-exposed eBM-MSCs compared to the differentiated control; however, this downregulation was only significant for *RUNX2* ($p < 0.05$) (panel A Experiment 2 in Fig. 5). *ALP* increased by 18.93-fold in SF-differentiated cells relative to the control, but only by 2.49 in CK50-differentiated cells. *RUNX2* expression in SF-differentiated cells increased by 4.48-fold, whereas a 3.85-fold decrease was observed in CK50-differentiated cells (panel A in Fig. 5).

Oil red O staining revealed lipid droplets in SF-exposed eBM-MSCs undergoing adipogenic induction. Both CK50 and CK20-stimulated cells did not display an adipogenic phenotype (panel B in Fig. 4). *Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* and *lipoprotein lipase (LPL)* mRNA levels were not significantly modified by SF exposure (panel B Experiment 1 in Fig. 5). *LPL* and *PPAR γ* in CK50- and SF-differentiated cells showed similar increases relative to non-differentiated control cells, but both genes were significantly downregulated in CK50-exposed cells ($p < 0.05$) compared to unstimulated differentiated cells (panel B Experiment 2 in Fig. 5).

Synovial fluid-exposed cells maintained their chondrogenic differentiation potential, as indicated by the positive blue staining of the extracellular matrix upon Alcian blue staining. However, neither CK50 nor CK20-exposed eBM-MSCs differentiated into the chondrogenic lineage, and they formed irregular discoid pellets instead of the typical spherical shape (panel C in Fig. 4).

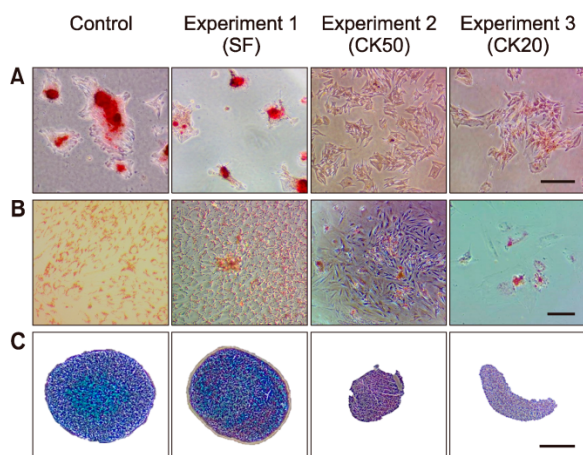


Fig. 4. Staining for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of control and inflammatory-stimulated eBM-MSCs from three experiments. (A) Alizarin red staining of eBM-MSCs cultured for 7 days in osteogenic differentiation medium from control and Experiment 1-3. (B) Oil red O staining of eBM-MSCs cultured for 15 days in adipogenic differentiation medium from control and Experiment 1-3. (C) Haematoxylin and Alcian blue staining of pellets cultured for 21 days in chondrogenic medium from control and Experiment 1-3. Scale bars = 500 μm (A and B), 2 μm (C). 10 \times (A), 4 \times (B), 20 \times (C).

Discussion

Both APPs analyzed in the inflammatory synovial fluid were above the reference ranges [1,14], which is in agreement with the expected changes for these proteins [14]. The inflammatory environment provided by cytokine priming resulted in a remarkable viability impairment of eBM-MSCs, whereas SF conditions did not alter their regular growth. The significant down-regulation of *COX1* and *CyclinD2*, enzymes involved in the regulation of the cell cycle and cell proliferation [33,36], in both CK experiments might be related to the failed proliferation of eBM-MSCs [33,36]. Thus, treatment with both cytokine concentrations appeared to be cytotoxic. To elucidate this phenomenon under CK conditions, the expression of several genes involved in the apoptosis process was investigated. *BCL2-Associated X Protein (BAX)* is a proapoptotic gene and *BCL-2* is an antiapoptotic gene, both of which are involved in the apoptosis mitochondrial pathway [13]. While *BAX* was downregulated under both CK conditions, *BCL-2* expression showed contrasting results between CK50 and CK20 experiments,

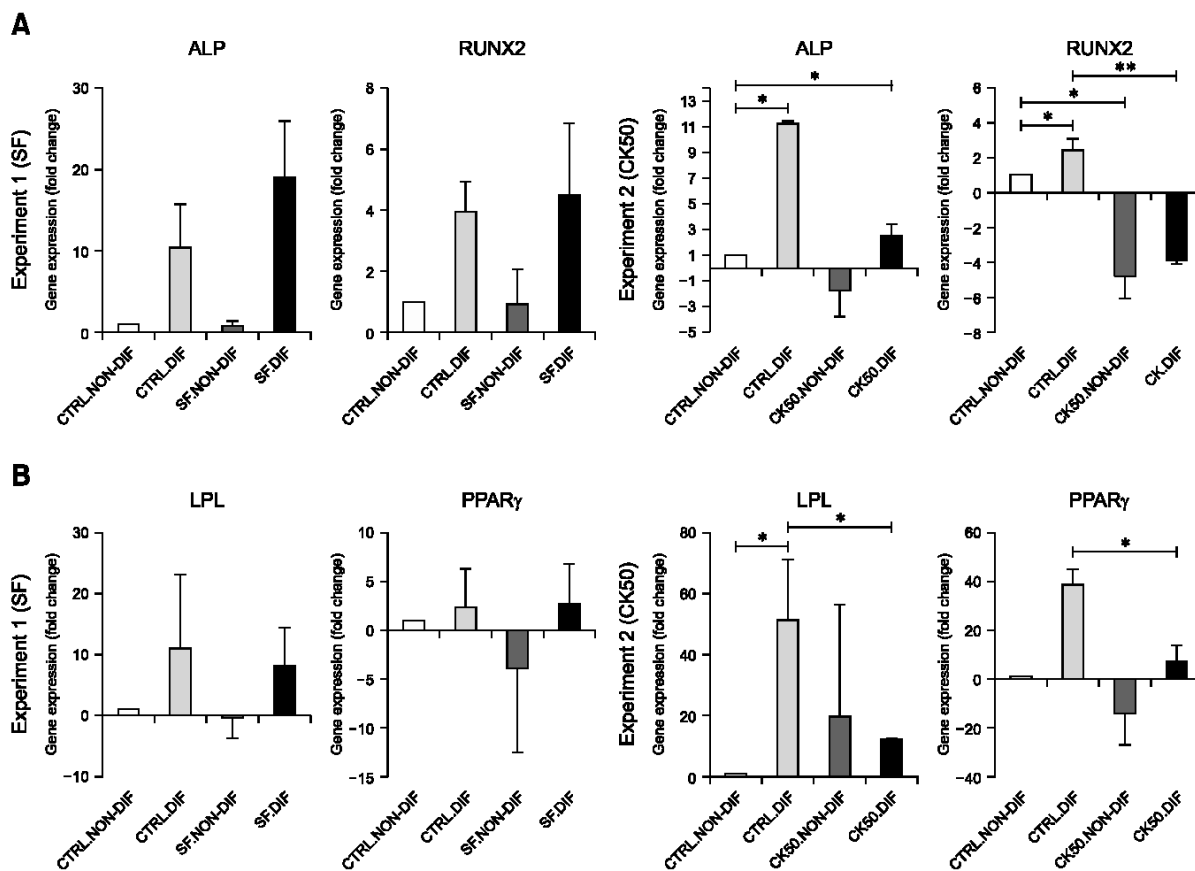


Fig. 5. Effect of inflammatory conditions on gene expression of differentiation markers. Influence of the three inflammatory conditions tested on eBM-MSC expression of genes encoding osteogenesis (*ALP* and *RUNX2*) and adipogenesis (*LPL* and *PPAR γ*) markers. The results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$) fold increase or decrease of differentiated control cells (CTRL.DIF), non-differentiated SF or CK50 exposed eBM-MSCs (SF.NON-DIF and CK50.NON-DIF) and differentiated SF or CK50 exposed eBM-MSCs (SF.DIF and CK50.DIF) over control unstimulated and non-differentiated cells (CTRL.NON-DIF). The white bar in all graphs (1 ± 0) represents the CTRL.NON-DIF fold change over itself relative to the fold increase or decrease under other conditions. (A) Gene expression of osteogenesis markers in cells from Experiment 1 (SF) and Experiment 2 (CK50). (B) Gene expression of adipogenesis markers in cells from Experiment 1(SF) and Experiment 2 (CK50).

which suggest that the apoptosis mitochondrial pathway might not be involved. However, the apoptosis death receptor pathway might be involved since *CASP8* showed a trend to upregulation [13]. In addition, the downregulation of *HSP27*, which protects against injury-related MSC apoptosis [34], might be associated with failed cell development and cell differentiation [34]. *TNF- α* and *IFN- γ* have a synergic effect in the induction of apoptosis by the death receptor signaling pathway in MSCs [20]. Additionally, *TNF- α* converts the signaling of the non-apoptotic receptor Fas, which is activated by *IFN- γ* , into a *CASP8* proapoptotic cascade in MSCs [20,38]. Based on these findings, the apoptotic process might be involved in the low viability and plasticity of CK-exposed eBM-MSCs.

Reduction of the tri-lineage differentiation ability of MSCs by proinflammatory cytokines has been described in other species. T-cells mediated secretion of *TNF- α* and *IFN- γ* synergistically hamper osteogenesis, chondrogenesis [6,9,23] and adipogenesis [17]. *TNF- α* or *IL-1 β* exposure significantly reduces the gene expression of osteogenic, adipogenic and chondrogenic markers in murine MSCs [17]. In humans and rats, these cytokines inhibit the expression of the osteoblast differentiation transcription factor, *RUNX2* [7,9]. Moreover, *TNF- α* plays a dual role in osteogenesis. On the one hand, it inhibits the osteoblast differentiation transcription factor *RUNX2* [9]. On the other hand, *TNF- α* can enhance the MSC osteogenic differentiation in a dose-dependent manner, although this effect is avoided in the presence of anti-inflammatory

agents, such as dexamethasone, which is added to the osteogenic-induction media [22]. It has been proposed that the inhibition of osteoblast differentiation by TNF- α occurs through the p55 TNF receptor [10]. High secretion of IFN- γ by immune cells has also been shown to prevent osteogenesis in MSCs in allogeneic implants in mice by dramatically reducing the expression of *ALP* and *RUNX2* [6]. Our results agreed with those of previous reports in others species since the transcript levels of *ALP* and *RUNX2* detected were lower in the presence of TNF- α and IFN- γ . Adipogenesis could also be impaired by inflammatory conditions because high levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , lead to a reduction in *PPAR γ* expression by MSCs [4]. In agreement, *PPAR γ* gene expression was down-regulated under our CK conditions, resulting in a commitment of adipogenic differentiation. TNF- α and IFN- γ have also been described as inhibitors of chondrogenesis and collagen formation in rat and mouse MSCs [17,24]. Chondrogenesis has been shown to be hindered through the inhibition of the chondrogenic factor *Sox9* caused by these cytokines [23]. According to these reports, our CK conditions also led to a lack of chondrogenic potential in eBM-MSCs. The effects of proinflammatory cytokines on MSC differentiation could vary between species and, to our knowledge, this is the first time that this effect has been studied on equine MSCs. Overall, our results support the findings reported for other species [7,17] demonstrating the inhibitory effect of proinflammatory cytokines on the tri-lineage differentiation of eBM-MSCs.

The natural joint environment could be favorable for chondrogenic differentiation [12,25]. However, when proinflammatory cytokines are present in high amounts, synovial fluid turns into an inflammatory environment, preventing chondrogenesis [19]. Depending on the level of proinflammatory cytokines, inflammatory synovial fluid could be more or less harmful for chondrogenesis and cartilage matrix formation (*i.e.*, rheumatoid arthritis vs. OA) [16]. Under our experimental conditions, tri-lineage differentiation was achieved by SF-exposed eBM-MSCs, suggesting that a moderate inflammatory status of the synovial fluid did not have a significant effect on eBM-MSCs differentiation ability.

The present research provides novel results about eBM-MSCs in inflammatory environments that can contribute to their intra-articular use for therapeutic applications. In summary, an inflammatory synovial environment is satisfactorily tolerated by eBM-MSCs, which maintained their proliferation and differentiation abilities, encouraging the use of cell therapy for joint pathologies. In contrast, cytokine priming tested in this study negatively affected the eBM-MSCs proliferation and differentiation abilities, and appeared to induce apoptosis, possibly compromising their *in vivo* efficacy and their therapeutic potential.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (AGL2011-28609) and by the Government of Aragón (Research Group LAGENBIO). Laura Barrachina is funded by a doctoral grant from the Government of Aragón. Ana Rosa Remacha is funded by a doctoral grant (EPIF) from the University of Zaragoza. We thank the horse owners for allowing their animals to be part of this study and the Veterinary Hospital of the University of Zaragoza for facilitating access to equine patients and allowing the use of its installations for collecting samples. We also acknowledge the Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of the University of Zaragoza for the help with analyses of acute phase proteins in the synovial fluid.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. **Basile RC, Ferraz GC, Carvalho MP, Albemaz RM, Araújo RA, Fagliari JJ, Queiroz-Neto A.** Physiological concentrations of acute-phase proteins and immunoglobulins in equine synovial fluid. *J Equine Vet Sci* 2013, **33**, 201-204.
2. **Casella S, Fazio F, Giannetto C, Giudice E, Piccione G.** Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse. *Res Vet Sci* 2012, **93**, 914-917.
3. **Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee.** Cellular products for joint surface repair. Briefing document of the 38th Meeting of Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee. 3-4 March 2005, Silver Spring, USA.
4. **Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, Fock RA.** A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation* 2013, **36**, 379-386.
5. **Cuerquis J, Romieu-Mourez R, François M, Routy JP, Young YK, Zhao J, Eliopoulos N.** Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. *Cytotherapy* 2014, **16**, 191-202.
6. **Dighe AS, Yang S, Madhu V, Balian G, Cui Q.** Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res* 2013, **31**, 227-234.
7. **Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, Hardouin P, Magne D.** TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 2009, **84**, 499-504.
8. **Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Kawcak CE, Goodrich LR.** Clinical outcome after intra-articular

48 Laura Barrachina *et al.*

- administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg* 2014, **43**, 255-265.
9. **Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS.** Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 α A) is inhibited by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 2002, **277**, 2695-2701.
 10. **Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS.** The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, **288**, E1011-1018.
 11. **Goodrich LR, Nixon AJ.** Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* 2006, **171**, 51-69.
 12. **Hegewald AA, Ringe J, Bartel J, Krüger I, Nötter M, Barnewitz D, Kaps C, Sittlinger M.** Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell* 2004, **36**, 431-438.
 13. **Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE.** Cell death. *N Engl J Med* 2009, **361**, 1570-1583.
 14. **Jacobsen S, Thomsen MH, Nanni S.** Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am J Vet Res* 2006, **67**, 1738-1742.
 15. **Kolm G, Klein D, Knapp E, Watanabe K, Walter I.** Lactoferrin expression in the horse endometrium: relevance in persisting mating-induced endometritis. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, **114**, 159-167.
 16. **Krüger JP, Endres M, Neumann K, Stuhlmüller B, Morawietz L, Häupl T, Kaps C.** Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is affected by synovial fluid from donors with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *J Orthop Surg Res* 2012, **7**, 10.
 17. **Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA.** Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**, 735-742.
 18. **Leijts MJC, van Buul GM, Lubberts E, Bos PK, Verhaar JAN, Hoogduijn MJ, van Osch GJVM.** Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: an explorative *in vitro* study. *Front Immunol* 2012, **3**, 231.
 19. **Liu X, Xu Y, Chen S, Tan Z, Xiong K, Li Y, Ye Y, Luo ZP, He F, Gong Y.** Rescue of proinflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis by the antiarthritic effect of melatonin in synovium mesenchymal stem cells via suppression of reactive oxygen species and matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2014, **68**, 234-246.
 20. **Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen W, Wang S, Shi S.** Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med* 2011, **17**, 1594-1601.
 21. **Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y.** Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2014, **21**, 216-225.
 22. **Mountziaris PM, Tzouanas SN, Mikos AG.** Dose effect of tumor necrosis factor- α on *in vitro* osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds. *Biomaterials* 2010, **31**, 1666-1675.
 23. **Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B.** Potent inhibition of the master chondrogenic factor *Sox9* gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 2000, **275**, 3687-3692.
 24. **Nanes MS, McKoy WM, Marx SJ.** Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α and interferon- γ on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* 1989, **124**, 339-345.
 25. **Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP.** Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002, **190**, 51-63.
 26. **Paterson YZ, Rash N, Garvican ER, Paillet R, Guest DJ.** Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged *in vitro*. *Stem Cell Res Ther* 2014, **5**, 90.
 27. **Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I.** Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**, 147-154.
 28. **Ranera B, Ordoñas L, Lyahyai J, Bernal ML, Fernandes F, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Osta R, Cons C, Varona L, Zaragoza P, Martín-Burriel I, Rodellar C.** Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J* 2012, **44**, 33-42.
 29. **Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y.** Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008, **2**, 141-150.
 30. **Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y.** Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010, **184**, 2321-2328.
 31. **Roberts S, Genever P, McCaskie A, De Bari C.** Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. *Regen Med* 2011, **6**, 351-366.
 32. **Schlueter AE, Orth MW.** Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. *Equine Comp Exerc Physiol* 2004, **1**, 221-231.
 33. **Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinckmann JE.** In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005, **23**, 1357-1366.
 34. **Son TW, Yun SP, Yong MS, Seo BN, Ryu JM, Youn HY, Oh YM, Han HI.** Netrin-1 protects hypoxia-induced mitochondrial apoptosis through HSP27 expression via DCC- and integrin $\alpha 6 \beta 4$ -dependent Akt, GSK-3 β , and HSF-1 in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 2013, **4**, e563.
 35. **van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, Narcisi R, Weinans H, Verhaar JAN, Bernsen MR, van Osch**

- GJVM.** Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**, 1186-1196.
36. **Vane JR, Bakhle YS, Botting RM.** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998, **38**, 97-120.
37. **Vézina Audette R, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP, Laverty S.** Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, **21**, 1116-1124.
38. **Wang L, Zhao Y, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu C, Jin Y, Shi S.** IFN- γ and TNF- α synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF κ B signaling. *Stem Cells* 2013, **31**, 1383-1395.
39. **Zimmermann JA, McDevitt TC.** Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytherapy* 2014, **16**, 331-345.



**Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells
with Proinflammatory Cytokines: Implications in
Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability,
and Differentiation Potential**

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José;
Albareda, Jorge; Prades, Marta; Gosálvez, Jaime; Roy, Rosa; Zaragoza, Pilar; Martín-
Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina

*Stem cells and development. 26 (1), pp. 15-24. 2017. DOI:
10.1089/scd.2016.0209*

*La portada para este número de la revista (26-1) fue proporcionada por los autores del artículo incluido
como Manuscrito III en la presente Tesis Doctoral.*

Priming equine bone marrow derived mesenchymal stem cells (eBM-MSCs) with pro-inflammatory cytokines: implications in immunomodulation-immunogenicity balance, cell viability and differentiation potential

Laura Barrachina, Ana Rosa Remacha, Antonio Romero, Francisco José Vázquez, Jorge Albareda, Marta Prades, Jaime Gosálvez, Rosa Roy, Pilar Zaragoza, Inmaculada Martín-Burriel, Clementina Rodellar

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have a great potential for treating equine musculoskeletal injuries. Although their mechanisms of action are not completely known, their immunomodulatory properties appear to be key in their functions. The expression of immunoregulatory molecules by MSCs is regulated by pro-inflammatory cytokines, so inflammatory priming of MSCs might improve their therapeutic potential. However, inflammatory environment could also increase MSC immunogenicity and decrease MSC viability and differentiation capacity. The aim of this study was to assess the effect of cytokine priming on eBM-MSC immunoregulation, immunogenicity, viability and differentiation potential, in order to enhance MSC immunoregulatory properties, without impairing their immune-evasive status, viability and plasticity. Equine BM-MSC (n=4) were exposed to 5ng/ml of TNF α and IFN γ during 12h (CK5-priming). Subsequently, expression of genes coding for immunomodulatory, immunogenic and apoptosis related molecules was analyzed by RT-qPCR. Chromatin integrity and proliferation assay were assessed to evaluate cell viability. Tri-lineage differentiation was evaluated by specific staining and gene expression. Cells were re-seeded in basal medium for additional 7 days post-CK5 to elucidate if priming-induced changes were maintained along the time. CK5-priming led to an upregulation of immunoregulatory genes *IDO*, *iNOS*, *IL-6*, *COX-2* and *VCAM-1*. *MHC-II* and *CD40* were also upregulated, but no change in other costimulatory molecules was observed. These changes were not maintained 7 days after CK5-priming. Viability and differentiation potential were maintained after CK5-priming. These findings suggest that CK5-priming of eBM-MSCs could improve their *in vivo* effectiveness without affecting other eBM-MSCs properties.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a promising tool for treating musculoskeletal injuries in horses, but their mechanisms of action are not fully understood. Despite the low ability of MSCs for engrafting in tissues such as cartilage, these cells elicit therapeutic benefits. This effect has been attributed to the immunomodulatory and anti-inflammatory properties of MSCs, suggesting that these abilities are implied in their therapeutic role [1,2]. The MSC immunoregulatory mechanism is a multifactorial process involving both direct cell-to-cell contact and contact-independent paracrine signaling. The expression of several molecules implied in MSC immunomodulation is regulated by pro-inflammatory molecules, such as interferon γ (IFN γ) and tumor necrosis factor α (TNF α) [3]. Since MSC priming through exposure to an inflammatory environment may be needed for developing their full regulatory function, stimulating MSCs with proinflammatory cytokines *in vitro*, prior to their *in vivo* administration, is an interesting approach for improving their therapeutic potential [4]. Nevertheless, inflammatory exposure could also increase MSC immunogenicity [5], impair MSC differentiation capacity [6-8] and diminish MSC viability [9]. Therefore, possible caveats must be considered for the use of primed MSCs, especially for their allogeneic implantation. Previous reports showed these effects on equine bone marrow derived-MSCs (eBM-MSCs) after inflammatory stimulation, which induced immunoregulation but also upregulated MHC expression and impaired viability and plasticity [10,11]. Therefore, testing lower cytokine dose and shorter times of exposure for enhancing MSC immunoregulatory properties, without compromising immune-evasive status, viability and plasticity, could increase MSC therapeutic efficacy.

The aim of this study was to assess the effects of cytokine priming on eBM-MSC immunoregulation, immunogenicity, viability and differentiation potential, in search of a balance between stimulation of their immune-suppressive capacity without related induction of negative effects on their other properties.

Material and methods

Animals

Four Shetland ponies geldings (aged 4-7 years, weight 138-162 kg) were used as bone marrow (BM) donors. All horses were determined to be in good health. All procedures were carried out within the Project License 31/11 approved by the in-house Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63.

Harvesting and characterization of eBM-MSCS

Twenty ml of BM from sternum were obtained using a 4" 11G Jamshidi needle in heparinized syringes. Equine BM-MSCs were isolated using a gradient density separation technique as previously described [12]. Cells were seeded in culture medium consisting of low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)¹ supplemented with 1% Glutamine¹, 1% Streptomycin/ Penicillin¹ and 10% Fetal Bovine Serum (FBS)¹. Cells were expanded until passage three and characterized by phenotype determination and tri-lineage differentiation as previously described [12]. Subsequently, cells were frozen in 10% DMSO¹-90% FBS medium and cryopreserved until experiments started.

Priming of eBM-MSCs

Cryopreserved eBM-MSCs (n=4) were thawed and seeded at 5000 cells/cm² in basal medium at 37°C and 5% CO₂ for 5 days, allowing re-adjustments of conditions prior to initiating the experiments. A preliminary assay was conducted in order to select the optimal time of exposure to cytokines (Additional file 1) and eBM-MSC were exposed during 12h to 5ng/ml of TNFα² plus 5ng/ml of IFNγ², added to the basal culture medium described above (CK5-medium). Basal medium was used as negative control (Control-medium). Both control- and CK5-conditions were tested in triplicate. After 12h-exposure, eBM-MSCs were detached with 0.25% trypsin-EDTA¹ and used for subsequent assays. Part of the cells from both control- and CK5-conditions were re-seeded in basal medium for additional 7 days to assess if priming-induced changes in CK5-cells were maintained in time over control-cells by re-analyzing the genes which were significantly upregulated at 12h.

Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Expression of genes related with immunoregulation, immunogenicity, apoptosis and differentiation markers was analyzed by RT-qPCR. Total mRNA from approximately 10^6 eBM-MSCs from each sample was isolated with the RNeasy Mini RNA Isolation Kit³. Genomic DNA was removed with the kit DNase Turbo⁴ and 1 μ g of mRNA from each sample was retrotranscribed to cDNA by using the Superscript Reverse Transcriptase Kit⁵. Isolation of mRNA and cDNA retrotranscription were performed with the kit Cells-to-cDNA II⁴ in eBM-MSCs samples from differentiation assays and from 7 days post-priming assessment. All procedures were performed according to manufacturer instructions.

RT-qPCR reactions were performed and monitored using a StepOne Real Time PCR System device⁶. All reactions were carried out using Fast SYBR Green Master Mix⁶ and 2 μ l of cDNA as template. Amplification was performed in triplicate following the protocol: 20 s at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 3'' at 95°C and 30'' at 60°C. A dissociation curve protocol was run after every reaction. Levels of gene expression were obtained using the comparative Ct method. Normalization factor (NF) was calculated as the geometric mean of the quantity of 2 housekeeping genes, *GAPDH* and *B2M* [12]. Primers were designed with the Primer Express 2.0 software based on known equine sequences. Information about primers is shown in Table 1.

GENE	Accession number	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size
HOUSE-KEEPING			
<i>GAPDH</i>	NM_001163856	F:GGCAAGTTCATGGCACAGT R:CACAACATATTCAGCACCAGCAT	128
<i>B2M</i>	NM_001082502.2	F: TCGTCCTGCTCGGGCTACT R: ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
IMMUNOMODULATION-RELATED MOLECULES			
<i>IDO</i>	XM_001490681	F: TCATGACTACGTGGACCCAAAA R: CGCCTTCATAGAGCAGACCTTC	104
<i>iNOS</i>	AY027883	F: CCAACAATGGCAACATCAGGT R: TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
<i>IL-6</i>	EU438770	F: AACAGCAAGGAGGTACTGGCA R: CAGGTCTCCTGATTGAACCCA	95
<i>COX-2</i>	AB041771	F: GTTTGCATTTTTTGGCCAGC R: ACTTAAATCCACCCCGTGACC	103
<i>IL-10</i>	EU438771	F: GACATCAAGGAGCACGTGAACT R: TGGAGCTTACTGAAGGCACTCT	140

GENE	Accession number	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size
IMMUNOMODULATION-RELATED MOLECULES			
<i>TGFβ-1</i>	AF175709	F: GTCCTTTGATGTCACCGGAGT R: TGGAACTGAACCCGTT	137
<i>VCAM-1</i> (<i>CD106</i>)	DQ246452	F: TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R: TTGATGGTCTCCCGATGA	127
<i>CXCR4</i>	XM_001490165	F: TGCAGCAGCAGGTAGCAAAGT R: ATATACGGAACCCGTCCATGG	97
ANTIGEN PRESENTING-RELATED MOLECULES			
<i>MHC-I</i>	AB525081	F: CGTGAGCATCATTGTTGGC R: TCCCTCTTTTTTCACTGAGG	92
<i>MHC-II</i>	NM_001142816	F: AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R: CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
<i>CD40</i>	AY514017	F: ACAAATACTGCGACCCCAACC R: TTTACAGGCATCGCTGGA	114
<i>CD80</i>	Krampera 2006	F: CAGGAAAGTTGGCTCTGACCA R: TCTCCATTGTGATCCTGGCTC	135
<i>CD86</i>	De Schauwer 2014	F: AGTATAAAGGCCGCACAAGC R: CCTTGGGTAGATGAGCAGGT	247
<i>CD40L</i>	XM_001490011	F: AGTTCGAAGGCTTCGTCAAGG R: CGCAATTTGAGGCTCCTGAT	101
MOLECULES IMPLIED IN APOPTOSIS			
<i>BAX</i>	XM_005596728.1	F: AGTGTCTCAAGCGCATCGG R: CACTCGGAAAAAGACCTCGC	104
<i>BCL-2</i>	Ryhner, 2008	F: GCCTATCTGGGCCACAAGT R: TTTCCCTTTGGCAGTAAATAGC	200
OSTEOGENIC MARKERS			
<i>ALP</i>	XM_001504312	F: GATGGCCTGAACCTCATCGA R: AGTTCGGTCCGGTTCAGAT	92
<i>RUNX2</i>	XM_001502519.3	F: CTCCAACCCACGAATGCACTA R: CGGACATACCGAGGGACATG	80
ADIPOGENIC MARKERS			
<i>LPL</i>	XM_001489577	F: TGTATGAGAGTTGGGTGCCAAA R: GCCAGTCCACCACAATGACAT	70
<i>PPARγ</i>	XM_001492411	F: TGCAAGGGTTTCTTCCGGA R: GCAAGGCATTTCTGAAACCG	104
CHONDROGENIC MARKERS			
<i>ACAN</i>	AF019756	F: CTACGACGCCATCTGCTACA R: ACCGTCTGGATGGTGATGTC	96
<i>COL2A1</i>	XM_005611082.1	F: TTAGACGCCATGAAGGTTTTCTG R: CTCTTGCTGCTCCACCAGTTCT	101

Table 1. Primers used for gene expression by RT-qPCR. GenBank accession numbers of the sequences used for primers design. Primers (F: Forward and R: Reverse) and length of the amplicon in base pair (bp). Genes were grouped in agreement with the functions and implications of encoded molecules.

Proliferation

Proliferation after CK5-priming was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay¹ during 6 days as previously described [13]. Triplicates of each sample were seeded in basal medium at 5,000 cells/cm² in 96-well plates. Basal medium was used as a blank. Biotek Synergy HT spectrophotometer was used to measure the optical density (570 nm) in each well. Viable cell numbers were determined by extrapolating from a standard curve consisting of 9 triplicated points of increasing quantity of cells (0-15.000 cells/cm²) as previously reported [13]. Calibration curve equation for cell number extrapolation was $y = 1 \cdot 10^{-5} x - 0.0349$, $r^2 = 0,997$ (y =optical density of the well; x =amount of cells). Cell doubling times (DT) were calculated according to the formulae: $CD = \ln [(N_f/N_i)/\ln 2]$ and $DT = CT/CD$, where DT = cell doubling time; N_f = final number of cells; N_i = initial number of cells; CD = cell doubling number.

Assessment of chromatin integrity

Chromatin integrity was evaluated via the chromatin dispersion test making use of the D3-Max Kit⁷. This methodology was specifically designed to assess DNA damage in somatic cumulus cells through minor adapting the previously described technique [14] to MSCs. DNA damage was visualized using a Proyser fluorescent microscope⁸ employing SyberGreen II fluorochrome⁹ at 40× magnification. Cells showing a large halo of chromatin dispersion were considered to contain highly fragmented DNA (Supplementary material 2). The percentages of normal cells and eBM-MSCs with fragmented DNA were determined in each sample by fluorescence microscope count by two independent observers. Equine BM-MSCs from one control were treated with hydrogen peroxide to perform a positive control of DNA damage through exposition to oxidative stress.

Tri-lineage differentiation assay

Equine BM-MSCs from both control and CK5 samples were exposed to induction medium (differentiation) and basal medium (negative control) in triplicates according to each differentiation assay:

Osteogenic differentiation

Equine BM-MSCs were seeded at 20,000 cells/cm² density in 24-well plates. Osteogenic medium consisted of 10 nmol/l dexamethasone¹, 10 mmol/l β-glycerophosphate¹ and 100 μmol/l ascorbate-2-phosphate¹ supplemented basal medium. After 7 days, differentiation was assessed by Alizarin Red staining. Cells were fixed with 70% ethanol for 1 hour at room temperature (RT), stained with 2% Alizarin Red stain (pH 4.6)¹ for 10 minutes (RT) and washed with PBS¹⁰.

Adipogenic differentiation

Equine BM-MSCs were seeded at 5,000 cells/cm² density in 12-well plates. Adipogenic medium consisted of 1 μmol/l dexamethasone¹, 500 μmol/l 3-isobutyl-1-methylxanthine¹, 200 μmol/l indomethacin¹ and 15% rabbit serum¹ supplemented basal medium. After 15 days, differentiation was evaluated by Oil Red O staining. The cells were fixed with 10% formalin¹ for 15 minutes at RT, stained with 0,3% Oil Red O¹ stain (dissolved in 60:40; isopropanol:distilled water) for 30 minutes at 37°C and washed with distilled water.

Chondrogenic differentiation

For chondrogenic differentiation assay, both control and CK5-eBM-MSCs were exposed to chondrogenic induction medium, but due to the number of available cells, culture in basal medium was not carried out. Approximately 300,000 eBM-MSCs from each sample were transferred to conic bottom 15 ml tube and 400 μl of chondrogenic differentiation medium were added and centrifuged at 1,750 rpm for 5 minutes to pellet the cells. Chondrogenic medium consisted of 10% FBS, 10 ng/ml TGFβ-3², ITS+ premix¹¹, 40μg/ml proline¹, 50μg/ml ascorbate-2-phosphate¹ and 0.1 μmol/l dexamethasone¹ supplemented high glucose DMEM¹. After 21 days, chondrogenic differentiation was evaluated by specific staining with Alcian blue staining. Pellets were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned into 5 μm sections. The sections were hydrated with increasing gradients of alcohols, stained with Mayer's haematoxylin and 3% Alcian Blue dyes, rinsed with distilled water, dehydrated with decreasing amounts of alcohol and mounted.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 15.0¹². Normality of each data group was tested with Shapiro-Wilk. Differences in mean cell numbers between control and CK5 eBM-MSCs along the proliferation assay were analyzed by the non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis test with Dunn's *post-hoc* test. Kruskal-Wallis test was also used to analyze differences between control non-differentiated, control-differentiated, CK5 non-differentiated and CK5-differentiated eBM-MSCs from tri-lineage differentiation assays. Differences in gene expression between CK5-eBM-MSCs and their controls were analyzed by Mann-Whitney test. Differences in percentages of normal (non-fragmented DNA) and DNA damaged cells were analyzed between control and CK5-exposed cells by student's t test. Significance level was set at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

Equine BM-MSCs immunomodulation after cytokine priming

Cytokine priming induced significant upregulation of the immunoregulatory-related genes *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)*, *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)*, *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)* ($p < 0.01$) and *Interleukin 6 (IL-6)* ($p < 0.05$) by eBM-MSCs. In addition, non-significant upregulation of *Cyclooxygenase 2 (COX-2)* and significant downregulation of *Interleukin 10 (IL-10)* ($p < 0.05$) were observed (Figure 1.A). Expression of significantly upregulated genes was evaluated 7 days after CK5-priming and *IL-6*, *IDO*, *iNOS* and *COX-2* expression remained similar to unstimulated control and *VCAM* expression significantly decreased ($p < 0.05$) (Figure 2).

Equine BM-MSCs immunogenicity after cytokine priming

Cytokine priming induced significant increase in the expression of *MHC-II* ($p < 0.05$) and the costimulatory molecule *CD40* ($p < 0.01$) by eBM-MSCs. *MHC-I* was upregulated in a non-significant manner and the expression level of costimulatory molecules *CD80*, *CD86* and *CD40-L* remained unchanged (Figure 1.B). Seven days after the 12h-cytokine priming, expression level of most relevant immunogenic molecules

was assessed and *MHC-I* and *MHC-II* expression decreased, reaching similar values than in control cells (Figure 2).

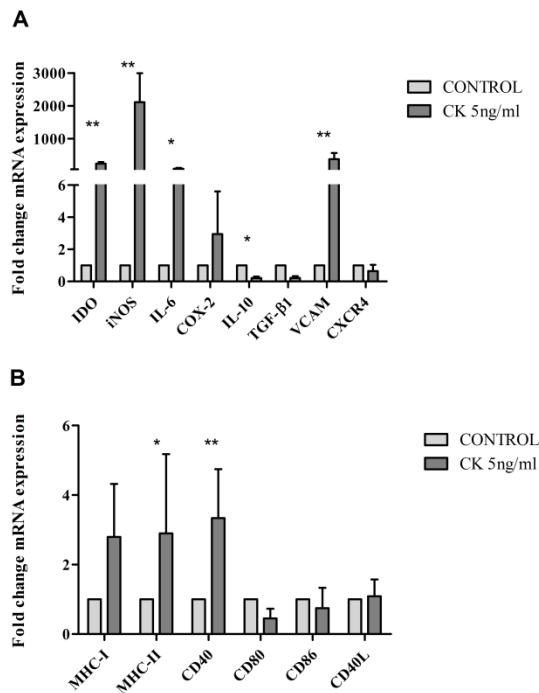


Figure 1.- Gene expression data are reported as mean (n=4) fold increase or decrease of CK5-stimulated eBM-MSCs gene expression over unstimulated-control eBM-MSC. A) Immunomodulatory related molecules expression after 12h of CK5 priming; B) Immunogenic related molecules expression after 12h of CK5 priming. (*=p<0.05; **=p<0.01)

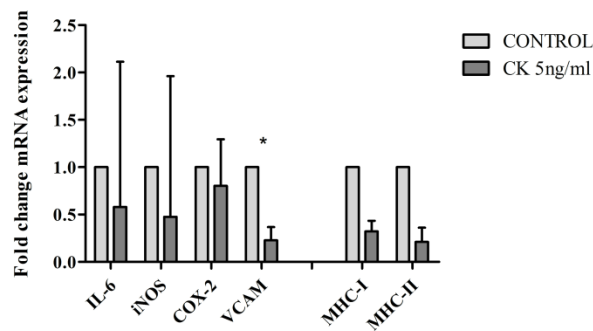


Figure 2.- Immunomodulatory and immunogenic related molecules expression 7 days after CK5-priming. Gene expression data are reported as mean (n=4) fold increase or decrease of CK5-stimulated eBM-MSCs gene expression over unstimulated-control eBM-MSC.

Equine BM-MSCs viability after cytokine priming

Proliferation assay

Proliferation data are presented in Figure 3.A. CK-exposed cells grew in a similar manner to control cells: significant differences in the number of cells were not observed between control and CK5-exposed cells and cell DT were similar between control cells (3.071 ± 1.316 days) and CK5-stimulated eBM-MSCs (3.280 ± 1.307 days).

Apoptosis gene expression

Proapoptotic gene *BCL2-Associated X Protein (BAX)* was downregulated in CK5-eBM-MSCs compared to control cells ($P < 0,005$), whereas there were no significant differences between control and stimulated cells for the anti-apoptotic gene *BCL-2* (Figure 3.B).

Chromatin integrity

Percentage of normal cells (non-fragmented chromatin) and DNA damaged cells (dispersed chromatin fragments) did not show significant differences between control and CK5-eBM-MSCs samples (Figure 3.C).

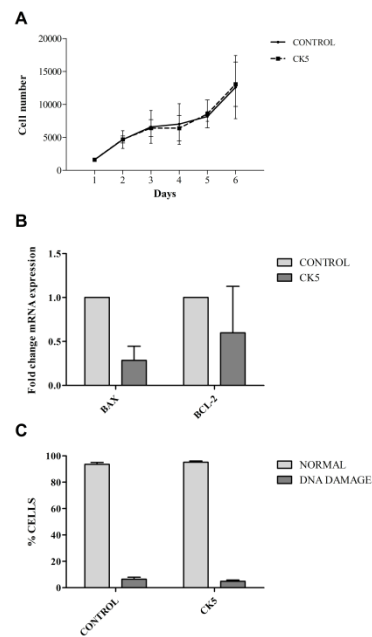


Figure 3.- Data from viability assays. A) Proliferation data is presented as mean ($n=4$) \pm SEM cell count of CK5-stimulated and unstimulated-control eBM-MSCs at each time point. B) Gene expression of apoptosis-related genes BAX and BCL-2 in control and CK5-exposed eBM-MSCs. Data are reported as mean ($n=4$) fold increase or decrease of CK5-stimulated eBM-MSCs gene expression over unstimulated-control eBM-MSC. C) Chromatin integrity assessment data is presented as percentage of normal (non-fragmented DNA) and DNA damaged eBM-MSCs for both control and CK5-stimulated samples.

Equine BM-MSCs differentiation after cytokine priming

Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation were achieved in control cells from all animals. Spontaneous differentiation was not observed in any of the non-differentiated controls (Figure 4.A-B).

Osteogenic differentiation

Osteogenic differentiation was confirmed in both control and CK5-exposed eBM-MSCs by positive staining of the calcium deposits with Alizarin Red (Figure 4.C-D). *Alkaline phosphatase (ALP)* and *Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* gene expression was significantly higher ($p<0.05$) in both control- and CK5-differentiated samples over their corresponding non-differentiated cells. In addition, expression of

RUNX2 was significantly higher ($p < 0.05$) in differentiated control-eBM-MSCs over differentiated CK5-exposed cells (Figure 5.A.1-2)

Adipogenic differentiation

Lipid droplets were detected in both control- and CK5-exposed eBM-MSCs under adipogenic induction by Oil red O staining (Figure 4.E-F). *Lipoprotein lipase (LPL)* mRNA level was significantly higher only in differentiated CK5-eBM-MSCs over correspondent non-differentiated cells ($p < 0.05$) (Figure 5.B.1).

Chondrogenic differentiation

Chondrogenic phenotype was achieved by both control and CK5-exposed cells, detected by positive blue staining of the extracellular matrix by Alcian Blue staining and lacunae formation (Figure 4.G-H). Both *aggrecan (ACAN)* and *collagen type II alpha I (COL2A1)* showed similar level of mRNA relative expression in both differentiated control- and CK5-eBM-MSCs (Figure 5.C).

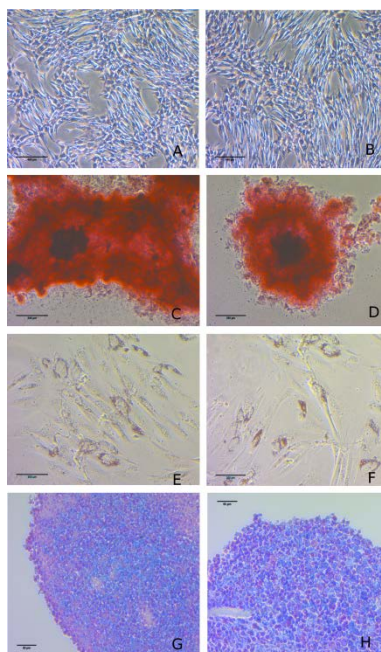


Figure 4.- Staining for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of control and CK5-stimulated eBM-MSC. Control (A) and CK5-stimulated (B) undifferentiated cells (magnification 4x); Alizarin red staining of eBM-MSCs differentiated into osteoblast, control (C) and CK5-exposed (D); Oil red O staining of eBM-MSCs differentiated into adipocytes, control (E) and CK5-exposed (F) (magnification 10x); Alcian Blue staining of pellets from eBM-MSCs undergoing chondrogenic differentiation, control (G) and CK5-exposed (H) (magnification 20x).

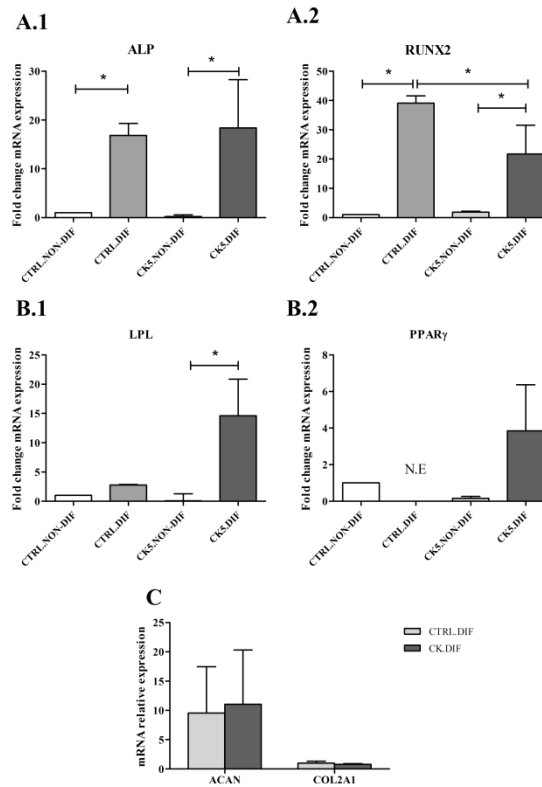


Figure 5.- Gene expression results of tri-lineage differentiation assay. Results from osteogenesis (A.1-2) and adipogenesis (B.1-2) are expressed as Mean \pm S.E.M (n=4) fold increase or decrease of differentiated control eBM-MSCs (CTRL.DIF), non-differentiated CK5-exposed eBM-MSCs (CK5.NON-DIF) and differentiated CK5-exposed eBM-MSCs (CK5.DIF) over control non-differentiated cells (CTRL.NON-DIF). Results from chondrogenic assay (C) are presented as Mean \pm S.E.M (n=4) mRNA relative expression of CTRL.DIF and CK5.DIF eBM-MSCs. (*= $p < 0.05$; N.E=no expression).

Discussion

TNF α and IFN γ synergistically induce eBM-MSC immunoregulatory abilities [10], but certain cytokine concentrations and time of exposure also produce a decrease in their proliferation and differentiation abilities [11]. Therefore, eBM-MSCs stimulation with a lower cytokine dose and a shorter time of exposure was tested in order to reach immunoregulatory induction without impairing viability and plasticity or increasing immunogenicity. Concentration of cytokines was chosen from a previous report in other species [3] and the time of exposure was set according to a preliminary assay.

Both cell-cell contact and paracrine signalling mechanisms are implied in the immunoregulatory functions of MSCs [2]. The adhesion molecule VCAM-1 participates

in immunosuppression exerted by MSCs [15] and it was upregulated by CK5 priming, supporting the participation of direct cell-contact pathways in the eBM-MSc immunoregulatory mechanisms. Adhesion molecules are also related to MSC recruitment and migration and these processes are particularly complex in inflammatory environments, showing both enhancement [16] and impairment of this ability [17]. The chemokine receptor *CXCR4* participates in MSC migration in other species [18], but this is not evident in equine MSCs according to our findings and previous reports [10]. Paracrine signalling immunomodulation mechanism is mainly governed by molecules such as IDO, iNOS, IL-6 and COX-2, eliciting different mechanisms on immune cells [2], and TNF α and IFN γ are reported as inducers of these molecules by MSCs from different species and sources [19,20]. CK5-priming of eBM-MSCs led to a significant increase in the expression of immunomodulatory related genes, similarly to previous reports in equine species using higher cytokine concentrations [10]. IL-10 and TGF- β 1 could also participate in MSC immune mechanisms [2,21], but other reports have shown that inflammatory exposure could elicit different effects on these molecules, ranging from increases in their production [22], no change of their expression/secretion [23] or even a significant reduction [24]. CK5-priming did not alter *TGF- β 1* but downregulated *IL-10* expression, similarly to previous findings in eBM-MSCs stimulated with higher cytokine doses [10]. Since immunoregulatory mechanisms can vary between different species and MSC sources [20], a variety of factors could participate in the MSC immunosuppression mechanisms. Our findings suggest that *IL-10* and *TGF- β 1* may not have a major role in eBM-MSCs immunoregulation, whereas *IDO*, *iNOS*, *IL-6* or *COX-2* would be mainly involved. Changes induced in eBM-MSc immunoregulatory related-gene expression by CK5-priming confirmed that a lower dose and a shorter time of exposure to pro-inflammatory cytokines can induce a similar enhancement in the eBM-MSc immunomodulatory profile to that described using higher cytokine concentrations and longer exposure [10].

Inflammatory environments could also produce a rise in MSC immunogenicity, with adverse safety and efficacy implications for their allogeneic use. Allogeneic MSC therapy is especially interesting when cell therapy is needed immediately or there are

handicaps for autologous MSC use, such as aged and/or diseased patients [25,26]. Therefore, preservation of low immunogenicity after inflammatory stimulation is important to allow safe MSC allogeneic transplantation. Inflammatory stimuli, particularly IFN γ , might induce MHC expression [5,27]. CK5-priming induced a significant increase of *MHC-II* expression in eBM-MSCs, as it was observed with higher doses and longer exposure [10]. Even so, IFN γ -induced MHC upregulation may not lead to an increase in immunogenicity because of the lack of co-stimulatory molecules CD40, CD40L, CD80 and CD86 MSC expression, needed for antigenic recognition [28,29]. Nevertheless, inflammatory conditions might upregulate CD40 expression in human MSCs without affecting the expression of CD80, CD86 and CD40L [27,30]. In a similar manner, *CD40* significant upregulation was detected after CK5-priming. However, absence of changes on co-stimulatory molecules *CD80*, *CD86* and *CD40L* expression, combined with the up-regulation of immunoregulatory molecules, suggests that eBM-MSC might conserve their immune-evasive status after inflammatory priming [31].

Immunoregulatory functions of MSCs might be improved by pro-inflammatory cytokine priming, but how long are these changes maintained for after the stimulation remains unknown. Our results showed that the overexpression of *VCAM-I*, *IL-6*, *iNOS* and *COX-2* achieved by CK5 priming were not maintained after 7 days. In the same way, *MHC-II* upregulation did not remain after 7 days. These facts suggest that changes induced by cytokine priming might be short-term events which may not remain for long after the *in vivo* implantation.

Furthermore, TNF α and IFN γ may synergistically induce apoptosis in murine MSCs [8]. However, there are conflicting reports showing that these cytokines can also promote human and murine MSCs proliferation [24,32]. CK5-priming did not alter the regular growth of eBM-MSCs and relevant changes in the expression of genes involved in apoptosis [33] or in chromatin integrity [34] were not induced. These findings suggest that CK5-priming is well tolerated and does not hamper eBM-MSC viability.

Impairment of MSC differentiation ability by inflammatory environment has been well documented [6]. TNF α inhibits RUNX2 expression in human and rat [7,35]

and IFN γ might prevent MSC osteogenesis *in vivo* in allogeneic implants in mice [36]. High level of TNF α leads to a reduction in *PPAR γ* expression by rat MSCs undergoing adipogenesis [37] and might also impair the chondrogenesis of murine and rat MSCs [6]. Possible mechanisms participating in the differentiation inhibition by inflammatory environment have been described in human MSCs [38], but on the other hand, TNF α might have osteogenic promotive effects. Indeed, TNF α enhanced human MSC osteogenic differentiation as measured by increases in the ALP activity and matrix mineralization [7], increasing Osteocalcin [39], RUNX2, Osterix and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) expression [32]. In eBM-MSCs, adverse effects of TNF α and IFN γ exposure on tri-lineage differentiation have been reported when using higher cytokine doses and exposure time [11]. Nevertheless, eBM-MSCs were able to differentiate into the three lineages after CK5-priming. Previous studies describing differentiation impairment generally used cytokine concentrations similar to those used in this study, but these were added to culture medium along the differentiation induction [6,7,35], whereas we pretreated cells and induced differentiation without adding these cytokines. Other studies using cytokine pretreatment and subsequent regular differentiation induction also reported negative effects, but these studies used higher amounts of cytokines for priming MSCs [11,40]. In summary, the effect of proinflammatory cytokines on MSC differentiation is considered detrimental, but under certain conditions they can promote an enhanced effect. Our results suggest that a short cytokine exposure with low doses is well tolerated by eBM-MSCs, without abolishing their differentiation mechanisms or allowing its recovery after CK5-priming.

In conclusion, priming eBM-MSCs with 5 ng/ml of TNF α and IFN γ for 12 hours showed an upregulation of immunoregulatory related genes without a significant increase of most of the immunogenic ones and without eBM-MSCs viability and plasticity impairment. Since the inflammatory environment in a natural occurring disease, like in equine joint injury, could be heterogeneous and may not consistently induce changes in the immunoregulatory MSC profile [10], eBM-MSCs CK5-priming enables this induction. The stimulation with TNF α and IFN γ of MSC populations with initially different immunosuppressive capacity increases regulatory ability to a similar level, leading to homogenous MSC immunosuppressive capacity between different cell

populations [41]. Consequently, prior *ex vivo* priming of eBM-MSCs could improve the effectiveness of cellular therapy. In addition, immunogenicity, viability and plasticity of eBM-MSCs after cytokine priming must be considered. Viability and differentiation abilities of eBM-MSCs were preserved after CK5-priming. Furthermore, the possible effect of up-regulated *MHC-II* might be attenuated by the lack of co-stimulatory molecules and by the enhancement in the immunomodulatory expression profile by eBM-MSCs. This work contributes to clarify the effects of inflammatory exposure on eBM-MSC and constitutes a previous step to enhance their therapeutic use. Further studies will be needed to clarify the effect of cytokine priming on the safety and efficacy of eBM-MSCs.

Manufacturers details

¹ Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

² R&D Systems, Minneapolis, USA

³ GE Healthcare, Little Chalfont, UK

⁴ Ambion, Foster City, California, USA

⁵ Life technologies, Carlsbad, California, USA

⁶ Applied Biosystems, Foster City, California, USA

⁷ Halotech DNA, S.L., Madrid, Spain

⁸ Proyser, Madrid, Spain

⁹ Biotium, Hayward, California, USA

¹⁰ Gibco Invitrogen Corporation, California, USA

¹¹ Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

¹² SPSS Inc., Illinois, USA

References

1. Lopez MJ and J Jarazo. (2015). State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet J* 47:145-54.
2. Ma S, N Xie, W Li, B Yuan, Y Shi and Y Wang. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 21:216-25.
3. Zimmermann JA and TC McDevitt. (2014). Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy* 16:331-45.
4. Cuerquis J, R Romieu-Mourez, M Francois, JP Routy, YK Young, J Zhao and N Eliopoulos. (2014). Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy* 16:191-202.
5. Chan WK, AS Lau, JC Li, HK Law, YL Lau and GC Chan. (2008). MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Experimental Hematology* 36:1545-55.
6. Lacey DC, PJ Simmons, SE Graves and JA Hamilton. (2009). Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 17:735-42.
7. Ding J, O Ghali, P Lencel, O Broux, C Chauveau, JC Devedjian, P Hardouin and D Magne. (2009). TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci* 84:499-504.
8. Liu Y, L Wang, T Kikuri, K Akiyama, C Chen, X Xu, R Yang, W Chen, S Wang and S Shi. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med* 17:1594-601.
9. Wang L, Y Zhao, Y Liu, K Akiyama, C Chen, C Qu, Y Jin and S Shi. (2013). IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells* 31:1383-95.
10. Barrachina L, AR Remacha, A Romero, FJ Vazquez, J Albareda, M Prades, B Ranera, P Zaragoza, I Martin-Burriel and C Rodellar. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet Immunol Immunopathol* 171:57-65.
11. Barrachina L, AR Remacha, A Romero, FJ Vazquez, J Albareda, M Prades, B Ranera, P Zaragoza, I Martin-Burriel and C Rodellar. (2016). Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments. *J Vet Sci*.
12. Ranera B, J Lyahyai, A Romero, FJ Vazquez, AR Remacha, ML Bernal, P Zaragoza, C Rodellar and I Martin-Burriel. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol and Immunopathol* 144:147-54.
13. Ranera B, L Ordovas, J Lyahyai, ML Bernal, F Fernandes, AR Remacha, A Romero, FJ Vazquez, R Osta, C Cons, L Varona, P Zaragoza, I Martin-Burriel and C Rodellar. (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J* 44:33-42.
14. Barcena P, C Lopez-Fernandez, C Garcia-Ochoa, A Obradors, V Vernaev, J Gosálvez and R Vassena. (2015). Detection of DNA damage in cumulus cells using a chromatin dispersion assay. *Syst Biol Reprod Med* 61:277-85.

15. Ren G, X Zhao, L Zhang, J Zhang, A L'Huillier, W Ling, AI Roberts, AD Le, S Shi, C Shao and Y Shi. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184:2321-8.
16. Shi M, J Li, L Liao, B Chen, B Li, L Chen, H Jia and RC Zhao. (2007). Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica* 92:897-904.
17. Waterman RS, SL Tomchuck, SL Henkle and AM Betancourt. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5:e10088.
18. Honczarenko M, Y Le, M Swierkowski, I Ghiran, AM Glodek and LE Silberstein. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24:1030-41.
19. Meisel R, A Zibert, M Laryea, U Gobel, W Daubener and D Dilloo. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619-21.
20. Carrade DD and DL Borjesson. (2013). Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 63:207-17.
21. Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-22.
22. Liu H, DM Kemeny, BC Heng, HW Ouyang, AJ Melendez and T Cao. (2006). The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *J Immunol* 176:2864-71.
23. Carrade DD, MW Lame, MS Kent, KC Clark, NJ Walker and DL Borjesson. (2012). Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Medicine* 4:1-11.
24. Mohammadpour H, AA Pourfathollah, M Nikougoftar Zarif and SM Hashemi. (2016). Increasing proliferation of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by TNF-alpha plus IFN-gamma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38:68-76.
25. Chen FH and RS Tuan. (2008). Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 10:223.
26. Lin TH, E Gibon, F Loi, J Pajarinen, LA Cordova, A Nabeshima, L Lu, Z Yao and SB Goodman. (2016). Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF-kappaB activity. *J Orthop Res*.
27. Najar M, G Raicevic, H Fayyad-Kazan, C De Bruyn, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2012). Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 8:1188-98.
28. Tse WT, JD Pendleton, WM Beyer, MC Egalka and EC Guinan. (2003). Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75:389-97.
29. Wang H, X Qiu, P Ni, X Qiu, X Lin, W Wu, L Xie, L Lin, J Min, X Lai, Y Chen, G Ho and L Ma. (2014). Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. *Int J Mol Med* 33:263-70.
30. Raicevic G, M Najar, M Najimi, A El Taghdouini, LA van Grunsven, E Sokal and M Toungouz. (2015). Influence of inflammation on the immunological profile of adult-derived human liver mesenchymal stromal cells and stellate cells. *Cytotherapy* 17:174-85.

31. Ankrum JA, JF Ong and JM Karp. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32:252-60.
32. Yang Y and M Dai. (2015). Expression of PADI4 in patients with ankylosing spondylitis and its role in mediating the effects of TNF-alpha on the proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 36:565-70.
33. Hotchkiss RS, A Strasser, JE McDunn and PE Swanson. (2009). Cell death. *N Engl J Med* 361:1570-83.
34. Wang JY. (2001). DNA damage and apoptosis. *Cell Death Differ* 8:1047-8.
35. Gilbert L, X He, P Farmer, J Rubin, H Drissi, AJ van Wijnen, JB Lian, GS Stein and MS Nanes. (2002). Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 277:2695-701.
36. Dighe AS, S Yang, V Madhu, G Balian and Q Cui. (2013). Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res* 31:227-34.
37. Cortez M, LS Carmo, MM Rogero, P Borelli and RA Fock. (2013). A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation* 36:379-86.
38. Wang N, Z Zhou, T Wu, W Liu, P Yin, C Pan and X Yu. (2016). TNF-alpha-induced NF-kappaB activation upregulates microRNA-150-3p and inhibits osteogenesis of mesenchymal stem cells by targeting beta-catenin. *Open Biol* 6.
39. Marupanthorn K, C Tantrawatpan, D Tantikanlayaporn, P Kheolamai and S Manochantr. (2015). The Effects of TNF-alpha on Osteogenic Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Med Assoc Thai* 98 Suppl 3:S34-40.
40. Liu LN, G Wang, K Hendricks, K Lee, E Bohnlein, U Junker and JD Mosca. (2013). Comparison of drug and cell-based delivery: engineered adult mesenchymal stem cells expressing soluble tumor necrosis factor receptor II prevent arthritis in mouse and rat animal models. *Stem Cells Transl Med* 2:362-75.
41. Szabo E, R Fajka-Boja, E Kriston-Pal, A Hornung, I Makra, G Kudlik, F Uher, RL Katona, E Monostori and A Czibula. (2015). Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells Dev* 24:2171-80.

Supplementary material 1

Preliminary experiments were conducted in order to select the optimal time of exposure to cytokines. Equine BM-MSCs used were the same as in the main experiment (n=4). Equine BM-MSCs were exposed to 5ng/ml of TNF α and IFN γ during 6h, 12h, 24h and 48h. 50ng/ml of TNF α and IFN γ during 72 hours [1; 2] and basal medium were used as positive and negative controls, respectively.

Equine BM-MSCs were seeded at 5000 cells/cm² and expanded in basal medium at 37°C and 5%CO₂ allowing re-adjustments of conditions prior to initiating the assay. Then, eBM-MSCs were exposed in triplicate to CK5-medium for 6h, 12h, 24h and 48h (different plates for each time-point) or to CK50-medium (72h). Subsequently, eBM-MSCs were detached with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and used for the different assays. After the exposure, gene expression of most relevant molecules implied in MSC immunoregulation (*IDO*, *iNOS*, *IL-6*, *COX-2*), immunogenicity (*MHC-I*, *MHC-II* and *CD40*) and apoptosis (*BAX*) was analyzed by RT-qPCR. Isolation of mRNA and cDNA retrotranscription from eBM-MSCs samples were performed with the kit Cells-to-cDNA II (Ambion) according to manufacturer indications. Cells were re-seeded at 5000 cells/cm² after exposure to control-, CK5- or CK50-media and were allowed to expand in basal medium along 7 days. Subsequently, eBM-MSCs were detached with trypsin and counted in a Neubauer chamber diluted 1:1 with the vital staining Trypan Blue. Cell doubling time for each condition was calculated to assess the cell viability after different times of CK5 priming, regarding negative and positive (CK50) controls. Methodologies for eBM-MSCs isolation, culture, characterization, freezing, thawing, gene expression analysis and doubling time calculation are the same as described in the Material and Methods section of the manuscript.

Expression of *IDO* and *IL-6* was the highest at 12 hours. *COX-2* and *iNOS* were also upregulated at this time (Figure A, see below). *MHC-I* increased in a time-dependent fashion, whereas *MHC-II* was moderately upregulated up to 48h, with remarkable increase at 72h. *CD40* was overexpressed at all time points but the upregulation was lower at 12 hours (Figure B, see below). *BAX* was downregulated at 12h (Figure C, see below). Cell doubling times were similar between control and CK treated cells, with moderate decrease at 12h of exposure (Figure D, see below).

Twelve hours of cytokine priming resulted in the most suitable balance between changes induced in immunoregulatory and immunogenicity related-gene expression and viability preservation, so it was set as time of exposure.

References

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties.** *Veterinary immunology and immunopathology*. 171, pp. 57-65. 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.007

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments.** *Journal of veterinary science*. 18 (1), pp.39-49. 2017 DOI:10.4142/jvs.2017.18.1.1

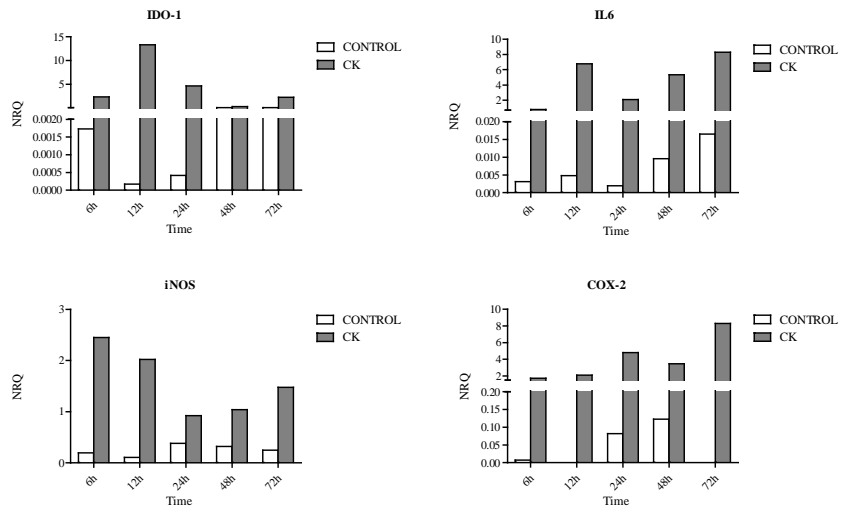


Figure A

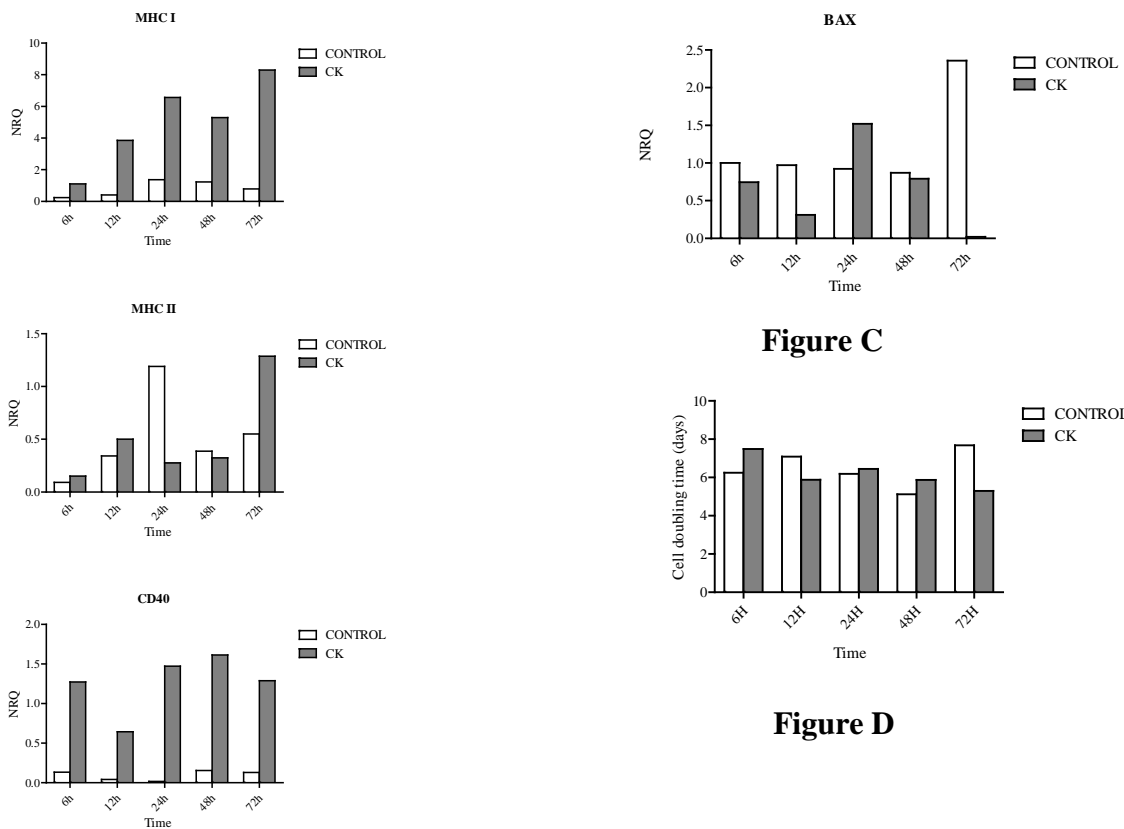
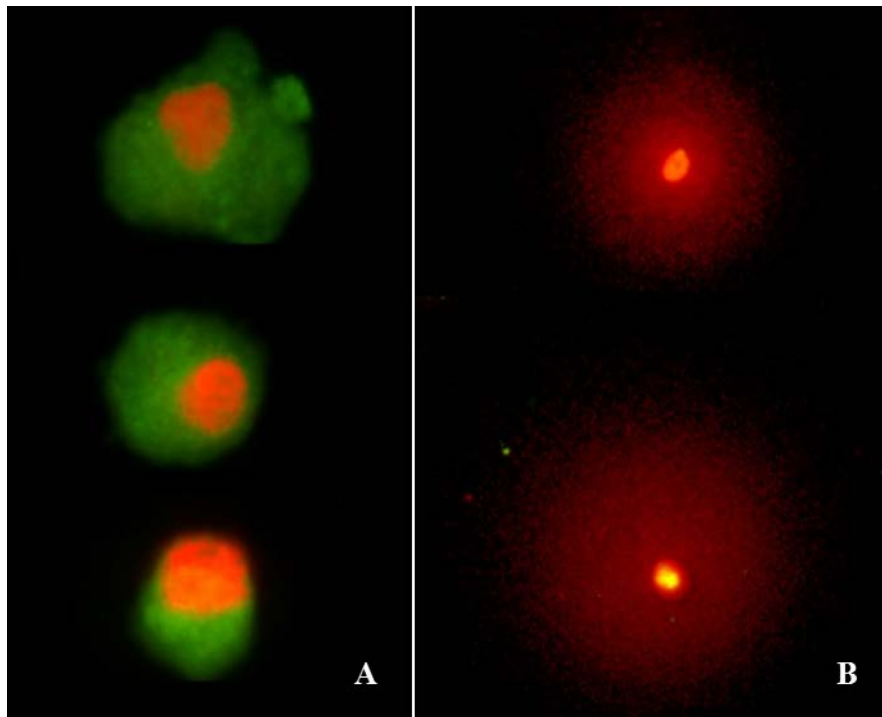


Figure B

Figure C

Figure D

Supplementary material 2



Examples of the chromatin integrity assessment using double dyeing for remarking nuclei (red fluorescence) and cytoplasm (green fluorescence). A) Normal (non-fragmented) equine BM-MSCs showing compact and well-defined nuclei (red). Chromatin is un-fragmented and well compacted. B) DNA damaged equine BM-MSCs showing a dispersion halo consisting of small fragments of chromatin and reduced nuclei.



Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis.

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Soler, Lourdes; García, Natalia; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Vitoria, Arantza; Álava, María Ángeles; Lampreave, Fermín; Rodellar, Clementina.

Veterinary immunology and immunopathology. 182, pp. 74-78. 2016. ISSN 0165-2427 DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.10.005

Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis

Laura Barrachina, Ana Rosa Remacha, Lourdes Soler, Natalia García, Antonio Romero, Francisco José Vázquez, Arantza Vitoria, María Ángeles Álava, Fermín Lamprave, Clementina Rodellar

Abstract

Acute phase proteins are useful inflammatory markers in horses. Haptoglobin (Hp) serum level is increased in horses undergoing different inflammatory processes, including arthritis. However, Hp concentration has not been assessed in inflammatory synovial fluid (SF). The aim of the present study was to investigate the Hp response in serum and SF in horses undergoing experimentally induced arthritis. For this purpose, serum and SF samples were collected from 12 animals before amphotericin B-induced arthritis was created (T0, healthy) and 15 days after the lesion induction (T1, joint inflammation) and Hp was determined by single radial immunodiffusion. The Hp increase between T0 and T1 was significant in both serum and SF, and serum Hp concentration at T0 was significantly higher than in SF, but significant differences were not found at T1, indicating a higher Hp increase in SF. A significant positive correlation for Hp concentration between serum and SF samples was found. These results highlight the potential usefulness of Hp as inflammatory marker in horses, showing for the first time the increase of Hp in SF from joint inflammation in the horse.

Introduction

The clinical signs of inflammation are not always obvious, so several hematological and biochemical parameters are needed to reveal and monitor an inflammatory status. Different inflammatory markers can be used with different sensitivities depending on the site and the stage of inflammation (Ray, 1996). Acute phase proteins (APPs) are potential indicators of the presence, degree and evolution of inflammation. Therefore, some of them are considered as potential useful diagnostic, prognostic and monitoring tools in horses presenting different diseases (Pihl et al., 2013; Canisso et al., 2014; Cray and Belgrave, 2014; Pihl et al., 2015; Westerman et al., 2015).

Serum amyloid A (SAA) is considered as a major APP in horses and it quickly increases to very high values when inflammatory signal starts (Jacobsen and Andersen, 2007). Haptoglobin (Hp) is considered as a minor/moderate APP in the horse, with slower rise, but which remains elevated for longer (Taira et al., 1992). In heaves-affected horses, Hp is a marker of both acute and chronic systemic inflammation (Lavoie-Lamoureux et al., 2012) and a significantly higher level of Hp expression was observed in samples acquired from clinically abnormal horses whose clinical signs lasted for 7 days or longer than from those who presented clinical signs during shorter times (Cray and Belgrave, 2014). This makes Hp a potential tool for monitoring long-term inflammation.

Haptoglobin level in serum has been determined in normal horses and in horses undergoing different pathologies or stressful conditions (Taira et al., 1992; Lavoie-Lamoureux et al., 2012; Cray and Belgrave, 2014; Dondi et al., 2015; Leclere et al., 2015).

The APPs can also be measured in several body fluids to approach to local inflammatory status (Okino et al., 2006; Akerstedt et al., 2009) and some APPs, mainly SAA, have been studied in equine synovial fluid (SF) from healthy and pathologic joints (Jacobsen et al., 2006a; Jacobsen et al., 2006b). Haptoglobin has been measured in peritoneal fluid from healthy horses and from horses with abdominal pain (Pihl et al., 2013) and in serum from horses undergoing amphotericin B-induced arthritis (Hulten

et al., 2002), but to our knowledge it has not been studied in inflammatory SF. Since Hp is raising interest because of their potential clinical utility, enlarging the knowledge about its level in SF in normal and inflamed joints seems mandatory. Therefore, the aim of this study was to assess the response of the Hp level in serum and SF during an induced arthritis in horses.

Material and Methods

Animals

The arthritis model was not exclusively induced for developing the present study, but biological samples were granted from animals enrolled in a lameness experimental procedure. Serum and SF samples were obtained from 12 Shetland ponies geldings (weight 100-150 kg, aged 3-5 years). All animals were determined to be in good health based on clinical and hematologic examination at the beginning of the experiment. Absence of musculoskeletal abnormalities in the radio-carpal joints was determined by clinical and radiological examination and SF analysis of total protein (TP) and total white cells count (WCC). All procedures were carried out under Project License (PI 31/11) approved by the in-house Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed in accordance with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

In order to prior establish the reactivity of the Hp antisera for validating the assay, samples of equine serum and SF were used. These samples were obtained for diagnostic purposes from five equine patients (H1-H5) of the Veterinary Hospital of the University of Zaragoza undergoing different acute processes (such as surgical or medical colic, or natural-occurring joint disease) and they were granted to this project with the owner consent.

Study design

Arthritis was induced in one radio-carpal joint of each animal. Serum and SF were collected before (T0, pre-lesion) and at 15 days after the arthritis induction (T1).

Determination of WCC and TP was carried out in every SF sample at both times. Concentration of Hp was measured in serum and SF samples from both times to determine their range values in healthy joint status (T0) and in active joint inflammation (T1).

Since Hulten et al. (2002) described the Hp response in serum in horses undergoing the same arthritis model up to 15 days, we set this time for the determination of the Hp response in both serum and SF. As commented above, biological samples were granted from other experimental procedure, so the times analyzed in our study were the same than those used for sampling in that study. Arthrocentesis or blood collection was not performed between T0 and T1.

Induction of arthritis

One carpus from each animal was randomly assigned and the area was clipped and aseptically prepared. The animals were sedated with 0.04 mg/kg IV of romifidine (Sedivet, Boehringer Ingelheim) and 0.02 mg/kg IV of butorphanol (Torbugesic, Zoetis). Twenty five mg of amphotericin-B (Sigma-Aldrich) were diluted in 3 mL of sterile water (Gibco) and IA injected (Hulten et al., 2002; Mokbel et al., 2011). Animals did not receive any anti-inflammatory drug which could interfere with the development of the joint inflammation.

Clinical assessment

Clinical assessment was carried out throughout 15 days post-arthritis induction. Evidence of joint distention and joint heat was assessed visually and by palpation and static and dynamical lameness examinations were performed. General health status, heart rate (HR), respiratory rate (RR) and rectal temperature were daily recorded.

Analgesia was provided by butorphanol at 0.1 mg/kg IV (Peloso et al., 1993) since inflammatory signs started and every 8 hours during 3 days after lesion induction. If animals presented HR >60, RR >48 or >38.8°C within the analgesia administration interval, additional dose of butorphanol was provided. If insufficient, perineural block of the median, radial and ulnar nerves would be performed with bupivacaine 0.5% (Braun).

Collection of serum and synovial fluid

Five mL of blood were collected from the jugular vein in tubes without additives (BD) prior to the arthritis induction (T0) and 15 days after the induction (T1). 0.5 – 1 mL of SF was collected through aseptic arthrocentesis of the radio-carpal joint before amphotericin-B administration (T0), and 15 days after the creation of the lesion (T1). SF samples were collected in EDTA tubes (BD).

Blood and SF samples were centrifuged at 3000 g for 15 min and serum and SF supernatant were obtained and stored at -80°C until they were used for Hp determination. An aliquot of each SF sample was used to determine the WCC and the TP values prior to cryopreserve the samples.

White cells count and total protein determination in SF samples

Total protein values were measured by refractometry (Korenek et al., 1992) using a RHB-32 Hand-held brix refractometer (Spectrum Technologies). White cells count (cells/μL) was carried out using the *Neubauer* chamber diluting SF 1/10 in 0.3% NaCl solution. Joints with SF values of TP <20 mg/mL and WCC <500 cells/μL at T0 were considered as healthy. Synovial fluid samples with WCC >1.500 cells/μL and TP >20 mg/mL were considered as inflammatory (Kevin Corley, 2008).

Determination of haptoglobin concentration in serum and synovial fluid

Haptoglobin was measured by single radial immunodiffusion (SRID) in 1% agarose gel containing rabbit polyclonal antisera against Hp. Antisera against Hp were raised by injection in rabbits of the purified protein as immunogen as previously described (Lampreave et al., 1994). Serum and SF samples were respectively diluted 1:40 and 1:10 prior to analysis and SRID was performed as previously described (Pineiro et al., 2007; Soler et al., 2016). Precipitin rings were measured using a Peak Scale Loupe 10X (Minimum Scale Division: 0,1 mm). Reactivity for equine species against the antisera was previously tested by Western Blott and immunodiffusion by using the samples granted from equine patients (Supplementary material 1). Commercial equine Hp (Mybiosources) was used as standard to construct a standard curve with serial dilutions. Standard covered the range from 0,011 to 0,141 mg/mL of

Hp. Intra-assay coefficients of variance (CV) were established lower than 6% and 4% at concentrations of 0,036 mg/mL Hp in sera and 0,038 mg/mL in SF (n=8). Inter-assays (n=5) lower than 4% were determined at 0,071 and 0,035 mg/mL Hp concentration of the samples. The limit of quantification (LoQ) was set at 0,011 mg/mL giving CV < 10% and bias <5%, by dilution of one sample of known Hp concentration. All measurements below the LoQ were assigned the value of the LoQ for statistical calculations, as it was done in a similar study (Pihl et al., 2013).

Statistical analysis

Data of Hp concentration in serum and SF were evaluated using standard descriptive statistics and reported as mean \pm standard error (SE) and range (minimum-maximum). Data showed a normal distribution as shown by the Shapiro-Wilk normality test. The Student's t test paired was used to analyze the differences in Hp level between T0 and T1, separately for serum (n=12) and SF (n=12). Differences between Hp concentration in serum and SF at each time (T0, T1) were analyzed by unpaired Student's t test. Correlation between Hp concentration in serum and SF was evaluated by calculating the Pearson correlation coefficient. Significance level was set at P<0.05 for all analyses.

Results and Discussion

Several previous reports have described the serum Hp concentration in health and in different disease conditions in horses (Taira et al., 1992; Pihl et al., 2013; Cray and Belgrave, 2014; Dondi et al., 2015; Westerman et al., 2015), but to our knowledge, this is the first time that the concentration of Hp is determined in SF from ponies undergoing experimentally-induced joint inflammation.

Clinical data are presented in Fig. 1. All horses developed severe lameness with marked joint effusion and joint heat within 6 hours following amphotericin-B injection, which progressively decreased after 24-48h. The HR, RR and rectal temperature peaked at 24 hours and were progressively reduced and normalized by 48-72h. By day 15 post-lesion induction (T1), systemic signs were absent and only local signs were present, characterized by moderate effusion, carpal heat and mild lameness. Clinical

data from our study was similar to previous reports using the same arthritis model (Suominen et al., 1999; Hulten et al., 2002).

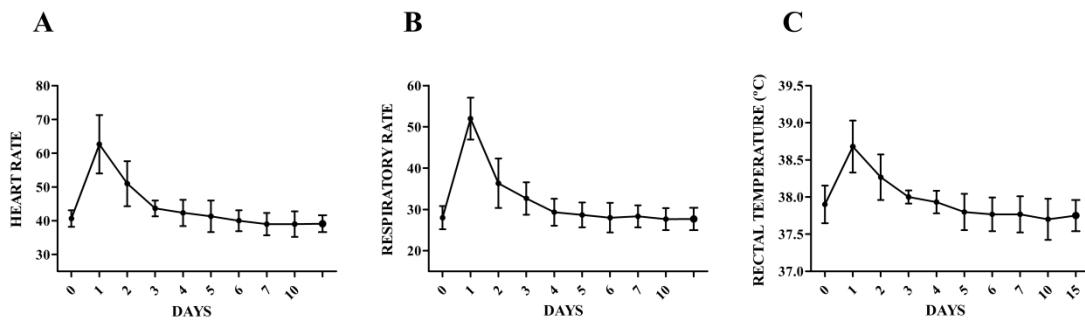


Fig.1.- Clinical parameters measured along 15 days post-arthritis induction. At each time-point, Mean \pm SD are provided for: A) Heart rate, B) Respiratory rate, C) Rectal temperature ($^{\circ}$ C).

Total protein and WCC values in SF samples are presented in Table 1. The TP and WCC values confirmed the healthy joint status before initiating the experiment (T0). At T1, high increase of TP value and moderate increase in WCC, together with the clinical findings, confirmed the joint inflammation. These results were similar to previous reports using the same amphotericin B-induced arthritis model (Peloso et al., 1993; Hulten et al., 2002; Schleining et al., 2008).

<i>Synovial Fluid</i>	WCC (cells/μL)	TP (mg/mL)
Healthy (T0, pre-lesion)	367 \pm 354	16.8 \pm 3.3
Inflammation (T1, 15 days post-lesion)	2138 \pm 1876	72.0 \pm 19.3

Table 1.- Mean \pm SE values of white cells count (WCC) and total protein (TP) in healthy (T0) and inflammatory (T1) synovial fluid (n=12).

The mean \pm SE and the range of Hp concentration in serum and SF samples from T0 and T1 are presented in Table 2. The range of Hp in serum from healthy ponies obtained in this study was similar to previous reported ranges, but slight variation exists probably due to different methodologies used and animal characteristics (Taira

et al., 1992). Taira et al. (1992) reported a range of 0.65-3.73 mg/mL, Pihl et al. (2013) provided a range of 0.49-4.43 mg/ml and Cray and Belgrave (2014) showed a range of 0.27–2.45 mg/mL, whereas other authors considered slightly lower ranges, such as 0.42–1.70 mg/mL (Hulten et al., 2002), 0.30–1.00 mg/mL (Dondi et al., 2015), or 0.28–0.50 mg/mL (Westerman et al., 2015).

<i>Haptoglobin</i>	<i>Serum (mg/mL)</i>	<i>SF (mg/mL)</i>	<i>Serum vs SF (p value)</i>
Healthy (T0, pre-lesion)	1.06 ± 0.23 (0.016 – 3.01)	0.17 ± 0.05 (0.016 – 0.48)	p = 0.0021 (**)
Inflammation (T1, 15 days post-lesion)	2.43 ± 0.94 (1.22 – 4.29)	1.89 ± 0.15 (0.83 – 2.53)	p = 0.111
T0 vs T1 (p value)	p < 0.0001 (***)	p < 0.0001 (***)	Serum T0-T1 increase vs SF T0-T1 increase p < 0.0001 (***)

Table 2.- Mean ± SE values and range (minimum – maximum) of haptoglobin concentration in healthy (T0) and inflammatory (T1) serum and synovial fluid (SF) (n=12). Significant differences between serum and SF values, between T0 and T1 values, and between serum and SF T0-T1 increases are presented in the table (** = p<0.01; *** = p<0.001).

The increase in Hp concentration between T0 and T1 was greatly significant in both serum and SF samples (P < 0.0001), but the Hp increase was significantly higher in SF than in serum (p<0.0001). A study using the same arthritis model reported an Hp serum increase within the 48–96 hours post-arthritis induction, with peak level at 96h, which returned to baseline by day 15 after lesion (Hulten et al., 2002). However, in our experimental conditions, the serum Hp level remained significantly higher from baseline by this time. The reason for the different duration of joint inflammation in the two studies could not be determined, but it might be due to the administration of an anti-inflammatory drug in the study of Hulten et al. (2002), or to intrinsic characteristics of the animals used (Taira et al., 1992). Our results indicate that amphotericin B-induced arthritis leads to an Hp rise in both serum and SF that can be maintained elevated up to 15 days, for longer than the previously reported (Hulten et al., 2002).

The Hp concentration was significantly higher in serum than in SF samples at T0 ($P=0.0021$), but significant differences were not found between serum and SF values at T1 ($P = 0.111$), indicating that Hp concentration in SF is closer to the serum Hp level during the inflammation. It has been suggested that APPs in SF are most probably of hepatic origin (Havenaar et al., 1997), so this finding could be due to blood contamination during arthrocentesis, since the synovium vascularity is augmented during inflammation, or to the increased permeability of equine synovial membrane during the inflammation (Hardy et al., 1998), which would allow the passage of Hp synthesized in the liver. On the other hand, this increase may be due to local synthesis of Hp by the inflamed articular tissues. Gene expression and protein production of SAA by synovial tissue and chondrocytes from humans with rheumatoid arthritis has been reported (Kumon et al., 1999; O'Hara et al., 2000; Vallon et al., 2001). In horses, SAA isoforms which are not present in serum have been found in SF, suggesting the local synthesis of this APP (Jacobsen et al., 2006a; Jacobsen et al., 2006b). Haptoglobin is also expressed by arthritic tissues in rat (Smeets et al., 2003) and in human SF from juvenile idiopathic arthritis (Rosenkranz et al., 2010), suggesting that Hp can be locally produced in inflamed joints. The results obtained in this study cannot confirm the origin of the SF Hp increase, but the authors hypothesize that it could be derived from both hepatic and intra-articular sources discussed above, might also involving unknown factors. More research is needed to clarify the origin of the SF Hp increase, but these findings support the potential of Hp as inflammatory marker in equine SF.

The determination of Pearson coefficient demonstrated a significant ($P=0.0043$) positive correlation ($r = 0.610$) between serum and SF Hp concentration (Fig. 2). The correlation between SF and serum concentration is established for SAA in horses (Jacobsen et al., 2006b), as we have also shown for Hp for the first time. However, further research is needed to clarify if systemic Hp could be used for monitoring joint inflammation: despite the significant and positive correlation found, the r value is moderate and, in addition, other systemic factors could go clinically unnoticed but be influencing the serum Hp value.

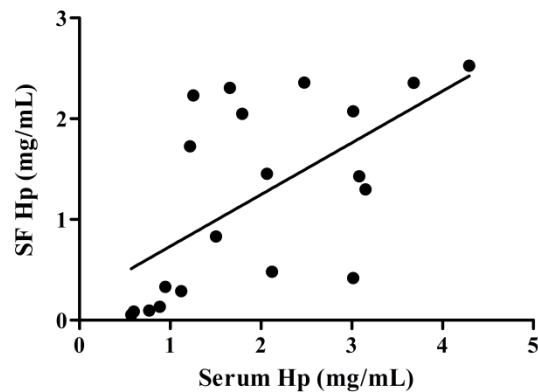


Fig. 2.- Correlation plot of the concentration of haptoglobin (Hp) in paired serum and synovial fluid (SF) samples from ponies (n=12) before and after undergoing experimental arthritis induction. The Pearson's correlation coefficient was 0.610 ($p = 0.0043$).

The present study shows the Hp increase in both serum and SF in an equine arthritis model. This work enlarges the existing data about Hp concentration in serum in healthy and pathologic conditions. In addition, provides new data about dynamics of Hp in SF and shows positive correlation between SF and serum Hp concentrations in a model of equine joint inflammation. All of this leads to the interest of Hp as inflammatory marker in equine serum and SF which is maintained for longer times than others APPs.

References

- Akerstedt, M., Waller, K.P., Sternesjo, A., 2009. Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk in relation to raw milk quality. *J Dairy Res* 76, 483-489.
- Canisso, I.F., Ball, B.A., Cray, C., Williams, N.M., Scoggin, K.E., Davolli, G.M., Squires, E.L., Troedsson, M.H., 2014. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *Am J Reprod Immunol* 72, 376-385.
- Cray, C., Belgrave, R.L., 2014. Haptoglobin quantitation in serum samples from clinically normal and clinically abnormal horses. *J Equine Vet Sci* 34, 337-340.
- Dondi, F., Lukacs, R.M., Gentilini, F., Rinnovati, R., Spadari, A., Romagnoli, N., 2015. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *Vet J* 205, 50-55.
- Hardy, J., Bertone, A.L., Muir, W.W., 3rd, 1998. Local hemodynamics, permeability, and oxygen metabolism during acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joints. *Am J Vet Res* 59, 1307-1316.

Havenaar, E.C., Dolhain, R.J., Turner, G.A., Goodarzi, M.T., van Ommen, E.C., Breedveld, F.C., van Dijk, W., 1997. Do synovial fluid acute phase proteins from patients with rheumatoid arthritis originate from serum? *Glycoconjugate J* 14, 457-465.

Hulten, C., Gronlund, U., Hirvonen, J., Tulamo, R.M., Suominen, M.M., Marhaug, G., Forsberg, M., 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet J* 34, 699-704.

Jacobsen, S., Andersen, P.H., 2007. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet Educ* 19, 38-46.

Jacobsen, S., Niewold, T.A., Halling-Thomsen, M., Nanni, S., Olsen, E., Lindegaard, C., Andersen, P.H., 2006a. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet immunol immunopathol* 110, 325-330.

Jacobsen, S., Thomsen, M.H., Nanni, S., 2006b. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am J Vet Res* 67, 1738-1742.

Kevin Corley, J., 2008 *The Equine Hospital Manual*. Blackwell publishing.

Korenek, N.L., Andrews, F.M., Maddux, J.M., Sanders, W.L., Faulk, D.L., 1992. Determination of total protein concentration and viscosity of synovial fluid from the tibiotarsal joints of horses. *Am J Vet Res* 53, 781-784.

Kumon, Y., Suehiro, T., Hashimoto, K., Nakatani, K., Sipe, J.D., 1999. Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells. *J Rheumatol* 26, 785-790.

Lampreave, F., Gonzalez-Ramon, N., Martinez-Ayensa, S., Hernandez, M.A., Lorenzo, H.K., Garcia-Gil, A., Pineiro, A., 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 15, 672-676.

Lavoie-Lamoureux, A., Leclere, M., Lemos, K., Wagner, B., Lavoie, J.P., 2012. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Int Med* 26, 1419-1426.

Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., 2015. Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. *J Vet Int Med* 29, 940-945.

Mokbel, A.N., El Tookhy, O.S., Shamaa, A.A., Rashed, L.A., Sabry, D., El Sayed, A.M., 2011. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskelet disor* 12, 259.

O'Hara, R., Murphy, E.P., Whitehead, A.S., FitzGerald, O., Bresnihan, B., 2000. Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res* 2, 142-144.

Okino, A.M., Burger, C., Cardoso, J.R., Lavado, E.L., Lotufo, P.A., Campa, A., 2006. The acute-phase proteins serum amyloid A and C reactive protein in transudates and exudates. *Mediat Inflamm* 2006, 47297.

Peloso, J.G., Stick, J.A., Caron, J.P., Peloso, P.M., Soutas-Little, R.W., 1993. Effects of hylan on amphotericin-induced carpal lameness in equids. *Am J Vet Res* 54, 1527-1534.

Pihl, T.H., Andersen, P.H., Kjelgaard-Hansen, M., Morck, N.B., Jacobsen, S., 2013. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. *Vet Clin Path* 42, 177-183.

Pihl, T.H., Scheepers, E., Sanz, M., Goddard, A., Page, P., Toft, N., Andersen, P.H., Jacobsen, S., 2015. Influence of disease process and duration on acute phase proteins in serum and peritoneal fluid of horses with colic. *J Vet Int Med* 29, 651-658.

Pineiro, M., Pineiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J* 173, 669-674.

Ray, C.S., Poole, A.R., McIlwraith, C.W. , 1996. Use of synovial fluid and serum markers in articular disease in C.W. McIlwraith, G.W. Trotter (Eds.) *Joint disease in the horse*. Saunders.

Rosenkranz, M.E., Wilson, D.C., Marinov, A.D., Decewicz, A., Grof-Tisza, P., Kirchner, D., Giles, B., Reynolds, P.R., Liebman, M.N., Kolli, V.S., Thompson, S.D., Hirsch, R., 2010. Synovial fluid proteins differentiate between the subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 62, 1813-1823.

Schleining, J.A., McClure, S.R., Evans, R.B., Hyde, W.G., Wulf, L.W., Kind, A.J., 2008. Liposome-based diclofenac for the treatment of inflammation in an acute synovitis model in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 31, 554-561.

Smeets, M.B., Fontijn, J., Kavelaars, A., Pasterkamp, G., De Kleijn, D.P., 2003. The acute phase protein haptoglobin is locally expressed in arthritic and oncological tissues. *Int J Exp Pathol* 84, 69-74.

Soler, L., García, N., Unzueta, A., Piñeiro, M., Álava, M.A., Lampreave, F., 2016. Purification and determination of C-reactive protein and inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 in dogs after major surgery through generation of specific antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 179, 26-31.

Suominen, M.M., Tulamo, R.M., Puupponen, L.M., Sankari, S.M., 1999. Effects of intra-articular injections of buprenorphine suspension on amphotericin B-induced aseptic arthritis in horses. *Am J Vet Res* 60, 1467-1473.

Taira, T., Fujinaga, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N., Mizuno, S., 1992. Equine haptoglobin: isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. *J Vet Med Sci* 54, 435-442.

Vallon, R., Freuler, F., Desta-Tsedu, N., Robeva, A., Dawson, J., Wenner, P., Engelhardt, P., Boes, L., Schnyder, J., Tschopp, C., Urfer, R., Baumann, G., 2001. Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 166, 2801-2807.

Westerman, T.L., Tornquist, S.J., Foster, C.M., Poulsen, K.P., 2015. Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *Am J Vet Res* 76, 882-888.

Proinflammatory priming of mesenchymal stem cells as strategy to improve their therapeutic potential: assessment of effectiveness and safety in an equine osteoarthritis model.

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vitoria, Arantza; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Roca, Mercedes; Zaragoza, Pilar; Vázquez, Francisco José; Rodellar, Clementina

(In preparation)

Proinflammatory priming of mesenchymal stem cells as strategy to improve their therapeutic potential: assessment of effectiveness and safety in an equine osteoarthritis model.

Laura Barrachina, Ana Rosa Remacha, Antonio Romero, Arantza Vitoria, Jorge Albareda, Marta Prades, Mercedes Roca, Pilar Zaragoza, Francisco José Vázquez, Clementina Rodellar

Abstract

Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells (MSCs) play a major role in the beneficial effects seen in osteoarthritis (OA) treatment. The enhancement of this ability through inflammatory priming could be a suitable therapeutic strategy, but the possible increase in their immunogenicity must be considered. The aim of this study was to assess the use of repeat administrations of allogeneic MSC-naïve and MSC primed with TNF α and IFN γ in an equine OA model. Lesion was induced in one radio-carpal joint of 18 horses and they were divided into three groups: MSC-naïve (n=7), MSC-primed (n=7) and control (n=4), receiving two injections of unstimulated MSCs (MSC-naïve), stimulated MSCs (MSC-primed) or vehicle substance (control). Four months later, contralateral joint of each animal was subjected to the same procedure. Clinical, synovial, radiological and ultrasonographic follow-up was carried out. At six months, animals were euthanized and both carpi (two and six months of progression) were assessed by magnetic resonance imaging, gross anatomy, and gene expression. Clinical and synovial assessments revealed quicker improvement of the treated groups, whereas imaging techniques did not provide differences between groups. Slight transient inflammatory reaction was observed after the second injection of MSC-primed. Gross anatomy showed better cartilage surface appearance in both treated groups, especially at two months. Gene expression revealed enhanced anti-inflammatory and regulatory effects of MSC-primed, mainly at two months. In conclusion, MSC therapeutic benefit has been observed mainly at short-term, without huge differences between MSC-naïve and MSC-primed but suggesting increased regulatory effects of the MSC-primed. Further research is needed to clarify these effects and immunogenicity implications, but MSC-priming appears to be a promising strategy.

Introduction

Due to the high incidence of osteoarthritis (OA) in both horses and humans and to the lack of effective treatments, it has been a raise in the interest of regenerative therapies such as mesenchymal stem cells (MSCs) for treating this pathology (Freitag et al., 2016). The use of MSCs in equine models of OA has provided encouraging results, but some key questions remain unanswered and further investigation is needed (reviewed in Colbath et al., 2016). The therapeutic benefit of MSCs in joint pathologies is considered to be mainly elicited by paracrine mechanisms through their trophic effects and immune regulatory properties, since their engraftment in cartilage appears to be low (Murphy et al., 2003; Barry and Murphy, 2013). It has been shown in MSCs from different species, including the horse, that the induction of their immune regulatory profile requires inflammatory priming (Cuerquis et al., 2014; Barrachina et al., 2017). The joint inflammatory environment could be highly variable between patients even within the same pathology group (Leijs et al., 2012), so inflammatory priming prior to the administration could be a suitable approach to enhance the therapeutic benefit of MSCs (Cuerquis et al., 2014). Recently, the use of IFN γ -stimulated equine MSCs in a mouse model of arthritis showed enhanced effects compared to the unstimulated MSCs, suggesting the potential therapeutic value of this strategy (Maumus et al., 2016).

However, MSC inflammatory priming can also lead to a raise in MHC expression and to a decrease in viability and differentiation potential (Chan et al., 2008; Lacey et al., 2009; Wang et al., 2013). Priming equine bone marrow derived MSCs (BM-MSCs) with 5ng/ml of TNF α and IFN γ during 12h induced their immunomodulatory profile without affecting viability and differentiation potential, but led to MHC-II expression (Barrachina et al., 2017). Immunogenicity of MSCs is a concern for their allogeneic application (Consentius et al., 2015), but the potential advantages lead to the interest on this strategy (Chen and Tuan, 2008). The intraarticular (IA) administration of allogeneic MSCs into equine healthy joints appears to be safe (Carrade et al., 2011; Pigott et al., 2013a, Pigott et al., 2013b; Ardanaz et al., 2016) and several studies also showed their safety in equine naturally-diseased joints (Broeckx et al., 2014a; Broeckx et al., 2014b). Repeat IA administrations of allogeneic MSCs provided enhanced

therapeutic benefit in a porcine model (Hatsushika et al., 2014) and the use of repeat doses of allogeneic MSCs pooled from several donors is clinically safe in the equine healthy joint (Ardanaz et al., 2016). However, repeat IA administration of allogeneic MSCs in pathologic joints in the horse has not been reported.

Therefore, the aim of this study was to assess the use of repeat injections of allogeneic donor-pooled BM-MSCs, naïves or primed with TNF α and IFN γ , in an equine model of OA in order to evaluate the safety and effectiveness of this strategy for improving joint cellular therapies.

Material and Methods

Study design

BM-MSCs were obtained from animals in the control group (n=4) prior to initiating the study. Arthritis was induced (time 0) in one randomly assigned radio-carpal joint of each animal through IA injection of Amphotericin-B. Animals received two injections of corresponding substance: naïve allogeneic pooled BM-MSCs (MSC-naïve group, n=7), primed allogeneic pooled BM-MSCs (MSC-primed group, n=7) or Lactate's Ringer Solution (LRS) (control group, n=4). Injections were performed on weeks 2 and 5 after the lesion induction and serial clinical, synovial, ultrasonographic and radiologic assessments were carried out weekly until two months after lesion induction. Four months post-lesion, the contralateral radio-carpal joint of each animal was subjected to the same corresponding procedure. Six months since the beginning of the study (two months after the second lesion induction), animals were euthanized. Magnetic resonance imaging (MRI), gross anatomy and gene expression of cartilage and synovial membrane were assessed post-mortem (Figure 1). This study design aimed to carry out a paired evaluation of two different end-points (two and six months) without duplicating the number of animals, since the migration of IA injected MSCs from one joint to another appears to be unlikely (Becerra et al., 2013; Horie et al., 2009).

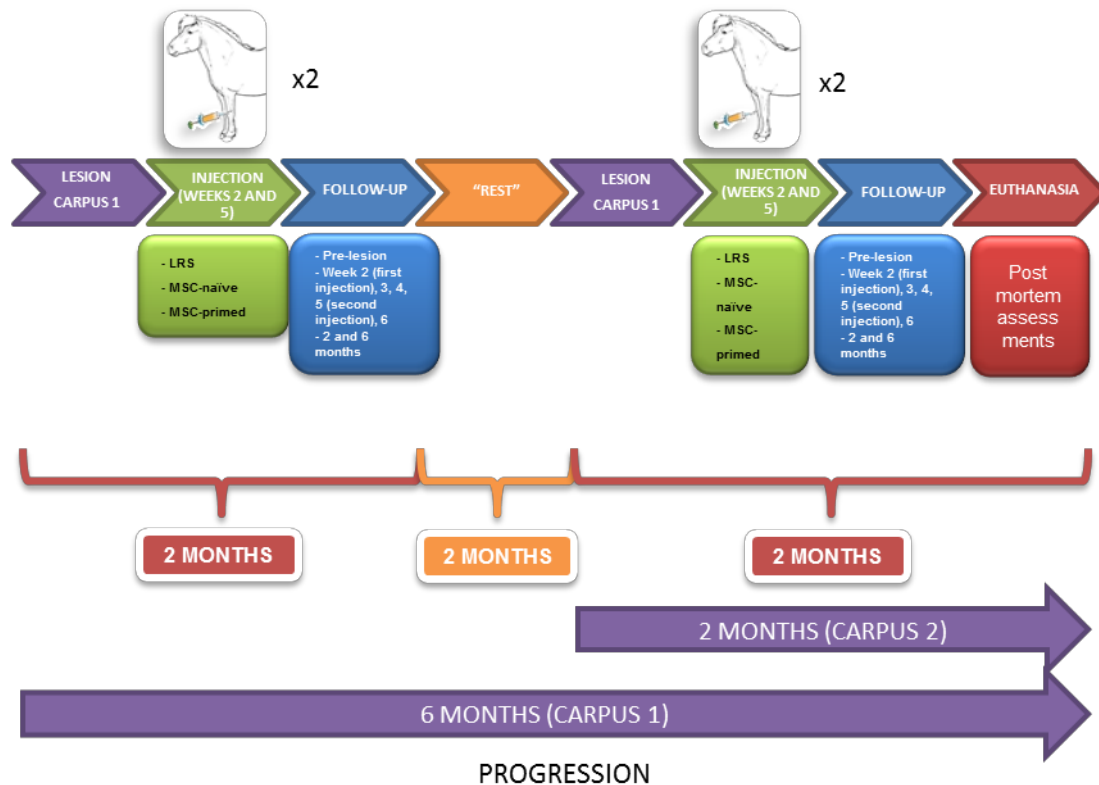


Figure 1: Schematic representation of the study design

Animals

Eighteen animals (Shetland ponies, geldings, 3-7 years, 100-165 kg) in good health status and free of joint pathology in their radio-carpal joints were included in this study and divided into 3 groups. Seven animals (n=7) received naïve allogeneic pooled BM-MSCs (MSC-naïve group) and other seven animals (n=7) received primed allogeneic pooled BM-MSCs (MSC-primed group). Animals in the control group (n=4) received the same injections of LRS and were used as donors of allogeneic BM-MSCs. All procedures were carried out under Project License (PI 31/11) approved by the in-house Ethic Committee for Animal Experiments from the University of Zaragoza. The care and use of animals were performed in accordance with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Equine BM-MSCs isolation, characterization and culture

Animals from control group (n=4) were sedated with 0.04 mg/kg IV romifidine (Sedivet, Boehringer-Ingelheim) and 0.02 mg/kg IV butorphanol (Torbugesic, Pfizer)

and 20-30 mL of bone marrow (BM) were collected from sternum in heparinized syringes by using a Jamshidi needle. Procedures for MSC isolation, culture, characterization and freezing were performed as previously described (Ranera et al., 2011). Briefly, BM was layered over Lymphoprep (Atom) and centrifuged for harvesting nucleated cells. Cells were cultured in basal medium, consisting of low glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine and 1% streptomycin/penicillin (all from Sigma-Aldrich) at 37°C, 5% CO₂ and passaged when confluent by treating with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich). Cells were characterized at passage 3 by flow cytometry and RT-qPCR analyses of the markers CD90, CD105, CD44, CD73, CD34, CD45, MHC-I and MHC-II and by their tri-lineage differentiation potential. Subsequently, cells were frozen in 90%FBS-10%DMSO (Sigma-Aldrich) medium and stored at -80°C until their use.

Lesion induction

Animals were sedated as described above and carpi were aseptically prepared. Twenty-five mg of Amphotericin-B diluted in 3 mL of sterile water (Gibco) were IA injected through aseptic arthrocentesis in one radio-carpal joint of each animal, as previously described (Hulten et al., 2002; Barrachina et al., 2016b). The same procedure was repeated four months later in the contralateral radio-carpal joints. Animals did not receive any anti-inflammatory drug that could have interfered with the development of the arthritis. Analgesia was provided as previously described (Barrachina et al., 2016b). Briefly, 0.1 mg/kg IV butorphanol were administered since inflammatory signs started and every 8 hours during 3 days after lesion induction. If animals presented HR>60, RR>48 or rectal temperature>38.8°C within the 8h interval, additional dose of butorphanol was provided. If insufficient, perineural block of the median, radial and ulnar nerves would be performed with bupivacaine 0.5% (Braun). Animals were located in boxes during 15 days after lesion induction and subsequently placed in paddocks allowing free movement. Additionally, animals were maintained in boxes the 24h following each injection in order to carefully monitor any adverse reaction.

Preparation and administration of injections

BM-MSCs were thawed 7 days before each administration and cultured in the basal medium described above until the moment of the administration. BM-MSCs for the MSC-primed group were exposed to 5ng/mL of TNF α and 5ng/mL of IFN γ added to the basal culture medium during 12h (Barrachina et al., 2017) before the administration. BM-MSCs from the four donors were mixed in the same proportion and washed three times with PBS and three times with LRS. Subsequently, $10 \cdot 10^6$ (containing approximately $2.5 \cdot 10^6$ cells from each donor) of naïve or primed BM-MSCs were suspended in 2mL of LRS and IA administered to corresponding animals. Horses from control group received the same volume of LRS.

The effects of this priming protocol on immunomodulatory and immunogenic profiles, viability and differentiation of equine BM-MSCs were already described in a previous report of our group (Barrachina et al., 2017). The BM-MSCs used in that study were exactly the same (same donors, same passage and same culture conditions) than those used in the present *in vivo* study.

Clinical assessment

General health status, HR, RR and rectal temperature were recorded every 8h throughout 15 days post-lesion induction. Along the experiment, lameness examinations were performed according to the American Association of Equine Practitioners (Anonymous, 1991), including carpal flexion test, and a global lameness score was assigned to each forelimb. Joint inflammation was monitored by determining the carpal circumference and the local heat with a non-contact infrared laser thermometer (Thermolab). This complete clinical exam was performed before the creation of the lesion (time 0), weekly until the second injection (week 5), and 10 and 20 days later. The second lesion was subjected to the same procedure. Additionally, clinical exam was performed at 24h after every injection. Both forelimbs were simultaneously assessed at four months (time 0 of second lesion) and at six months (end of the study).

Synovial fluid assessment

0.5-1 mL of synovial fluid (SF) from each radio-carpal joint was collected in EDTA tubes before lesion induction (time 0), weekly until the second injection (week 5), and on days 10 and 20 after second injection. Both carpi of each animal underwent arthrocentesis at the end of the study. Total protein (TP) was determined by using a RHB-32 Hand-held brix refractometer (Spectrum Technologies), total white cells count (tWCC) was recorded by using a hemocytometer chamber and cytological examination was carried out in Diff-Quick stained smears to report the percentage of neutrophils, lymphocytes and macrophages.

Haptoglobin determination in serum and SF

Aliquots of SF were centrifuged at 3000g/15min and the supernatant was stored at -80°C until haptoglobin (Hp) was determined. In addition, 5 mL of blood from each animal were collected into tubes without additives at the same time-points as SF. Blood was centrifuged at 3000g/15 min and serum was stored at -80°C. Haptoglobin was determined in serum and SF supernatant following the methodology previously described (Barrachina et al., 2016b). Briefly, serum and SF samples were diluted and single radial immunodiffusion was carried out in 1% agarose gel containing rabbit polyclonal antisera against Hp. Precipitin rings were measured with a Peak Scale Loupe (10X) and Hp concentration was obtained by using a standard curve with serial dilutions of commercial equine Hp (Mybiosources).

Ultrasonography and radiology

Ultrasonography was performed at the same time-points as SF collection. Radiographies were taken on time 0 (pre-lesion), week 2 (pre-treatment) and at two months after lesion. In addition, four and six months were used in the first lesion. For ultrasound exam, an ultrasonographic machine Zonare Z One (Zonare, Inc.) with a 5-14 MHz linear transducer and an ultrasonographic pad were used. The transducer was transversally placed on the dorsal aspect of the carpus, slightly lateral, at the level of the radio-carpal joint. Images were taken for assessing soft tissues surrounding the joint, the thickness of the joint capsule, joint effusion, and articular surface of radiocarpal and intermediate carpal bones (Tnibar et al., 1993).

Dorso-palmar radiologic images were taken using an X-ray generator Orange 8016 HF (M&I Globaltech) and 24 x 30 cm plates FCR Fuji IP Cassette type CC (Fujifilm) and processed using a FCR Prima CR-IR 391RU computerized radiology system (Fujifilm). Factors were set at 60 kv and 5 mAs with a focal distance of 60 cm. Four expertise evaluators, blinded for the treatment received and the time-point, assessed together the images and assigned a score to each one by consensus agreement by using the subjective ordinal scale presented in Table 1 (adapted from Mokbel et al., 2011).

Score	Description
0	Normal
1	Slight joint space narrowing and/or Slight bone remodeling in articular margins (no osteolysis)
2	Mild joint space narrowing and Mild bone remodeling in articular margins (no osteolysis)
3	Moderate joint space narrowing and Mild bone remodeling in articular margins (no osteolysis)
4	Moderate joint space narrowing and/or Moderate bone remodeling in articular margins (with/without osteolysis)
5	Severe joint space narrowing and Moderate bone remodeling in articular margins (with/without osteolysis)
6	Severe joint space narrowing and Severe bone remodeling in articular margins (with osteolysis)

Table 1.- Scoring system used for radiologic images assessment, based on a subjective ordinal scale adapted from Mokbel et al., 2011.

Magnetic resonance imaging

At 6 months after the beginning of the study, horses were sedated as described above and subsequently euthanized with 200 mg/kg IV of sodium pentobarbital (Euthasol, Esteve). Forelimbs were cut at the proximal one-third of the radius and both carpi from four animals of each group were subjected to MRI analysis by using an AIRIS II-1 0.3T MRI unit (Hitachi) and a knee coil. T2* gradient echo (GE) and fat suppression (FS) sequences were used for coronal and sagittal planes images acquisition. Sequences details are presented in Table 2. Two expertise observers, blinded for the

treatment received and the end-point, assessed together all the complete sequences and assigned by consensus agreement a value from 0 (normal) to 4 (severely abnormal) to each carpus for the following parameters: osteophyte formation, synovial effusion, osseous edema and subchondral bone affectation (adapted from McIlwraith et al., 2011).

Sequence	Plane	TE (ms)	TR (ms)	FA (°)	Slice thickness (mm)	Slice Gap (mm)
T2* GE	Sagittal	13.0	420.0	30°	3.0	0.5
T2* FS Echo 1	Coronal	11.4	430.0	30°	3.5	1.0
T2* FS Echo 2	Coronal	22.8	430.0	30°	3.5	1.0

Table 2.- Magnetic resonance imaging (MRI) parameters. TE, echo time; TR, repetition time; FA, flip angle; FS, fat suppression; GE, gradient echo.

Gross anatomy

Immediately after MRI examination, all radiocarpal joints were subjected to gross anatomy assessment and samples of cartilage and synovial membrane were collected for gene expression analysis. Gross anatomy was assessed by consensus agreement between four expertise evaluators blinded for the treatment and the end-point by using a subjective ordinal scale adapted from the OARSI recommendations (McIlwraith et al., 2010) (Table 3).

Score	Description
0	Normal
1	Focal and superficial small size lesions, presenting one or several of the following findings: - Discoloration - Swelling/fibrillation - Very superficial erosion
2	Presence of only one of the following findings: - Extensive superficial lesions as described in score 1 (discoloration, swelling/fibrillation) - Focal partial-thickness erosion
3	Simultaneous presence of the findings described in score 2: - Extensive superficial lesions as described in score 1 (discoloration, swelling/fibrillation) - Focal partial-thickness erosion
4	Extensive partial-thickness erosion and/or full-thickness erosion

Table 3.- Gross anatomy scoring system based on a subjective ordinal scale adapted from the OARSI recommendations (McIlwraith et al., 2010).

Gene expression

Immediately after gross anatomy examination, samples for gene expression analysis were collected from all joints. A piece of synovial membrane together with fibrous capsule was collected from the dorsal aspect of each joint. Slices of full-thickness cartilage were collected from different areas, including the medial aspect of the radio carpal bone and the medial aspect of the distal radius and from other areas where maximal injury was detected. The sampling protocol was built according to the recommendations of the OARSI (Aigner et al., 2010). Samples were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . RNA was isolated from joint samples by using the Trizol (Qiagen)/Chloroform/Isopropanol protocol (Chou et al., 2013). The kit DNase Turbo (Ambion) was used to remove genomic DNA and cDNA synthesis was carried out using the SuperScript II System (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. The expression of genes related to extracellular matrix (ECM) production, destruction/remodeling and joint inflammation (Table 4) were analyzed by RT-qPCR. Reactions were performed in triplicate using the Fast SYBR Green Master Mix and the StepOne Real Time PCR System device (Applied Biosystems). A normalization factor was calculated as the geometric mean of the quantity of two housekeeping genes (GAPDH and B2M) (Kolm et al., 2006) and the gene expression levels were determined by the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

Gene	Accesion number	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
House-keeping			
<i>GAPDH</i>	NM_001163856	F:GGCAAGTTCATGGCACAGT R:CACAACATATTACAGCACCAGCAT	128
<i>B2M</i>	NM_001082502.2	F: TCGTCCTGCTCGGGCTACT R: ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
Genes related with articular cartilage ECM production			
<i>COL1A1</i>	AF034691	F: ACACAGAGGTTTCAGTGGTTTGG R: CACCATGGCTACCAGGTTAC	89
<i>COL2A1</i>	XM_005611082.1	F: TTAGACGCCATGAAGGTTTTCTG R: CTCTTGCTGCTCCACCAGTTCT	101
<i>ACAN</i>	AF019756	F: CTACGACGCCATCTGCTACA R: ACCGTCTGGATGGTGATGTC	96
<i>COMP</i>	AF325902	F: GGCGACGCGCAAATAGA R: GCCATTGAAGGCCGTGTAA	111

Gene	Accession number	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)
Genes related with articular cartilage ECM degradation/remodeling			
<i>MMP-3</i>	NM_001082495	F: TGATGTGACTGGCATTCAATCC R: ATCGCACATGGCTAGTGTCCA	112
<i>MMP-13</i>	NM_001081804	F: CCGAACCCCTAAACATCCCAA R: GATGTAGGCGCCAGAAGAATCT	121
<i>TIMP-2</i>	XM_005597879.1	F: GAATGCAAGATCACGCGCT R: TGCCCGTTGATGTTCTTCTCT	101
Inflammatory mediators and growth factors			
<i>iNOS</i>	AY027883	F: CCAACAATGGCAACATCAGGT R: TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
<i>COX-2</i>	AB041771	F: GTTTGCATTTTTTGCCAGC R: ACTTAAATCCACCCCGTGACC	103
<i>TNFα</i>	EU438779	F: CATGTTGTAGCAAACCCCAA R: TACAGCCCATCCAATGGTACC	125
<i>IL-1β</i>	NM_001082526.1	F: CCCACCCTACAGCTGGAGAC R: TCCACGTTGCCCTTGATTTTC	101
<i>TGFβ-1</i>	AF175709	F: GTCCTTTGATGTCACCGGAGT R: TGGAAGTGAACCCGTT	137

Table 4.- Primers used for gene expression by RT-qPCR. GenBank accession numbers of the sequences used for primers design. Primers (F: Forward and R: Reverse) and length of the amplicon in base pair (bp). Genes were grouped in agreement with the functions and implications of encoded molecules. GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; B2M, beta-2 microglobulin; COL1A1, collagen type I; COL2A1, collagen type II; ACAN, aggrecan; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; MMP-3, matrix metalloproteinase 3; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase 2; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with the SPSS 15.0 (SPSS, Inc.). Normality was tested by the Shapiro-Wilk test. The aim of studying both carpi was to compare them at different end-points but not along the study, since the procedure was the same in both of them. Therefore, the data collected along the study from both carpi were added at each time-point until two months of evolution.

For clinical and synovial assessments, each parameter was compared between each time-point and the moment of the injection (week 2 or 5) by using the Wilcoxon test to study the evolution within each group. Subsequently, the percentages of change of each parameter at each time-point compared to the baseline value (time 0, pre-lesion) were calculated in each group and were compared between groups by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *posthoc* test. For radiology scores, the same test was used to assess differences between groups at each time-point and differences between time-points within each group were studied by the Friedman test. For MRI, gross anatomy and gene expression analyses, the results were first compared between groups at each end-point by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *posthoc* analysis, and subsequently between both end-points within each group by using the Wilcoxon test. In MRI assessment, scorings of each parameter were not summed but independently compared. Significance was set at $p < 0.05$ for all analysis.

Results

MSCs isolation and characterization

Mesenchymal stem cells were successfully obtained from all donors and properly characterized. Cryopreserved cells maintained viability and proliferation (data not shown).

Clinical follow-up

All horses developed lameness with marked joint effusion and local heat within 6 hours following Amphotericin-B injection, which progressively decreased after 24-48h. HR, RR and rectal temperature peaked at 24 hours and were progressively reduced and normalized by 48-72h. At the moment of the first injection, only local signs were present characterized by moderate effusion and carpal heat and mild lameness.

Signs of joint inflammation progressively decreased throughout the study. Lameness and local heat did not show significant differences between groups, but suggested quicker normalization in MSC-naïve and MSC-primed groups (Figure 2.A and 2.B). Carpal perimeter was significantly earlier reduced in both treatment groups than

in control after first injection (Figure 2.C). In addition, when comparing between groups at each time-point, MSC-primed group showed significantly lower percentage of change over pre-lesion values (time 0) in all the studied time-points, except at 24h after second injection (Figure 2.D).

Second injection did not produce observable reaction in MSC-naïve group except slight non-significant carpal heat increase, which was also observed in MSC-primed group together with a significant increase of carpal perimeter within 24h following injection. This effect was transient, not accompanied by an increase in the lameness score or signs of pain, and it was spontaneously resolved and normalized by ten days later (Figure 2.B and 2.C). Only one animal in the MSC-primed group developed marked effusion with signs of pain within few hours after the second injection in the second lesion, but the reaction was self-limiting and resolved within the following 48h with no anti-inflammatory medication (analgesia was provided as described above).

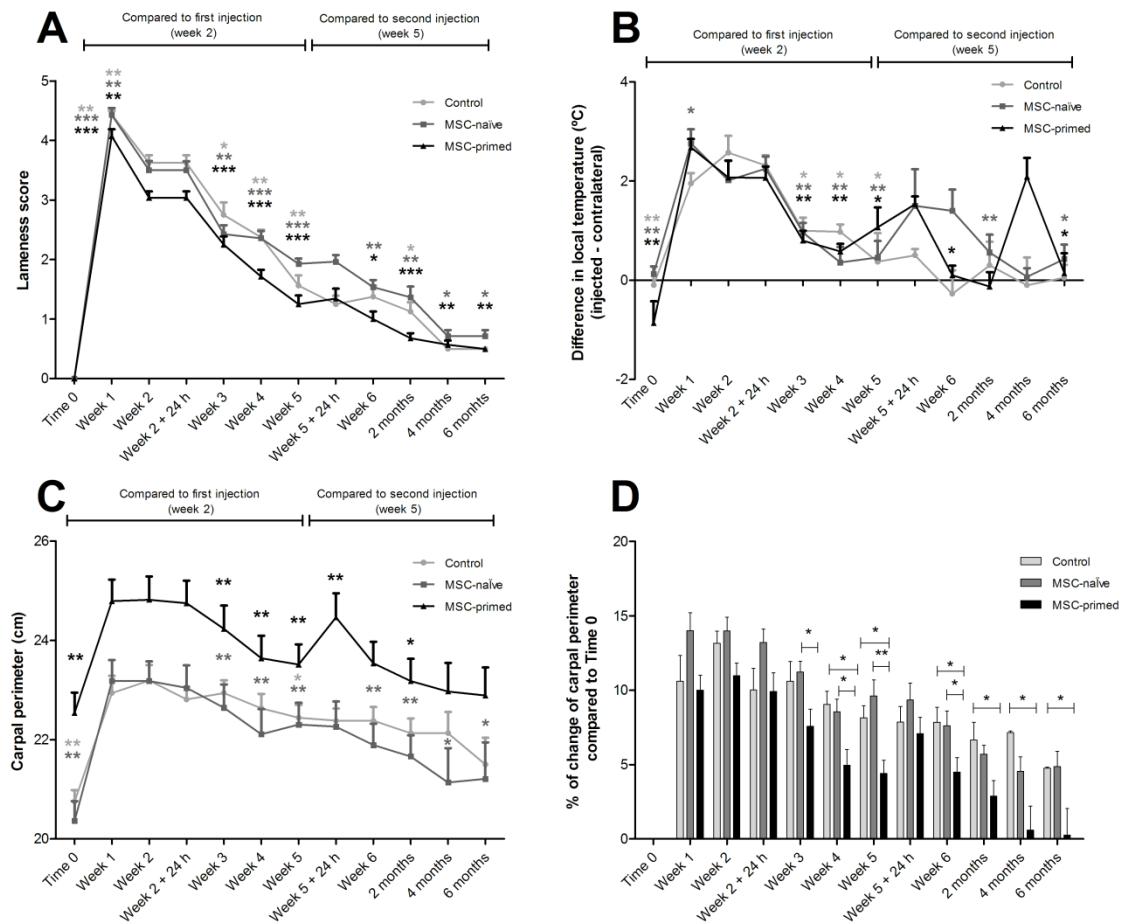


Figure 2: Results from clinical follow-up. Light grey bar, line and asterisks represent control group, grey line and asterisks represent MSC-naïve group and black line and asterisks represent MSC-primed group. Significant differences between each time-point and the time of the first (week 2) or second injection (week 5) are shown for each group. **A)** Evolution of lameness along the study is shown as mean \pm SEM lameness score at each time-point. **B)** Evolution of the carpal perimeter along the study is shown as Mean \pm SEM in centimeters (cm) at each time-point. **C)** Evolution of the carpal heat along the study is shown as Mean \pm SEM of the difference in the local temperature between the injected carpus and the contralateral one (injected – contralateral) at each time-point. For the second carpus assessment, it was checked that local temperature had returned to basal values in first carpus and that there were no differences between carpi, in order to use first carpus as the contralateral control for the second one. **D)** Percentage (%) of change of the carpal perimeter at each time-point compared to Time 0 (pre-lesion) is shown as Mean \pm SEM for each group. (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

Synovial fluid follow-up

When comparing between groups the percentage of change for TP, Hp, tWCC and dWCC at each time-point over the time 0, significant differences were not found (data not shown). MSC-primed group showed the quickest reduction in TP, followed by MSC-naïve group. At the end of the study, only MSC-primed group showed significantly lower TP values (Figure 3.A).

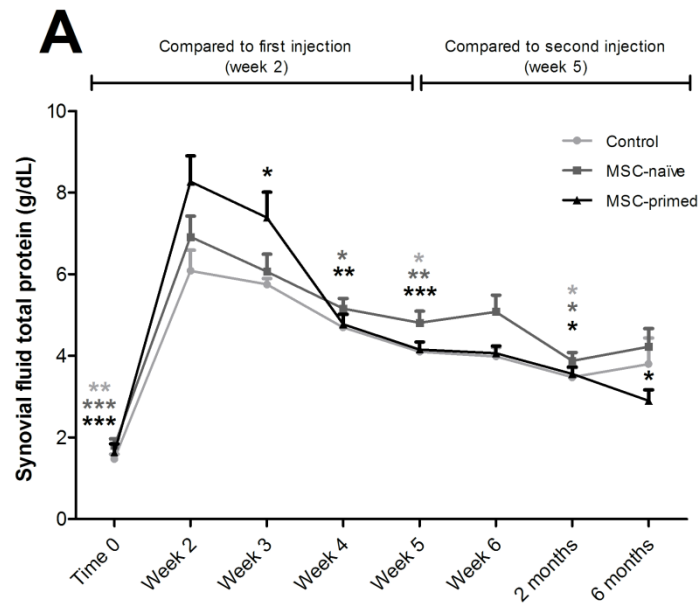


Figure 3.A: Evolution of the synovial fluid total protein (g/dl) along the study is shown as Mean \pm SEM at each time-point. Light grey lines and symbols represent control group, grey lines and symbols represent MSC-naïve group and black lines and symbols represent MSC-primed group. Significant differences between each time-point and the time of the first (week 2) or second injection (week 5) are shown for each group (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Haptoglobin was significantly increased in the three groups in both serum and SF at the moment of the first injection and it was significantly reduced one week later in SF only in the treated groups. After second injection, only treatment groups reduced the Hp level in SF and only MSC-primed group showed significant reduction also in serum (Figure 3.B). Serum Hp was normalized in the three groups at the moment of the second lesion induction (four months).

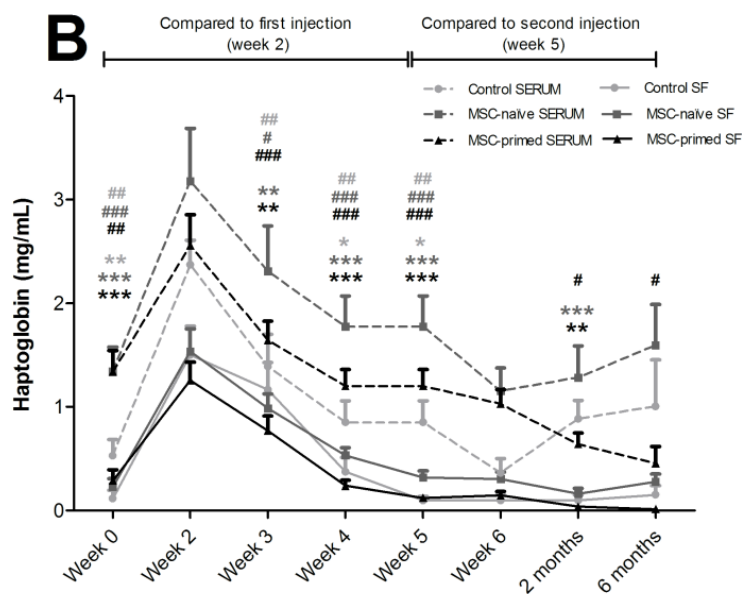


Figure 3.B: Evolution of the haptoglobin concentration (mg/ml) in serum and synovial fluid along the study is shown as Mean \pm SEM at each time-point. Light grey lines and symbols represent control group, grey lines and symbols represent MSC-naïve group and black lines and symbols represent MSC-primed group. Significant differences between each time-point and the time of the first (week 2) or second injection (week 5) are shown for each group. Continuous lines represent synovial fluid values and discontinuous lines represent serum values. Asterisks (*) are used for significant differences in synovial fluid and hashes (#) are used for significant differences in serum (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$, ### = $p < 0.001$).

Lesion induction led to an increase in tWCC and in neutrophil percentage, while lymphocyte and macrophage percentages were reduced. Along the study, values tended to normalize in all the three groups, but both treatment groups provided quicker changes (Figure 3.C and 3.D). However, tWCC increased in both control and MSC-primed groups after the second injection, but the values were significantly reduced by the end of the study only in MSC-primed group (Figure 3.C).

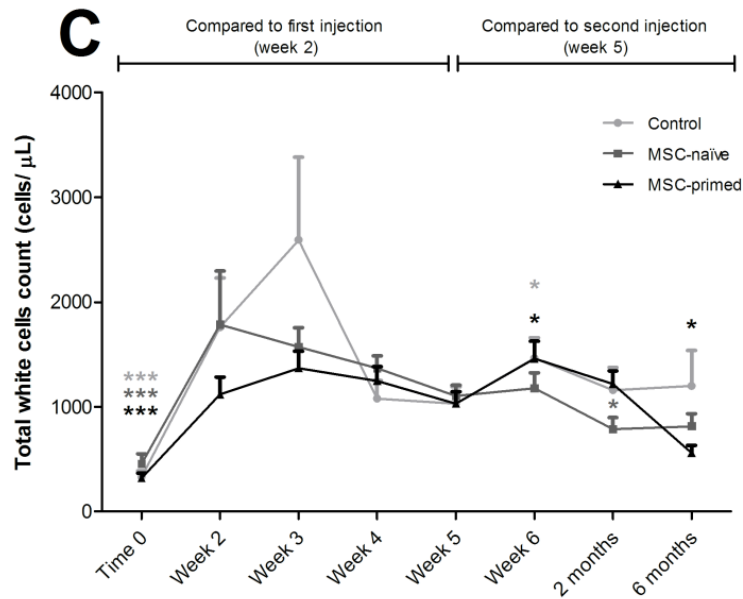


Figure 3.C: Evolution of the synovial fluid total white cells count (cells/ μ L) along the study is shown as Mean \pm SEM at each time-point. Light grey lines and symbols represent control group, grey lines and symbols represent MSC-naïve group and black lines and symbols represent MSC-primed group. Significant differences between each time-point and the time of the first (week 2) or second injection (week 5) are shown for each group (* = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$).

Significant reduction in the percentage of neutrophils was reached earlier in MSC-naïve and MSC-primed groups after both first and second injections. As the percentage of neutrophils was reduced, proportion of lymphocytes significantly increased after both treatments earlier than in control group. Percentage of macrophages increased after first injection and decreased after the second one in all the three groups, but this change was more attenuated in the treatments groups (Figure 3.D).

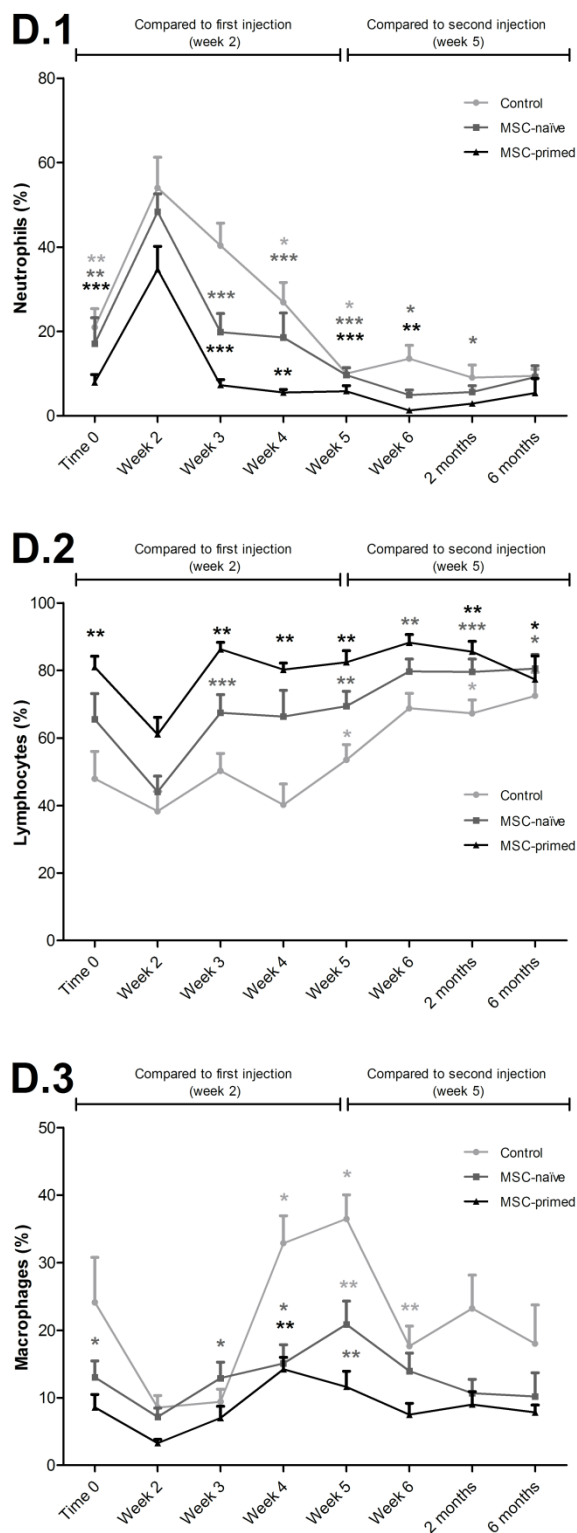


Figure 3.D: Evolution of the percentages (%) of neutrophils, lymphocytes and macrophages in synovial fluid along the study is shown as Mean \pm SEM at each time-point. Light grey lines and symbols represent control group, grey lines and symbols represent MSC-naïve group and black lines and symbols represent MSC-primed group. Significant differences between each time-point and the time of the first (week 2) or second injection (week 5) are shown for each group (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Imaging assessment

Radiological scoring showed significant differences between the pre-lesion time and all the subsequent time-points in all the three groups, but no significant differences were found between groups at any time-point (Figure 4.A and Table 5).

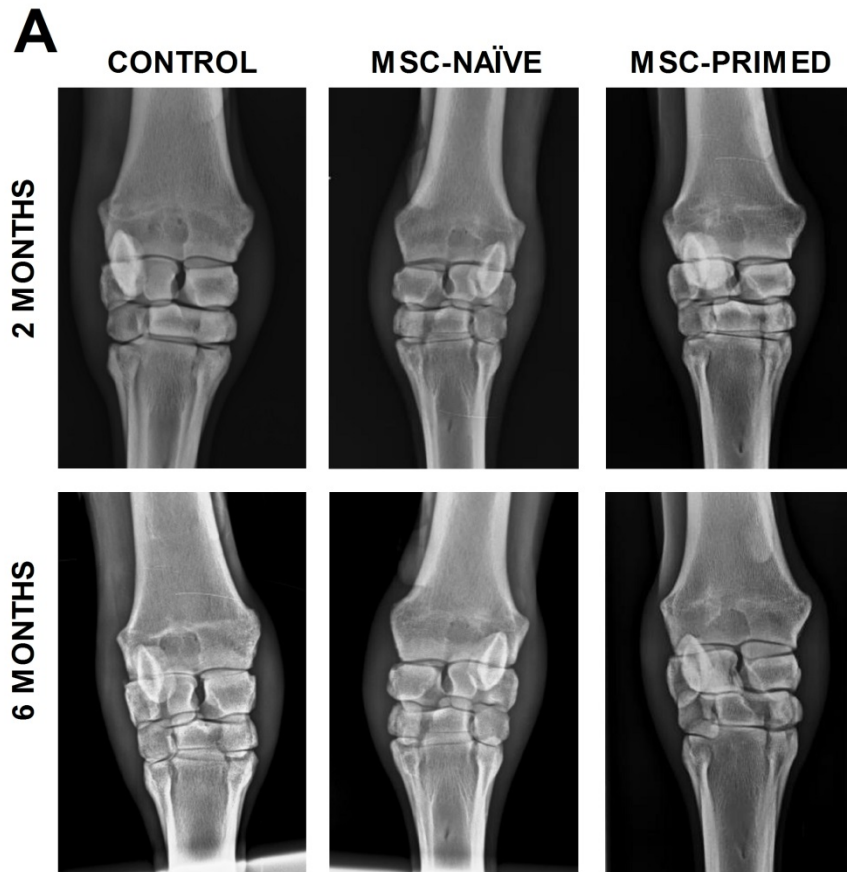


Figure 4.A: Representative radiologic images of one animal from each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) are presented for two and six months of progression. Joint space narrowing and marginal bone remodeling was progressively observed; note that the radiological evolution was similar between the three groups.

<i>Time</i>	Control	MSC-naïve	MSC-primed
<i>Week 0 (pre-lesion)</i>	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
<i>Week 2 (first injection)</i>	2.50 ± 1.31 ^b	1.93 ± 0.99 ^b	1.43 ± 0.85 ^b
<i>2 months</i>	3.00 ± 0.93 ^b	3.43 ± 1.82 ^b	2.71 ± 1.33 ^b
<i>4 months</i>	2.50 ± 0.58 ^b	3.86 ± 1.77 ^b	2.71 ± 1.70 ^b
<i>6 months</i>	2.50 ± 1.00 ^b	4.43 ± 1.90 ^b	3.00 ± 1.29 ^b

Table 5.- Results of radiology grading categories are shown for each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) as mean ± SD at each assessed time-point. Different letters mean significant differences.

In agreement with carpus perimeter measurements, subjective ultrasonography assessment revealed that joint effusion and capsulitis started to decline by week one after first injection in both treatment groups, but not in control group until the moment of the second injection. Slight irregularities in the articular surfaces began to be detected by two months in all the three groups and progressed by the end of the study with final ultrasonography outcome similar between groups (Figure 4.B).

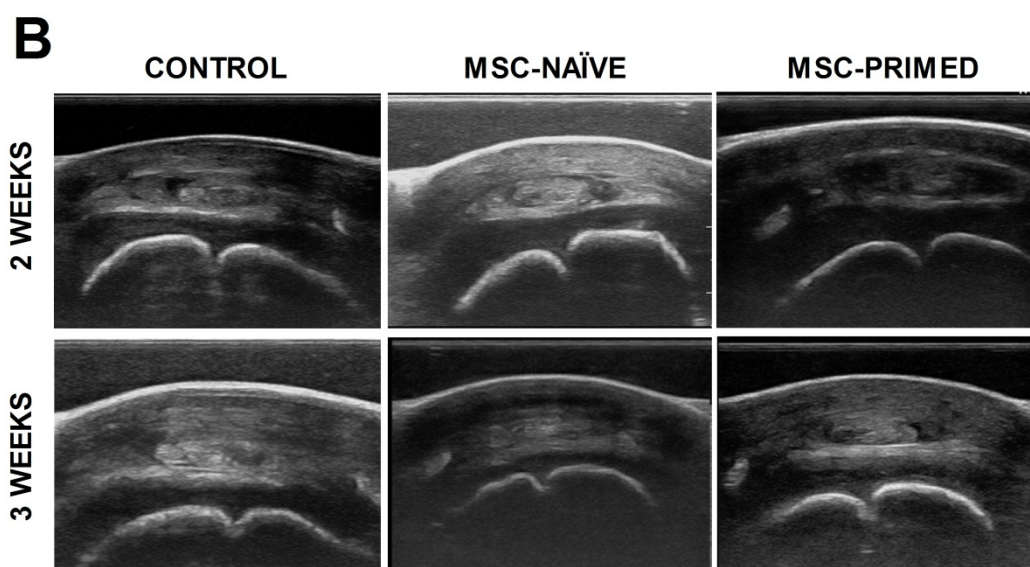


Figure 4.B: Representative ultrasound images of one animal from each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) are presented for week 2 (first injection) and week 3; note that synovial effusion was quicker reduced in both treated groups than in control.

In MRI assessment, no significant differences were found except higher synovial effusion in MSC-primed compared to MSC-naïve group at two months. At six months, tested treatments did not evidence improvement of the MRI outcome. At two months, MSC-naïve treatment reduced the score for synovial effusion and both treatments reduced subchondral bone affection score compared to control group, but these changes were not statistically significant (Figure 4.C and Table 6).

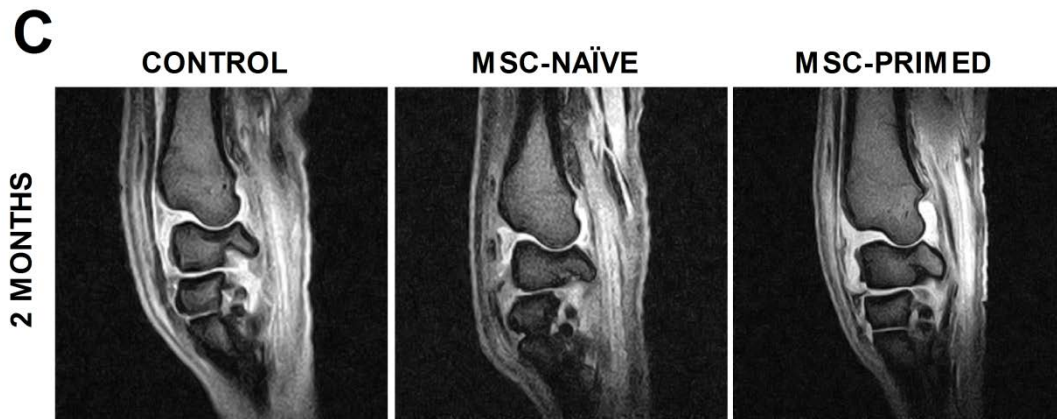


Figure 4.C: Representative magnetic resonance images of one animal from each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) are presented for showing the different synovial effusion found between groups at two months. Images provided are T2* gradient echo (GE), sagittal planes.

MRI grading parameter	Two months end-point			Six months end-point		
	Control	MSC-naïve	MSC-primed	Control	MSC-naïve	MSC-primed
Osteophyte formation	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.58	0.00 ± 0.00
Synovial effusion	1.50 ± 0.58 ^{a,b}	0.67 ± 0.58 ^{a,c}	2.25 ± 0.50 ^b	1.25 ± 0.50	1.33 ± 0.58	1.75 ± 0.96
Osseous edema	0.25 ± 0.50	0.33 ± 0.58	1.25 ± 1.26	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.50
Subchondral bone affectation	1.00 ± 0.00	0.33 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.33 ± 0.58	0.75 ± 0.50

Table 6.- Results of magnetic resonance imaging (MRI) grading categories are shown for each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) as mean ± SD at each assessed end-point. Different letters mean significant differences.

Macroscopic assessment of cartilage

Gross anatomy scores were lower in MSC-naïve and MSC-primed groups compared to control group at two months, statistically significant for MSC-naïve group. In addition, significantly lower scores were found at two months end-point compared to six months within both MSC-naïve and MSC-primed groups, but not in the control group (Figure 5).

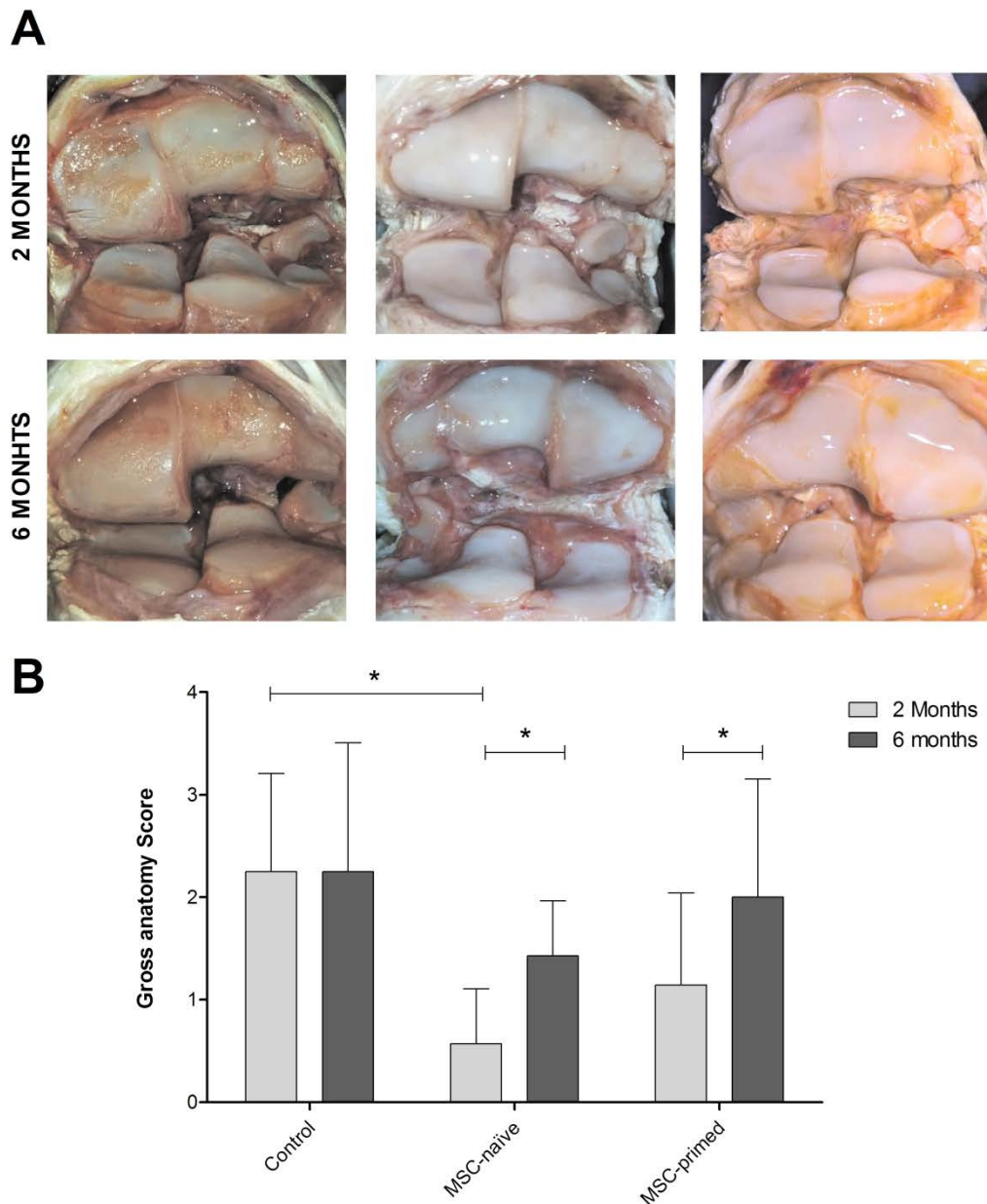


Figure 5: Gross anatomy outcome. A) Representative images of the macroscopic appearance of the articular cartilage surface in on animal from each group (control, MSC-naïve, MSC-primed) at both end-points (two and six months). B) Mean \pm SEM of the gross anatomy score for each group (control, MSC-naïve and MSC-primed) at two months (light grey bars) and at six months (dark grey bars) (* = $p < 0.05$).

Gene expression analysis

Cartilage gene expression

At two months end-point, cartilage from MSC-primed group showed significantly higher expression of COL2A1 and iNOS and significant downregulation of

COX-2 and IL-1 β compared to the control. Significant upregulation of MMP-3 was also found in this group compared to MSC-naïve group. TGF- β 1 was significantly upregulated in MSC-primed group compared to both control and MSC-naïve groups (Fig 6.A.1). At six months, significantly higher COL1A1 expression was observed in both treatment groups compared to control. In MSC-primed group, expression of ACAN, COMP, MMP-3, TIMP-2 and TGF- β 1 was significantly higher compared to the other two groups, and COL2A1 and iNOS were significantly upregulated compared to control and MSC-naïve group, respectively. TNF α was significantly reduced in both treated groups compared to control (Fig 6.A.2).

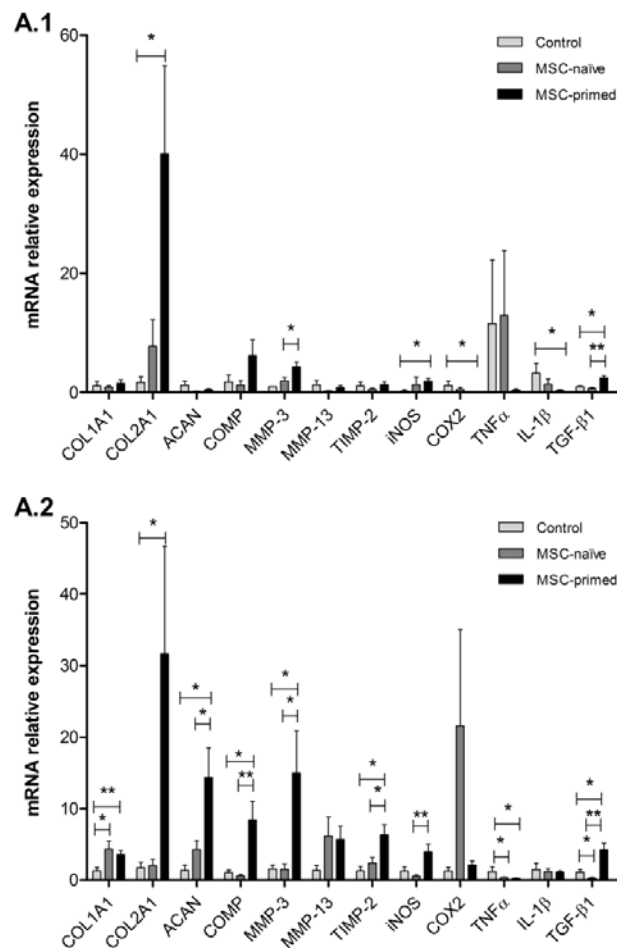


Figure 6.A: Gene expression results are shown as mean \pm SEM of the relative mRNA expression. Gene expression in cartilage is compared between control, MSC-naïve and MSC-primed groups at two months (A.1) and at six months (A.2). COL1A1, collagen type I; COL2A1, collagen type II; ACAN, aggrecan; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; MMP-3, matrix metalloproteinase 3; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase 2; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1 (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

When comparing the cartilage gene expression between the two end-points within each group, significant differences were not observed for control group (data now shown), whereas MSC-naïve and MSC-primed groups showed significant upregulation of MMP-13, TIMP-2 and COX-2 at six months. In addition, at six months MSC-naïve group showed significantly lower expression of TNF α and MSC-primed treatment significantly upregulated ACAN, MMP-3, IL-1 β and TGF- β 1 (Fig. 6.B.1 and 6.B.2).

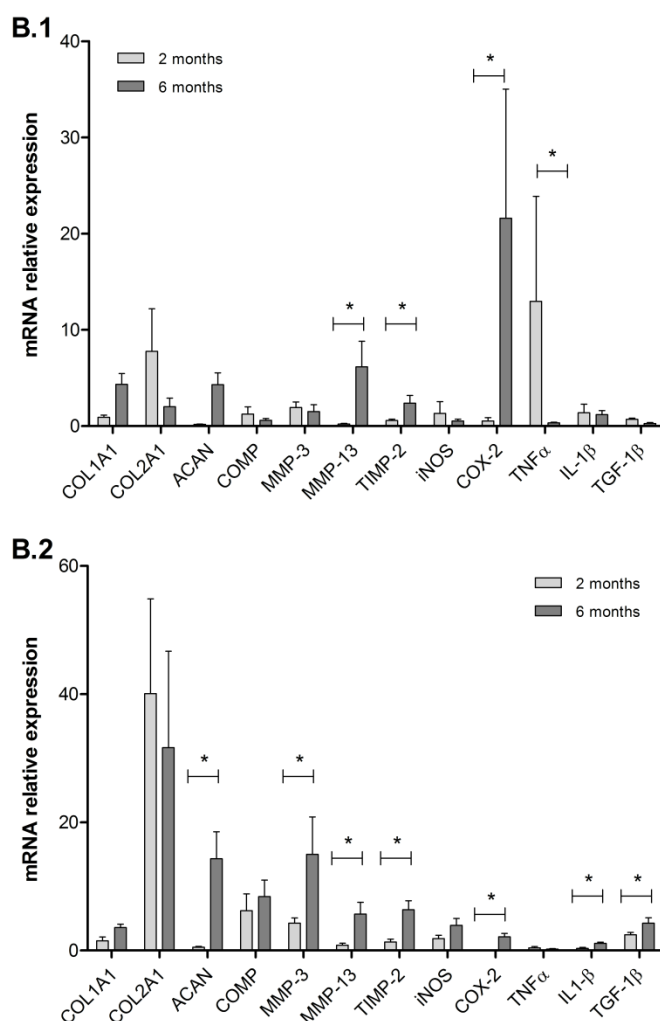


Figure 6.B: Gene expression results are shown as mean \pm SEM of the relative mRNA expression. Gene expression in cartilage is compared between the two end-points (two and six months) for MSC-naïve group (B.1) and MSC-primed group (B.2). COL1A1, collagen type I; COL2A1, collagen type II; ACAN, aggrecan; COMP, cartilage oligomeric matrix protein; MMP-3, matrix metalloproteinase 3; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase 2; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1 (* = $p < 0.05$).

Synovium gene expression

At two months, MMP-3 expression was significantly lower in MSC-naïve group than in MSC-primed group, MMP-13 was significantly downregulated in both treatment groups compared to control, and TIMP-2 expression was significantly reduced in MSC-primed group compared to control. TNF α and IL-1 β expression was significantly lower in MSC-primed group compared to the other groups (Fig. 6.C.1). At six months, significant upregulation of MMP-3 and downregulation of MMP-13 was found in MSC-primed group compared to the other groups. MSC-naïve treatment significantly upregulated TIMP-2 and TNF α compared to the other groups (Fig. 6.C.2).

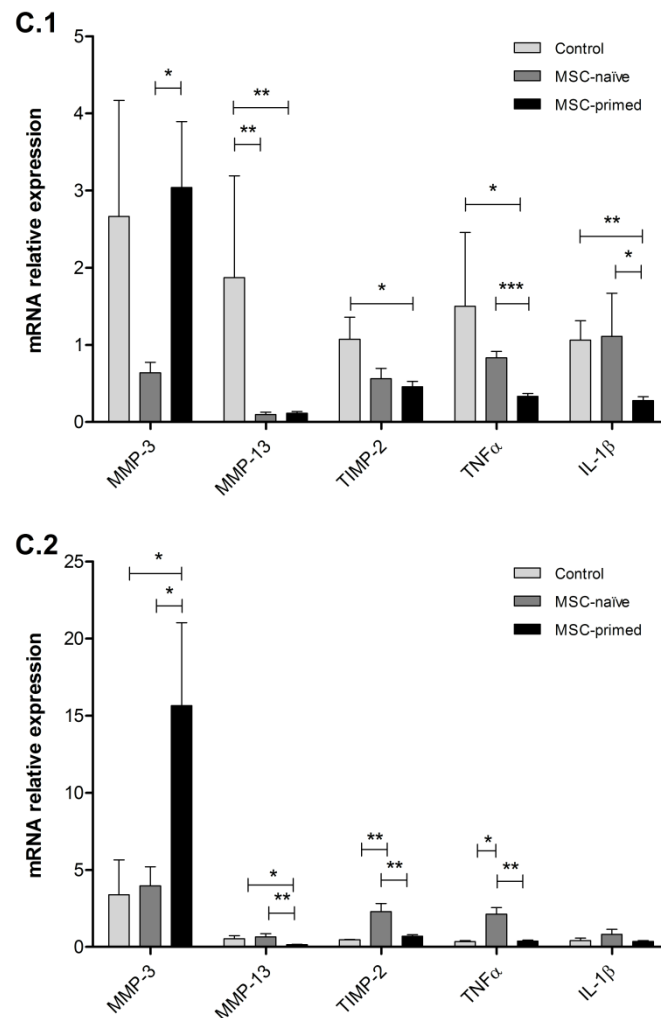


Figure 6.C: Gene expression results are shown as mean \pm SEM of the relative mRNA expression. Gene expression in synovial membrane is compared between control, MSC-naïve and MSC-primed groups at two months (C.1) and at six months (C.2). MMP-3, matrix metalloproteinase 3; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; (* = p<0.05, ** = p<0.01, ***=p<0.001).

When comparing the gene expression in synovium between the two end-points within each group, no differences were found in control group (data not shown). Both treatment groups showed significant downregulation of MMP-3 at two months. In addition, MMP-13, TIMP-2 and TNF α expression was significantly lower at two months in MSC-naïve group (Fig 6.D.1 and 6.D.2).

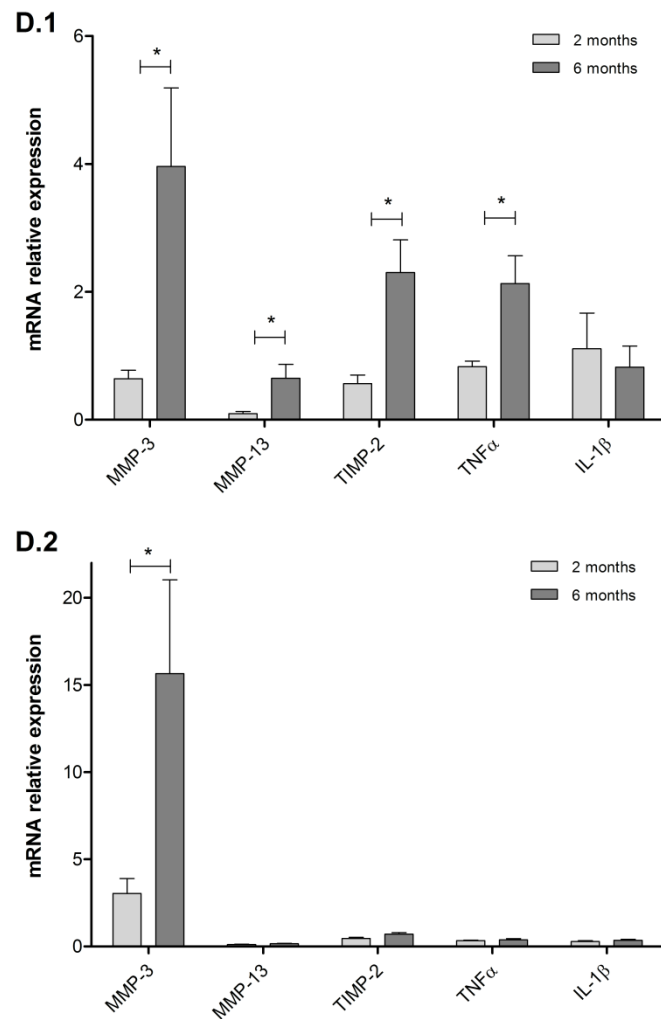


Figure 6.D: Gene expression results are shown as mean \pm SEM of the relative mRNA expression. Gene expression in synovial membrane is compared between the two end-points (two and six months) for MSC-naïve group (D.1) and MSC-primed group (D.2). MMP-3, matrix metalloproteinase 3; MMP-13, matrix metalloproteinase 13; TIMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; TNF α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta (* = $p < 0.05$).

Discussion

This study reports the potential usefulness, mainly at short-term, of priming equine BM-MSCs with proinflammatory cytokines prior to their in vivo administration

into injured joints. MSCs are a promising tool for the OA treatment and current research has shown the importance of their immunomodulatory properties (Barry and Murphy, 2013), which are induced by an inflammatory environment (Cuerquis et al., 2014). Priming MSCs with TNF α provided enhanced in vivo anti-inflammatory, regulatory and healing properties in a rat model of Achilles tendon injury (Aktas et al., 2017) and IFN γ priming of MSCs has been tested in different pathology models, showing increased therapeutic benefits elicited by both autologous and allogeneic cells, whereas other studies reported inefficacy of this approach (reviewed in Sivanathan et al., 2014). These conflicting results might be related to MSC immunogenicity, which could be increased by inflammatory priming through the MHC upregulation, as it has been reported in the horse (Barrachina et al., 2016a; Barrachina et al., 2017). In vivo studies reported short-term efficacy of MSC-primed (Duijvestein et al., 2011; Tobin et al., 2013), but their long-term effects remains unclear. This might be due to the higher MSC-primed immunogenicity, which at first could be dampen by their increased immunosuppressive properties, but their long-term survival and effectivity might be compromised by the generation of alloantibodies (Sivanathan et al., 2014).

Production of alloantibodies against MSCs has been recently reported in the horse (Pezzanite et al., 2015; Berglund and Schnabel, 2016; Owens et al., 2016). One limitation of our study was that MHC-matching was not assessed between donors and receptors and it has been reported the in vivo production of functional antibodies against MHC-mismatched MSCs (Berglund and Schnabel 2016). Even if the clinical repercussion of this finding is still unknown, it should be considered. Authors hypothesize that this process could have been implied in the transient local inflammatory response that was observed in MSC-primed group after the second injection, but the results of our study do not permit to confirm it.

A recent study reported higher effectivity of IFN γ -primed equine MSCs in a mice model of OA with remarkable inflammatory component (Maumus et al., 2016). Since the main effect of MSCs in OA appears to be related to their immunomodulatory and anti-inflammatory properties, the choice of the lesion model is important. For instance, the use of MSCs in mice models of joint disease has shown better results

when using the collagenase-induced OA model, characterized by a high inflammatory component (Schelbergen et al., 2014), than when using the destabilization medial meniscus model (ter Huurne et al., 2012). Actually, enhanced therapeutic benefit of MSCs has been shown both in vitro and in vivo when remarkable level of proinflammatory mediators was present (Manferdini et al., 2013; Schelbergen et al., 2014). Similarly, better outcome of MSC treatment has been shown in the equine Amphotericin-B model (Mokbel et al., 2011) than in the post-traumatic OA model (Frisbie et al., 2009). In a recent review of Colbath et al. (2016), authors proposed that differences in the MSC effect found between these two models might be due to the higher severity of Amphotericin-B induced lesion. Here, we hypothesize that the high inflammatory component of the Amphotericin-B model might have played an additional role in the outcome of MSC treatment. However, data from this study do not allow to corroborate this hypothesis, but highly inflammatory OA models might be suitable for studying the regulatory role of MSCs, as suggested by Maumus et al. (2016).

In a previous study using the Amphotericin-B model, MSCs were administered at three, six or nine weeks after lesion induction. Improved results were reported when MSCs were earlier administered and improvement begun at two months after lesion, but was not consistently maintained at six months. Those results mainly suggested a delaying effect in the progression of OA and authors of that study suggested that enhanced benefit could have been reached by using repeat administrations of MSCs (Mokbel et al., 2011), as it has been reported in a porcine meniscus injury model (Hatsushika et al., 2014). Therefore, we set to perform early and repeat MSC administration (two and five weeks) and to follow-up the treatments until two and six months of progression.

The use of IA Amphotericin-B resulted in an arthritis model accordingly to previous reports (Hulten et al., 2002; Mokbel et al., 2011). Previous studies in the horse using MSCs in experimental models showed no clinical differences between treated and control groups (Frisbie et al., 2009; McIlwraith et al., 2011), but other studies in naturally-occurring joint pathologies showed enhanced clinical outcome (Broeckx et al., 2014a; Ferris et al., 2014). In our study, differences in the clinical

evolution between control and treated groups were slight, but quicker improvement was reached by the treated groups.

In the SF, TP was quicker reduced in MSC-primed group followed by MSC-naïve group, as it has also been reported by using autologous MSCs in the same lesion model (Mokbel et al., 2011). Haptoglobin has been recently reported as a potential SF inflammatory marker in a study using the same lesion model. Pre-lesion (time 0) and pre-treatment (week 2) Hp values in SF and serum were in agreement with those previously reported for the same time-points (Hulten et al., 2002; Barrachina et al., 2016b). In addition, dynamics of Hp in SF revealed a quicker reduction elicited by both MSC-naïve and MSC-primed. Both treatments provided quicker normalization of the percentages of white cells populations, even if no significant reduction of the tWCC was provided, similarly to that observed in previous reports (Frisbie et al., 2009). These findings, in agreement with clinical observations, suggest an anti-inflammatory effect elicited by both MSC treatments at first stage after administration, especially after the first injection when joint inflammation was higher. Repeat administration of pooled allogeneic MSC-naïve was well tolerated, accordingly to that reported in healthy joints (Ardanaz et al., 2016). However, second injection of allogeneic MSC-primed led to slight transient inflammatory reaction, indicating that these cells might be more immunogenic. This finding might be related with an MHC upregulation induced by inflammatory priming (Barrachina et al., 2017). Interestingly, only second injection but not the first one produced this effect. As discussed above, authors hypothesize that alloantibody production (Berglund and Schnabel, 2016) might have participated in this response. Nevertheless, this process was transient and spontaneously resolved even in the animal presenting more marked reaction. Questions about the survival and recognition of allogeneic MSC-primed by the receptor immune system, and the implication for their therapeutic effects, still remain unanswered.

Ultrasonography was useful for corroborating the dynamics of inflammation between groups, revealing a quicker reduction of the joint effusion and thickening of joint capsule in both treatment groups, in agreement with other clinical and synovial parameters. Similarly, in a sheep model of joint injury treated by MSCs, radiologic changes were not observed but ultrasonography was useful for revealing joint effusion

and alterations in the articular cartilage surface (Caminal et al., 2014). Radiologic changes were observed along the study in all the three groups, but scoring did not reveal differences between them. Similarly, MRI did not provide obvious differences between groups. In agreement, previous studies did not report improved radiology and MRI outcomes in the equine MSC-treated joints (McIlwraith et al., 2011). However, MRI short-term outcome appeared to be better after MSC-naïve treatment.

Gross examination of the joints revealed better macroscopic appearance in both treatment groups, which was more obvious at short-term and in MSC-naïve group. Accordingly, a previous study using the same lesion model showed better macroscopic appearance of the cartilage in MSC treated joints, but they did not report differences between two and six months (Mokbel et al., 2011). Another study using an equine focal chondral defect model also reported better repair tissue quality in treated joints (McIlwraith et al., 2011). However, other studies using the post-traumatic OA model did not show a significant effect of the MSC treatment in the gross pathologic observation (Frisbie et al., 2009). As discussed above, differences between lesion models should be carefully taken (Colbath et al., 2016), but our results suggest that MSCs delayed the progression of the pathology based on the enhanced gross appearance of the treated joints at two months.

Collagen type II, aggrecan and COMP are major components of the articular cartilage ECM which are decreased during OA (Maldonado and Nam, 2013). Interestingly, the genes coding for these molecules were upregulated in MSC-primed group at six months, with COL2A1 also upregulated at two months, suggesting an attempt of cartilage reparation with better quality of the healing tissue. Similarly, a previous study using a rat model showed areas of increased collagen type II in MSC-treated joints (Chung et al., 2014) and MSCs provided higher aggrecan content in an articular cartilage defect model in horses, but content in collagen type I and II did not show differences in that study (McIlwraith et al., 2011). Collagen type I is found in OA cartilage when chondrocytes change their ECM production profile (Maldonado and Nam, 2013) and it was upregulated in both treated groups compared to the control at six months. Even if COL1A1 expression is related to fibroblastic rather to chondrocytic

phenotype (Shi et al., 2012), its upregulation together with COL2A1, ACAN and COMP might be indicative of an attempt of the chondrocytes to initiate repairs.

During OA, an imbalance between degrading enzymes and their inhibitors leads to an excessive degradation of the cartilage (Dean et al., 1989; Tung et al., 2002a). Changes in MMPs and TIMP expression after both treatments were mainly found in the synovium, according to previous report showing this structure as a major target and mediator of MSC therapy through the modulation of degrading enzymes (Saulnier et al., 2015). Both treatments reduced MMP-13 expression in synovium and this change was more consistent for MSC-primed group, showing MMP-13 downregulation at both end-points in this group. MMP-13 expression was higher at six months than at two months in all cases, suggesting an anti-catabolic regulation mainly elicited at short-term. Similarly, reduced expression of MMP-13 in synovium explants cultured in the supernatant of MSCs primed with TNF α and IFN γ has been reported (van Buul et al., 2012). On the other hand, MMP-3 was found upregulated in MSC-primed group in both synovium and cartilage. Even if MMP-3 is a degradative enzyme, a protective role of the cartilage in some situations has been proposed, since Mmp3 $^{-/-}$ mice developed more severe surgically induced OA (Clements et al., 2003) and due to the ability of MMP-3 to degrade the inflammatory molecule IL-1 β , therefore participating in a negative feedback loop to regulate MMPs expression (Ito et al., 1996). Thus, MMP-3 upregulation might be related with an attempt of restoring the functional balance in the joint. TIMP-2 did not show a consistent expression pattern, but tended to change towards the same direction than MMP-13 in MSC-primed group, maybe aiming to reestablish the balance between them since in the equine OA cartilage has been reported TIMP-2 downregulation and MMP-13 upregulation (Clegg et al., 2005).

Although nitric oxide (NO) is considered as a pro-inflammatory marker associated with OA (Tung et al., 2002b), there is evidence suggesting that NO may also play protective roles in the joint (Abramson, 2008) and immunomodulatory properties have been attributed to NO (Wink et al., 2011). Our data do not permit to elucidate the implication of iNOS upregulation by MSC-primed treatment in cartilage, but its role might not be detrimental but regulatory (Feelisch, 2008). Expression of iNOS by chondrocytes is mainly induced by the proinflammatory cytokines IL-1 and TNF α ,

which gene expression was reduced in cartilage of treated groups, similarly to that showed by van Buul et al. (2012). TNF α and IL1 β are the major pro-inflammatory cytokines involved in the OA and they are upregulated in vitro in equine chondrocytes after inflammatory stimuli (David et al., 2007) and in vivo in cartilage from equine OA carpi (Kamm et al., 2010). MSC-primed treatment was more effective in reducing the gene expression of these cytokines, suggesting a higher anti-inflammatory effect. Reduced expression of IL-1 β appeared to be a short-term event, while TNF α downregulation was maintained at six months, which might be due to different dynamics of cytokines during OA progression (Marinova-Mutafchieva et al., 2006). TNF α and IL-1 β are able to induce the secretion of PGE₂, synthesized by COX₂, which increased concentrations and gene expression are related with decreased proteoglycans synthesis and increased ECM destruction in the OA (Amin et al., 1997; Tung et al., 2002a; Attur et al., 2008; Frisbie et al., 2008). COX₂ was short-term downregulated in cartilage by both treatments, suggesting anti-inflammatory actions elicited by MSCs, and this effect also appeared to be transient. In agreement with our findings, decrease in PGE₂ secretion in equine cartilage explants exposed to MSC-primed conditioned media (Van Buul et al., 2012) and reduction in PGE₂ in SF from OA horses treated by MSCs (Frisbie et al. 2009) have been reported. TGF- β 1 is considered to have a cartilage protective role through stimulating ECM components synthesis and by reducing MMP expression (Sutton et al., 2009), as well as regulating the joint inflammation (Thorbecke et al., 1992). The upregulation of TGF- β 1 in cartilage after MSC-primed treatment suggest enhanced repair stimulation. In a mice model, TGF- β 1 predominated during the remission phase of the disease (Marinova-Mutafchieva et al., 2006), which might be in agreement with the higher expression observed at six months.

Summarizing, the gene expression results suggest that IA administration of MSCs had a therapeutic benefit and that MSC-primed treatment elicited greater anti-inflammatory and regulatory effects on articular tissues than the unstimulated cells.

Overall, the parameters assessed along the study showed improvement after MSC treatments. While obvious differences between MSC-naïve and MSC-primed groups were not observed for clinical, synovial or imaging parameters, MRI and gross

anatomy showed slight better outcome in the MSC-naïve group, whereas MSC-primed treatment provided better results in terms of gene expression of joint tissues. In general, MSC-primed treatment appeared to have a more powerful anti-inflammatory and regulatory effect. However, the slight transient inflammatory reaction observed after the second MSC-primed injection requires further investigation about immunogenicity implications of this strategy. For both treatments, beneficial effects were mostly observed at short-term. It has been previously reported that MSCs improved the early healing response, but not the long-term outcome, in sheep and equine models of cartilage injury (Wilke et al., 2007; Caminal et al., 2014). This might be due to the short-term life of these cells when they are in vivo administered, especially for the allogeneic mismatched ones. On the other hand, particularly in the case of allogeneic cells, the number of administered MSCs could decrease in vivo before the inflammatory level required for activation is reached, so this lag phase for in vivo MSC activation could be avoided by ex vivo previous stimulation of MSCs. In addition, the enhanced immune suppressive properties of primed MSCs might help the allogeneic ones to evade the receptor immune system, even if the MHC expression is increased (Ankrum et al., 2014; Sivanathan et al., 2014).

In conclusion, further investigation is needed to clarify the immunogenic implications of using allogeneic primed equine MSCs for the treatment of joint pathologies, but the results of this study suggest an in vivo enhanced regulatory ability of MSC-primed and potential usefulness of this approach, encouraging to keep researching in this field.

References

- Abramson, S.B., 2008. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis research & therapy* 10 Suppl 2, S2.
- Aigner, T., Cook, J.L., Gerwin, N., Glasson, S.S., Lavery, S., Little, C.B., McIlwraith, W., Kraus, V.B., 2010. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S2-6.
- Aktas, E., Chamberlain, C.S., Saether, E.E., Duenwald-Kuehl, S.E., Kondratko-Mittnacht, J., Stitgen, M., Lee, J.S., Clements, A.E., Murphy, W.L., Vanderby, R., 2017. Immune modulation with primed mesenchymal stem cells delivered via biodegradable scaffold to repair an Achilles tendon segmental defect. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 35, 269-280.
- Amin, A.R., Attur, M., Patel, R.N., Thakker, G.D., Marshall, P.J., Rediske, J., Stuchin, S.A., Patel, I.R., Abramson, S.B., 1997. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *The Journal of clinical investigation* 99, 1231-1237.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology* 32, 252-260.
- Anonymous, 1991. American Association of Equine Practitioners (AAEP). Guide for veterinary service and judging of equestrian events: definition and classification of lameness.
- Ardanaz, N., Vazquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC veterinary research* 12, 65.
- Attur, M., Al-Mussawir, H.E., Patel, J., Kitay, A., Dave, M., Palmer, G., Pillinger, M.H., Abramson, S.B., 2008. Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol* 181, 5082-5088.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vazquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Gosalvez, J., Roy, R., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2017. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells Dev* 26, 15-24.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vazquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2016a. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet Immunol Immunopathol* 171, 57-65.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Soler, L., Garcia, N., Romero, A., Vazquez, F.J., Vitoria, A., Alava, M.A., Lamprave, F., Rodellar, C., 2016b. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. *Vet Immunol Immunopathol* 182, 74-78.
- Barry, F., Murphy, M., 2013. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol* 9, 584-594.
- Becerra, P., Valdes Vazquez, M.A., Dudhia, J., Fiske-Jackson, A.R., Neves, F., Hartman, N.G., Smith, R.K., 2013. Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31, 1096-1102.

Berglund, A.K., Schnabel, L.V., 2016. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. *Equine veterinary journal*.

Broeckx, S., Suls, M., Beerts, C., Vandenberghe, A., Seys, B., Wuertz-Kozak, K., Duchateau, L., Spaas, J.H., 2014a. Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Current stem cell research & therapy* 9, 497-503.

Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Marien, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregon, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014b. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS one* 9, e85917.

Caminal, M., Fonseca, C., Peris, D., Moll, X., Rabanal, R.M., Barrachina, J., Codina, D., Garcia, F., Cairo, J.J., Godia, F., Pla, A., Vives, J., 2014. Use of a chronic model of articular cartilage and meniscal injury for the assessment of long-term effects after autologous mesenchymal stromal cell treatment in sheep. *New biotechnology* 31, 492-498.

Carrade, D.D., Owens, S.D., Galuppo, L.D., Vidal, M.A., Ferraro, G.L., Librach, F., Buerchler, S., Friedman, M.S., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2011. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 13, 419-430.

Clegg, P.D., Redmond, C.M., Hardingham, T.E., 2005. Alteration of chondrocyte degradative phenotype in normal and pathological equine articular cartilage. In: *Proceedings of the 10th World Congress on Osteoarthritis. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 13, S59-S60.

Clements, K.M., Price, J.S., Chambers, M.G., Visco, D.M., Poole, A.R., Mason, R.M., 2003. Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis and rheumatism* 48, 3452-3463.

Colbath, A.C., Frisbie, D.D., Dow, S.W., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Goodrich, L.R., 2016. *Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopedic Disease. Operative Techniques in Sports Medicine*.

Consentius, C., Reinke, P., Volk, H.D., 2015. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med* 10, 305-315.

Cuerquis, J., Romieu-Mourez, R., Francois, M., Routy, J.P., Young, Y.K., Zhao, J., Eliopoulos, N., 2014. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy* 16, 191-202.

Chan, W.K., Lau, A.S., Li, J.C., Law, H.K., Lau, Y.L., Chan, G.C., 2008. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Experimental hematology* 36, 1545-1555.

Chen, F.H., Tuan, R.S., 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy* 10, 223.

Chou, C.H., Lee, C.H., Lu, L.S., Song, I.W., Chuang, H.P., Kuo, S.Y., Wu, J.Y., Chen, Y.T., Kraus, V.B., Wu, C.C., Lee, M.T., 2013. Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage* 21, 450-461.

Chung, J.Y., Song, M., Ha, C.W., Kim, J.A., Lee, C.H., Park, Y.B., 2014. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. *Stem Cell Res Ther* 5, 39.

David, F., Farley, J., Huang, H., Lavoie, J.P., Laverty, S., 2007. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. *Vet Surg* 36, 221-227.

Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., Woessner, J.F., Jr., 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 84, 678-685.

Duijvestein, M., Wildenberg, M.E., Welling, M.M., Hennink, S., Molendijk, I., van Zuylen, V.L., Bosse, T., Vos, A.C., de Jonge-Muller, E.S., Roelofs, H., van der Weerd, L., Verspaget, H.W., Fibbe, W.E., te Velde, A.A., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2011. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29, 1549-1558.

Feelisch, M., 2008. The chemical biology of nitric oxide--an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16 Suppl 2, S3-s13.

Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E., Goodrich, L.R., 2014. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Veterinary surgery : VS* 43, 255-265.

Freitag, J., Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., Tenen, A., 2016. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. *BMC musculoskeletal disorders* 17, 230.

Frisbie, D.D., Al-Sobayil, F., Billingham, R.C., Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., 2008. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1196-1204.

Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., McIlwraith, C.W., 2009. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 1675-1680.

Hatsushika, D., Muneta, T., Nakamura, T., Horie, M., Koga, H., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., Sekiya, I., 2014. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 941-950.

Horie, M., Sekiya, I., Muneta, T., Ichinose, S., Matsumoto, K., Saito, H., Murakami, T., Kobayashi, E., 2009. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 878-887.

Hulten, C., Gronlund, U., Hirvonen, J., Tulamo, R.M., Suominen, M.M., Marhaug, G., Forsberg, M., 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine veterinary journal* 34, 699-704.

Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sasaguri, Y., Mori, Y., 1996. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry* 271, 14657-14660.

Kamm, J.L., Nixon, A.J., Witte, T.H., 2010. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. *Equine veterinary journal* 42, 693-699.

Kolm, G., Klein, D., Knapp, E., Watanabe, K., Walter, I., 2006. Lactoferrin expression in the horse endometrium: relevance in persisting mating-induced endometritis. *Veterinary immunology and immunopathology* 114, 159-167.

Lacey, D.C., Simmons, P.J., Graves, S.E., Hamilton, J.A., 2009. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 735-742.

Leijts, M.J., van Buul, G.M., Lubberts, E., Bos, P.K., Verhaar, J.A., Hoogduijn, M.J., van Osch, G.J., 2012. Effect of Arthritic Synovial Fluids on the Expression of Immunomodulatory Factors by Mesenchymal Stem Cells: An Explorative in vitro Study. *Frontiers in immunology* 3, 231.

Maldonado, M., Nam, J., 2013. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed research international* 2013, 284873.

Manferdini, C., Maumus, M., Gabusi, E., Piacentini, A., Filardo, G., Peyrafitte, J.A., Jorgensen, C., Bourin, P., Fleury-Cappellesso, S., Facchini, A., Noel, D., Lisignoli, G., 2013. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis and rheumatism* 65, 1271-1281.

Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funa, K., Williams, R.O., 2006. Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-beta expression in the joint. *Clin Exp Immunol* 146, 287-293.

Maumus, M., Roussignol, G., Toupet, K., Penarier, G., Bentz, I., Teixeira, S., Oustric, D., Jung, M., Lepage, O., Steinberg, R., Jorgensen, C., Noel, D., 2016. Utility of a Mouse Model of Osteoarthritis to Demonstrate Cartilage Protection by IFNgamma-Primed Equine Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* 7, 392.

McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Fuller, C.J., Hurtig, M., Cruz, A., 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S93-105.

McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werpy, N.M., Kawcak, C.E., Steadman, J.R., 2011. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 27, 1552-1561.

Mokbel, A.N., El Tookhy, O.S., Shamaa, A.A., Rashed, L.A., Sabry, D., El Sayed, A.M., 2011. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders* 12, 259.

Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B., Barry, F.P., 2003. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 3464-3474.

Owens, S.D., Kol, A., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2016. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem Cells International* 2016.

Pezzanite, L.M., Fortier, L.A., Antczak, D.F., Cassano, J.M., Brosnahan, M.M., Miller, D., Schnabel, L.V., 2015. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther* 6, 54.

Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013a. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 26, 453-460.

Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013b. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary immunology and immunopathology* 156, 99-106.

Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vazquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martin-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 147-154.

Saulnier, N., Viguier, E., Perrier-Groult, E., Chenu, C., Pillet, E., Roger, T., Maddens, S., Boulocher, C., 2015. Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 122-133.

Schelbergen, R.F., van Dalen, S., ter Huurne, M., Roth, J., Vogl, T., Noel, D., Jorgensen, C., van den Berg, W.B., van de Loo, F.A., Blom, A.B., van Lent, P.L., 2014. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 1158-1166.

Shi, S., Mercer, S., Eckert, G.J., Trippel, S.B., 2012. Regulation of articular chondrocyte aggrecan and collagen gene expression by multiple growth factor gene transfer. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 30, 1026-1031.

Sivanathan, K.N., Gronthos, S., Rojas-Canales, D., Thierry, B., Coates, P.T., 2014. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev* 10, 351-375.

Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., Mobasher, A., 2009. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 179, 10-24.

ter Huurne, M., Schelbergen, R., Blattes, R., Blom, A., de Munter, W., Grevers, L.C., Jeanson, J., Noel, D., Casteilla, L., Jorgensen, C., van den Berg, W., van Lent, P.L., 2012. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 64, 3604-3613.

Thorbecke, G.J., Shah, R., Leu, C.H., Kuruvilla, A.P., Hardison, A.M., Palladino, M.A., 1992. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7375-7379.

Tnibar, M., Kaser-Hotz, B., Auer, J.A., 1993. Ultrasonography of the dorsal and lateral aspects of the equine carpus: technique and normal appearance. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 34, 413-425.

Tobin, L.M., Healy, M.E., English, K., Mahon, B.P., 2013. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 172, 333-348.

Tung, J.T., Arnold, C.E., Alexander, L.H., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Richardson, D.W., Caron, J.P., 2002a. Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *American journal of veterinary research* 63, 987-993.

Tung, J.T., Venta, P.J., Caron, J.P., 2002b. Inducible nitric oxide expression in equine articular chondrocytes: effects of antiinflammatory compounds. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 5-12.

van Buul, G.M., Villafuertes, E., Bos, P.K., Waarsing, J.H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J.A., Bernsen, M.R., van Osch, G.J., 2012. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20, 1186-1196.

Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., Shi, S., 2013. IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 1383-1395.

Wilke, M.M., Nydam, D.V., Nixon, A.J., 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25.

Wink, D.A., Hines, H.B., Cheng, R.Y., Switzer, C.H., Flores-Santana, W., Vitek, M.P., Ridnour, L.A., Colton, C.A., 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of leukocyte biology* 89, 873-891.

DISCUSIÓN GENERAL

A continuación, y antes de finalizar con las Conclusiones, se procederá a realizar una breve discusión en conjunto de los cinco Manuscritos presentados en esta Tesis Doctoral por compendio de publicaciones.

Las MSCs tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de patologías articulares como la OA. Se ha propuesto que este potencial se basa principalmente en sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, mediante las cuales podrían ser capaces de regular el ambiente inflamatorio y catabólico presente en la articulación patológica (Barry y Murphy, 2013). Dichas propiedades de las MSCs son inducidas por estímulos inflamatorios (Cuerquis et al., 2014), como podrían ser los presentes en el ambiente de la articulación inflamada. Se ha observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las MSCs son capaces de regular el ambiente articular catabólico con mayor eficacia cuando los tejidos articulares secretan altas concentraciones de mediadores proinflamatorios (Manferdini et al., 2013; Schelbergen et al., 2014). Sin embargo, el ambiente inflamatorio con el que se encuentran las MSCs cuando son administradas en la articulación puede ser muy variable incluso dentro del mismo tipo de patología (Leijs et al., 2012), lo que podría traducirse en que la activación de las células fuera insuficiente, tal y como muestran los resultados recogidos en el Manuscrito I de la presente Tesis Doctoral.

Por ello, se ha propuesto como estrategia terapéutica la estimulación *ex vivo*, previa a la administración *in vivo* de las MSCs, utilizando concentraciones concretas de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IFN γ (Cuerquis et al., 2014), las cuales han mostrado un efecto sinérgico en la inducción de las propiedades inmunorreguladoras de las MSCs (Zimmermann y McDevitt, 2014). En consecuencia, con base en los trabajos publicados en otras especies, se testó el efecto de dos concentraciones diferentes de TNF α e IFN γ (20ng/ml y 50ng/ml) (Ren et al., 2008; van Buul et al., 2012) durante 72h (Paterson et al., 2014). Los resultados de estos ensayos, recogidos también en el Manuscrito I, mostraron una inducción similar del perfil inmunorregulador de las MSCs equinas tras la exposición a ambas concentraciones de citoquinas.

Sin embargo, la exposición a mediadores proinflamatorios también puede acarrear efectos no deseables sobre las MSCs, tales como una disminución en la viabilidad de las células (Liu et al., 2011), interferencia con su capacidad de diferenciación (Lacey et al., 2009) o un aumento en la expresión de marcadores inmunogénicos (Chan et al., 2008), con posibles repercusiones para la supervivencia y acción terapéutica de las MSCs cuando son administradas *in vivo* (Ankrum et al., 2014). Por ello, el efecto de los estímulos inflamatorios testados fue también estudiado sobre estas propiedades de las MSCs equinas. La exposición a líquido sinovial inflamatorio no indujo la expresión de marcadores inmunogénicos, mientras que las dos dosis de citoquinas testadas sí incrementaron la expresión de MHC-I y MHC-II, aunque no de las moléculas coestimuladoras (Manuscrito I). Por otra parte, el líquido sinovial inflamatorio no afectó a la viabilidad y capacidad de diferenciación tri-linaje de las MSCs equinas, mientras que estas propiedades se vieron negativamente influenciadas por la exposición a ambas concentraciones de citoquinas (Manuscrito II). En vista de los resultados recogidos en estos Manuscritos, se llegó a la conclusión de que el ambiente inflamatorio de la

articulación patológica podía ser bien tolerado por las MSCs, pero podría ser insuficiente para inducir su potencial inmunorregulador. Por el contrario, la estimulación de las MSCs con TNF α e IFN γ a las dosis testadas mostró capacidad para inducir este perfil en las MSCs, pero el impacto negativo sobre la viabilidad, plasticidad y potencial aumento de inmunogenicidad de las mismas reveló que estas condiciones de estimulación no eran aptas para su aplicación como estrategia terapéutica.

Por ello, se investigó el efecto de concentraciones más bajas de estas citoquinas y de tiempos de exposición más cortos sobre las mismas propiedades de las MSCs y, tras probar distintas condiciones, se encontró que la exposición a 5ng/ml de TNF α e IFN γ durante 12 horas era capaz de inducir el perfil inmunomodulador de las MSCs equinas sin detrimento de su viabilidad y plasticidad. Por otra parte, estas condiciones indujeron la expresión de MHC-II y de CD40, pero no de MHC-I ni del resto de moléculas coestimuladoras estudiadas, necesarias para el reconocimiento inmunológico. Como se recoge en el Manuscrito III, de los datos obtenidos en este ensayo se concluyó que estas condiciones de estimulación de las MSCs podían ser apropiadas para tratar de aumentar su potencial terapéutico *in vivo*.

Es por ello que se procedió a llevar a cabo la siguiente fase de la investigación recogida en la presente Tesis Doctoral: el estudio del efecto *in vivo* en articulaciones patológicas de MSCs estimuladas con las condiciones previamente descritas en el Manuscrito III. Para llevar a cabo este ensayo, fue necesario contar con un modelo experimental de OA en caballo y llevar a cabo una correcta monitorización del tratamiento. Por el papel central que juega la inflamación en la OA (Berenbaum, 2013) y por los efectos beneficiosos de las MSCs en la articulación atribuidos a sus propiedades antiinflamatorias y reguladoras (Barry y Murphy, 2013), realizar un buen seguimiento de la inflamación articular durante el estudio fue imprescindible. Es por ello que, además de estudiar diversos parámetros clínicos y en líquido sinovial, nos interesamos por el potencial uso de la proteína de fase aguda haptoglobina como marcador inflamatorio a nivel sistémico y local. Las proteínas de fase aguda, principalmente el Amiloide sérico A (SAA), se han estudiado en el caballo como marcadores inflamatorios tanto en suero como en otros fluidos corporales como el líquido sinovial (Jacobsen y Andersen, 2007; Canisso et al., 2014; Pihl et al., 2013). Sin embargo, la haptoglobina no había sido estudiada en el líquido sinovial inflamatorio y su uso podría aportar ventajas puesto que, pese a que su aumento es más moderado que el del SAA, permanece incrementada durante más tiempo en el caballo (Taira et al., 1992). El estudio recogido en el Manuscrito IV muestra, en el modelo equino de OA utilizado en nuestro ensayo *in vivo*, un aumento significativo y prolongado de la haptoglobina tanto en suero como en líquido sinovial. Este trabajo ha sido el primero en el que se describe el nivel de haptoglobina en el líquido sinovial inflamatorio equino y aporta datos preliminares para continuar con su estudio, sugiriendo los resultados obtenidos que esta proteína de fase aguda podría ser potencialmente utilizada como marcador inflamatorio en patologías articulares equinas.

En el Manuscrito V, el estudio *in vivo* utilizando administraciones repetidas de un pool alogénico de MSCs, tanto estimuladas como sin estimular con las condiciones definidas en el Manuscrito III, mostró el uso potencial de la activación *ex vivo* de las MSCs equinas como estrategia terapéutica en patologías articulares. Estudios similares en otras especies habían mostrado recientemente un mayor potencial antiinflamatorio y regulador de las MSCs

estimuladas (Saulnier et al., 2015; Maumus et al., 2016;), pero éste es el primer estudio testando sus efectos en un modelo equino. El uso de MSCs, ya fueran estimuladas o no, mostró efectos beneficiosos en la articulación, los cuales fueron más evidentes a corto plazo. Otros estudios han revelado también mayores efectos de las MSCs a corto plazo (Wilke et al., 2007; Duijvestein et al., 2011), posiblemente debido a que el tiempo de supervivencia de las MSCs *in vivo* es limitado, especialmente el de las alogénicas (Sivanathan et al., 2014).

El incremento en la expresión de marcadores inmunogénicos por la exposición a citoquinas proinflamatorias puede tener implicaciones en la inmunogenicidad de las MSCs alogénicas. Por otra parte, esta misma exposición inflamatoria les confiere un aumento en su potencial inmunosupresor, lo que podría facilitar la evasión del sistema inmune del receptor por parte de las MSCs alogénicas (Ankrum et al., 2014). Sin embargo, se ha descrito en el caballo la producción de anticuerpos funcionales alo-específicos frente a MSCs alogénicas incompatibles para el ELA (Berglund y Schnabel, 2016), lo que podría influir en el reconocimiento inmunológico de las células a largo plazo y limitar el uso de administraciones repetidas. En nuestro estudio, se observó una reacción inflamatoria ligera y transitoria en las 24 horas siguientes a la segunda administración de MSCs estimuladas, sugiriendo que la activación de las MSCs podría aumentar su inmunogenicidad y generar una respuesta inmune humoral. Pese a que esta reacción fue leve y se resolvió de forma rápida sin requerir tratamiento, la inmunogenicidad de las MSCs debe ser tenida en cuenta cuando se utilizan de forma alogénica, ya que puede condicionar la supervivencia de las mismas y por lo tanto su efectividad (Consentius et al., 2015).

En conclusión, la administración de MSCs alogénicas mostró efectos beneficiosos en la articulación, principalmente a corto plazo. Pese a que no se encontraron diferencias muy marcadas entre el uso de MSCs estimuladas o sin estimular, las MSCs estimuladas mostraron un mayor efecto antiinflamatorio y regulador en vista de la modificación en el perfil de expresión génica de los tejidos articulares. Las implicaciones de la inmunogenicidad de las MSCs, especialmente de las estimuladas, deben continuar siendo investigadas para un uso seguro y eficaz de la terapia celular alogénica.

V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



CONCLUSIONES

En las condiciones de nuestro estudio y con base en los resultados obtenidos, pueden establecerse las siguientes conclusiones:

1. El estímulo ejercido por el líquido sinovial inflamatorio no es suficiente para estimular el perfil inmunorregulador de las BM-MSCs equinas *in vitro*.

2. La exposición *in vitro* de las BM-MSCs equinas a dosis elevadas de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ induce la expresión de moléculas relacionadas con los mecanismos paracrinos y de contacto directo implicados en las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs.

3. La exposición *in vitro* de las BM-MSCs equinas a dosis elevadas de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IFN γ conlleva además efectos no deseables sobre las células como son la disminución en su viabilidad y plasticidad, y la inducción de la expresión de marcadores inmunogénicos.

4. La estimulación *in vitro* de las BM-MSCs equinas con concentraciones más bajas de TNF α e IFN γ y durante tiempos de exposición más cortos activa el perfil inmunorregulador de estas células sin afectar a su viabilidad y plasticidad ni aumentar su inmunogenicidad.

5. Las conclusiones anteriores conducen al planteamiento de que la estimulación de las BM-MSCs equinas mediante dosis adecuadas de citoquinas proinflamatorias, previa a su administración *in vivo*, podría ser utilizada como estrategia para incrementar su potencial terapéutico.

6. La proteína de fase aguda haptoglobina es un potencial marcador inflamatorio en suero y líquido sinovial en el caballo, pudiendo ser utilizada para monitorizar la inflamación en la osteoartritis equina.

7. La administración intraarticular de dosis repetidas de BM-MSCs alogénicas presenta potencial terapéutico en el tratamiento de la osteoartritis equina, principalmente a corto plazo.

8. La respuesta inflamatoria ligera y transitoria observada tras la segunda inyección de BM-MSCs alogénicas activadas con TNF α e IFN γ podría ser indicativa de un aumento en la inmunogenicidad de las células.

9. Pese a la leve reacción expuesta en la conclusión anterior, la estimulación previa a su administración con TNF α e IFN γ de las BM-MSCs equinas aumenta el efecto antiinflamatorio y regulador de estas células sobre el ambiente catabólico de la articulación osteoartítica

Conclusión general

Las conclusiones obtenidas en la presente Tesis Doctoral contribuyen a comprender mejor el efecto de la inflamación sobre el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las BM-MSCs equinas y sus posibles implicaciones terapéuticas, cuya investigación es clave para avanzar hacia la consecución de terapias celulares alogénicas seguras y más eficaces.

CONCLUSIONS

Under the experimental conditions of this research and based on the results obtained, the following conclusions can be drawn:

1. The stimulus exerted by inflammatory synovial fluid is insufficient for inducing the immunoregulatory profile of equine BM-MSCs *in vitro*.

2. The *in vitro* exposure of equine BM-MSCs to high concentrations of the proinflammatory cytokines TNF α and IFN γ induces the expression of molecules related to paracrine and cell contact mechanisms implied in the MSC immunomodulatory properties.

3. The *in vitro* exposure of equine BM-MSCs to high concentrations of the proinflammatory cytokines TNF α and IFN γ also involves deleterious effects on these cells, such as a decrease in their viability and differentiation potential and the induction of immunogenic markers expression.

4. The *in vitro* stimulation of equine BM-MSCs with lower concentrations of TNF α and IFN γ during shorter times of exposure activates the immunoregulatory profile of these cells while preserving their viability and differentiation potential and with no sharp rise in immunogenic markers expression.

5. The previous conclusions lead to consider the stimulation of equine BM-MSCs with appropriate inflammatory conditions prior to their *in vivo* administration as a strategy to improve their therapeutic potential.

6. The acute phase protein haptoglobin is a potential inflammatory marker in both serum and synovial fluid in the horse and could be used to monitor the inflammation in the equine osteoarthritis.

7. The repeat intraarticular administration of allogeneic equine BM-MSCs shows therapeutic potential for treating osteoarthritis, which is mainly found at short term.

8. The slight and transient inflammatory response observed after the second injection of allogeneic BM-MSCs previously stimulated by TNF α and IFN γ could be indicative of an increase in the immunogenicity of these cells.

9. Despite the slight reaction commented above, the stimulation of equine BM-MSCs with TNF α and IFN γ prior to their administration increases their anti-inflammatory and regulatory effects on the catabolic environment of the osteoarthritic joint.

General conclusion

The conclusions obtained in this Doctoral Thesis contribute to better understand the effect of inflammation on the immunomodulation-immunogenicity balance in equine BM-MSCs and the potentially associated therapeutic implications, which investigation is key in progressing towards safe and more effective allogeneic cell therapies.

VI. ANEXOS



ANEXO 1: Renuncia de los coautores no doctores a la inclusión en otra tesis doctoral de los trabajos incluidos en la presente Tesis.




Escuela de Doctorado
Universidad Zaragoza

RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Soler Baigorri	Nombre: Lourdes	
DNI/Pasaporte/NIE: 78749755D	Teléfono 645207301	Correo electrónico lourdes.soler.baigorri@gmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de patologías articulares equinas: capacidad inmunomoduladora in vitro e in vivo de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) en un modelo de artritis inducida
Autor: LAURA BARRACHINA POCAR
Programa de doctorado: CIENCIAS BIOMÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of aseptic arthritis
Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Soler, Lourdes; García, Natalia; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Vitoria, Arantza; Álava, María Ángeles; Lamprave, Fermín; Rodellar, Clementina
Veterinary Immunology and Immunopathology. 2016, 182, 74–78, doi: 10.1016/j.vetimm.2016.10.005

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Zaragoza, 9/03/2016
Firma: 

ANEXO 2: Factor de impacto y áreas temáticas de las revistas en las que se encuentra publicado el trabajo realizado

1. VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ISSN 0165-2427

Artículos:

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties.** *Veterinary immunology and immunopathology*. 171, pp. 57-65. 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.007

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Soler, Lourdes; García, Natalia; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Vitoria, Arantza; Álava, María Ángeles; Lampreave, Fermín; Rodellar, Clementina. **Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis.** *Veterinary immunology and immunopathology*. 182, pp. 74-78. 2016. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.10.005

Factor de impacto JCR

- 2015: **1,664**
- 5 años: **1,681**

Áreas temáticas

- Veterinary Sciences (Q1), Immunology

2. JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE, ISSN 1229-845X

Artículo:

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Ranera, Beatriz; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implication in intra-articular treatments.** *Journal of veterinary science*. 18 (1), pp. 39-49. 2017 DOI:10.4142/jvs.2017.18.1.1

Factor de impacto JCR

- 2015: **1,076**
- 5 años: **1,197**

Áreas temáticas

- Veterinary Sciences (Q2)

3. STEM CELLS AND DEVELOPMENT, ISSN 1547-3287

Artículo:

Barrachina, Laura; Remacha, Ana Rosa; Romero, Antonio; Vázquez, Francisco José; Albareda, Jorge; Prades, Marta; Gosálvez, Jaime; Roy, Rosa; Zaragoza, Pilar; Martín-Burriel, Inmaculada; Rodellar, Clementina. **Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential.** *Stem cells and development*. 26 (1), pp. 15-24. 2017. DOI: 10.1089/scd.2016.0209

Factor de impacto JCR

- 2015: **3.777**
- 5 años: **3,978**

Áreas temáticas

- Medicine, Research & Experimental (Q1), Hematology, Cell & Tissue Engineering, Transplantation

ANEXO 3: Aportaciones del doctorando



**Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal**
Universidad Zaragoza



**Departamento de
Patología Animal**
Universidad Zaragoza

Doña Clementina Rodellar Penella, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, y Francisco José Vázquez Bringas, Profesor Asociado del Departamento de Patología Animal,

CERTIFICAN

Que D^a Laura Barrachina Porcar ha participado activamente en todos los trabajos incluidos en esta memoria como ejecutora principal, tanto la realización de las tareas clínicas y de laboratorio como la interpretación de los resultados.

Y para que conste, firmamos el presente certificado

En Zaragoza, a 20 de marzo de 2017

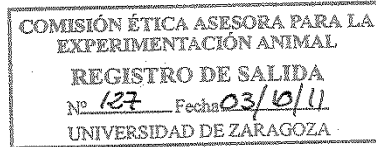
Fdo. Clementina Rodellar Penella

Fdo. Francisco José Vázquez Bringas

ANEXO 4: Informe de aprobación de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza



comisión ética asesora
para la experimentación animal
Universidad de Zaragoza



Ref. PI31/11

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título procedimiento de experimentación:

Inducción de artritis en caballos de experimentación y valoración de la acción antiinflamatoria de las MSCs heterólogas "in vivo"

Título del proyecto en el que se incluye:

Terapia celular en el tratamiento de la artritis inducida en caballos: capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria "in vitro" e "in vivo" de las MSCs de médula ósea

Investigador responsable en la U.Z.: Francisco José Vázquez Bringas

Duración: 6 meses

Fecha estimada de inicio del procedimiento: Diciembre, 2012

Animales que implica:

especie (s): Equina

peculiaridades: Pura raza o cruzados de razas de silla

número: 25

Fecha de presentación: 27 de julio de 2011

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal el día 21 de septiembre de 2011, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:

QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 1201/2005). Por todo ello, se emite **informe FAVORABLE**.

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de tres años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.

En Zaragoza, a 26 de septiembre de 2011

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacio Liesa

Comisión ética
asesora para la
experimentación animal
Universidad Zaragoza

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN

José Ramón Beltrán Blázquez

C/. Domingo Miral, s/n - 50009 Zaragoza · Teléfono (+34) 976 76 28 47 · Fax: (+34) 976 76 12 36

cea@unizar.es http://cea.unizar.es

ANEXO 5: Índice de Tablas

Tabla 1.- Tipos de articulaciones según sus características estructurales (tipo de conexión entre extremos óseos) y el grado de movilidad permitido con ejemplos en el caballo (pág. 11).

Tabla 2.- Tipos de articulaciones sinoviales en el caballo según las características de las superficies articulares, el tipo principal de medio de unión, los tipos de movimientos permitidos y ejemplos en esta especie (pág. 12).

Tabla 3.- Acciones más relevantes llevadas a cabo en la articulación por los principales mediadores proinflamatorios durante la fisiopatogenia de la osteoartritis (pág. 31).

Tabla 4.- Clasificación de las principales enzimas de degradación del cartílago que participan en la fisiopatogenia de la osteoartritis y su afinidad por los componentes de la matriz extracelular del cartílago (pág. 32).

Tabla 5.- Acciones más relevantes llevadas a cabo en la articulación por los principales mediadores antiinflamatorios durante la fisiopatogenia de la osteoartritis (pág. 33).

Tabla 6.- Acciones conocidas de los principales fármacos usados en el tratamiento de la osteoartritis equina (antiinflamatorios no esteroideos, cortico-esteroides intraarticulares, ácido hialurónico y SDMOADs), como SMOAD (fármaco modificador de los síntomas) o DMOAD (fármaco modificador de estructura) (pág. 38).

Tabla 7.- Acciones más relevantes llevadas a cabo por las células madre mesenquimales (MSCs) sobre los distintos tipos de células inmunes (pág. 59).

Tabla 8.- Cebadores empleados en los distintos estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. Se muestran el número de acceso de la secuencia génica a partir de la cual se diseñó cada pareja de cebadores, la secuencia de cada cebador y tamaño del amplicón generado. Los genes están agrupados según las funciones o la implicación de las moléculas que codifican (pág. 87-89).

Tabla 9.- Escala empleada para la valoración de las imágenes radiológicas tomadas a lo largo del estudio recogido en el Manuscrito V. Se incluyen 7 grados en total denominados de 0 a 7 (a mayor grado, mayor lesión) y la descripción de cada categoría. Adaptación de Mokbel et al., (2011) (pág. 95).

Tabla 10.- Información sobre los parámetros empleados en cada secuencia de MRI utilizada en la valoración *post-mortem* de las articulaciones en el Manuscrito V: plano sagital (lateral) o coronal (frontal), tiempo de eco (milisegundos), tiempo de repetición (milisegundos), ángulo de desviación (°), ancho del corte (milímetros) y separación entre cortes (milímetros) (pág. 96).

Tabla 11.- Escala empleada para la valoración de la anatomía patológica macroscópica de las articulaciones en el Manuscrito V. Se incluyen 5 grados en total denominados de 0 a 4 (a mayor grado, mayor lesión) y la descripción de cada categoría. La escala de valoración se adaptó a partir de la recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010) (pág.96).

Tabla 12.- Escala propuesta para la valoración de la histopatología del cartílago articular en el Manuscrito V. Se incluyen 5 grados denominados de 0 a 4 (a mayor grado, mayor lesión) para cada uno de los parámetros estudiados y la descripción de cada categoría. Las puntuaciones asignadas a cada parámetro se suman para obtener una puntuación global de la muestra de 0 a 16. La escala de valoración se ha adaptado a partir de la recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010) (pág. 98).

Tabla 13.- Escala propuesta para la valoración de la histopatología de la membrana sinovial en el Manuscrito V. Se incluyen 5 grados denominados de 0 a 4 (a mayor grado, mayor lesión) para cada uno

de los parámetros estudiados y la descripción de cada categoría. Las puntuaciones asignadas a cada parámetro se suman para obtener una puntuación global de la muestra de 0 a 20. La escala de valoración se ha adaptado a partir de la recomendada por la OARSI (McIlwraith et al., 2010) (pág. 98-99).

ANEXO 6: Índice de Figuras

Figura 1: Representación esquemática de una articulación sinovial mostrando sus principales estructuras: los extremos óseos, el cartílago articular, hueso subcondral subyacente, la cápsula articular y la membrana sinovial. Tomado de Van Weeren (2016a) (pág. 12).

Figura 2: Representación de la estructura en capas del cartílago articular, mostrando la capa superficial, la zona media y la zona profunda, con la *tidemark* separando la parte hialina del cartílago de la capa calcificada del mismo, que se encuentra inmediatamente por encima del hueso subcondral. Tomado de Van Weeren (2016a) (pág. 13).

Figura 3: Representación esquemática del complejo proteoglicano-ácido hialurónico. El proteoglicano representado es el agregano, formado por una proteína central a la que se unen distintos tipos de glicosaminoglicanos sulfatados, principalmente de tipo condroitín sulfato. La proteína central del agregano se une a la molécula de ácido hialurónico para formar complejos. Tomado de Camarero-Espinosa et al., (2016) (pág. 15).

Figura 4: Componentes óseos del carpo equino en vista frontal y medial (carpo derecho). La fila proximal del carpo está formada por los huesos carpales carpo cubital (CC), intermedio (IM), carpo radial (CR) y accesorio. La fila distal del carpo la conforman los huesos carpales segundo (II C), tercero (III C) y cuarto (IV C). El extremo distal del radio, las dos filas de huesos carpales y los extremos proximales de los metacarpianos (MC II, III y IV) conforman las distintas articulaciones del carpo. Imágenes para el montaje tomadas de <http://www.onlineveterinaryanatomy.net> (pág. 18).

Figura 5: Distensión sinovial evidente del carpo (A) y test de flexión del carpo (B) en pacientes del HV-UZ (pág. 19).

Figura 6: Realización de una artrocentesis de la articulación radio-carpal en el HV-UZ (pág. 20).

Figura 7: Radiografía frontal (A) y lateral (B) del carpo de un paciente del HV-UZ con signos radiológicos de osteoartritis: estrechamiento de la línea articular y remodelación ósea en los márgenes articulares con formación de osteofitos (pág. 20).

Figura 8: Imágenes de resonancia magnética obtenidas de los animales del estudio en las que se aprecia edema óseo en el hueso carpo-cubital (A, flecha) y considerable efusión sinovial en la articulación radio-carpal (flechas negras) con engrosamiento de la cápsula articular (flecha blanca) (B) (pág. 21).

Figura 9: Imagen ecográfica trasversal de una articulación radio-carpal con osteoartritis en la que se aprecia engrosamiento de la cápsula articular, efusión sinovial e irregularidades en los bordes óseos de los huesos radio-carpal (RC) e intermedio (IM), tomada de uno de los animales del estudio (pág. 22).

Figura 10: Radiografía en la que se muestra una lesión de osteocondritis disecante en la articulación tarsocrural (A) e imagen artroscópica tomada durante la cirugía para retirar el *chip* articular (B) en un paciente del HV-UZ (pág. 23).

Figura 11: Radiografía en la que se muestra una lesión quística del hueso subcondral (QOSC) en el extremo distal de la tibia en un paciente del HV-UZ (pág. 24).

Figura 12: Lavado articular mediante artrocentesis múltiple de las articulaciones metacarpo-falangiana e interfalangiana proximal tras una herida que alcanzó a estas estructuras en un paciente del HV-UZ (pág. 25).

Figura 13: Sinovitis en la articulación del menudillo como ejemplo de artritis traumática tipo I (A) e imagen radiológica de la fractura de un hueso sesamoideo proximal afectando a la articulación como ejemplo de artritis traumática tipo II (B) en pacientes del HV-UZ (pág. 26).

Figura 14: Ilustración esquemática de la compleja interacción entre diversos mediadores que tiene lugar durante la fisiopatogenia de la osteoartritis y los efectos derivados de este proceso sobre las estructuras articulares. Tomado de Sellam y Berenbaum, (2010) (pág. 34).

Figura 15: Aspecto externo (izquierda) e imagen radiológica correspondiente (derecha) de una osteoartritis de las articulaciones distales del tarso (esparaván) (A) y de una articulación interfalangiana proximal con osteoartritis (sobrepie) (B) (pág. 35).

Figura 16: Imagen radiológica tras la realización de una artrodesis quirúrgica mediante tornillos en la articulación interfalangiana proximal en un paciente del HV-UZ (A). Imagen artroscópica tras realizar la técnica de microfractura en un defecto condral del cóndilo medial del fémur. Tomada de McIlwraith et al. (2011) (B) (pág. 42).

Figura 17: Aplicación de ondas de choque extra-corporales en un caso de osteoartritis de la articulación interfalangiana proximal en el HV-UZ (pág. 43).

Figura 18: Representación esquemática de la jerarquía de las células madre según su capacidad de diferenciación y su origen. Tomado de Hayes et al., (2012) (pág. 46).

Figura 19: Representación esquemática del potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs). Además de su capacidad para diferenciarse a los linajes oteogénico, adipogénico y condrogénico, las MSCs son capaces de dar lugar a células de linajes derivados de otras capas embrionarias. Tomado de Golpanian et al., (2016) (pág. 49).

Figura 20: Representación esquemática de las diferentes acciones que pueden ejercer las células madre mesenquimales (MSCs) mediante la secreción paracrina de diversas moléculas. Tomado de da Silva Meirelles et al., (2006) (pág. 52).

Figura 21: Representación esquemática de las principales funciones ejercidas por las células madre mesenquimales (MSCs) sobre los distintos tipos de células inmunes. Tomado de Yi y Song, (2012) (pág. 62).

Figura 22: Representación de la respuesta de las células madre mesenquimales (MSCs) a distintos estímulos inflamatorios inductores de su capacidad inmunorreguladora. Tomado de Shi et al., (2012) (pág. 64).

Figura 23: Las células madre mesenquimales (MSCs) tienen potencial para evadir al sistema inmune del receptor mediante la activación de sus propiedades inmunosupresoras por citoquinas proinflamatorias, pese a que éstas también inducen la expresión del MHC (a). El balance entre la expresión de factores inmunogénicos e inmunosupresivos determina el reconocimiento de las MSCs por el sistema inmune (b). Tomado de Ankrum et al., (2014) (pág. 68).

Figura 24: Paciente equino con osteoartritis temprana en las articulaciones distales del tarso recibiendo tratamiento intraarticular con células madre mesenquimales equinas en el HV-UZ (pág. 75).

Figura 25: Esquema que muestra la relación entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos recogidos en los cinco Manuscritos que conforman la presente Tesis Doctoral, así como la metodología empleada en cada uno de ellos (pág. 105).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Abumaree, M.H., Al Jumah, M.A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F.M., Fatani, A.S., Chamley, L.W., Knawy, B.A., 2013. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Reviews* 9, 620-641.
2. Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
3. Aigner, T., Cook, J.L., Gerwin, N., Glasson, S.S., Lavery, S., Little, C.B., McIlwraith, W., Kraus, V.B., 2010. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 Suppl 3, S2-6.
4. Akiyama, H., Kim, J.E., Nakashima, K., Balmes, G., Iwai, N., Deng, J.M., Zhang, Z., Martin, J.F., Behringer, R.R., Nakamura, T., de Crombrughe, B., 2005. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14665-14670.
5. Alison, M.R., Vig, P., Russo, F., Bigger, B.W., Amofah, E., Themis, M., Forbes, S., 2004. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Proliferation* 37, 1-21.
6. Ankrum, J.A., Ong, J.F., Karp, J.M., 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology* 32, 252-260.
7. Anónimo, 2005. Cellular Tissue and Gene Therapies Advisory Commite. Cellular products for joint surface repair. FDA Center for Biologics Evaluation and Research March 3-4.
8. Anónimo, 2010. The orthopaedic industry annual report, 2009-2010. Orthoworld.
9. Ardanaz, N., Vazquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC veterinary research* 12, 65.
10. Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwaßer, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., Brulport, M., Hengstler, J.G., Dollinger, M.M., Fleig, W.E., Christ, B., 2009. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58, 570-581.
11. Avior, Y., Sagi, I., Benvenisty, N., 2016. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 17, 170-182.
12. Badillo, A.T., Beggs, K.J., Javazon, E.H., Tebbets, J.C., Flake, A.W., 2007. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 13, 412-422.

13. Barberini, D.J., Freitas, N.P., Magnoni, M.S., Maia, L., Listoni, A.J., Heckler, M.C., Sudano, M.J., Golim, M.A., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Amorim, R.M., 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research and Therapy* 5, 25.
14. Barcena, P., Lopez-Fernandez, C., Garcia-Ochoa, C., Obradors, A., Vernaev, V., Gosalvez, J., Vassena, R., 2015. Detection of DNA damage in cumulus cells using a chromatin dispersion assay. *Systems biology in reproductive medicine* 61, 277-285.
15. Baron, F., Lechanteur, C., Willems, E., Bruck, F., Baudoux, E., Seidel, L., Vanbellinghen, J.F., Hafraoui, K., Lejeune, M., Gothot, A., Fillet, G., Beguin, Y., 2010. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 16, 838-847.
16. Barry, F., Murphy, M., 2013. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nature Reviews Rheumatology* 9, 584-594.
17. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R., 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 30, 42-48.
18. Barussi, F.C., Bastos, F.Z., Leite, L.M., Fragoso, F.Y., Senegaglia, A.C., Brofman, P.R., Nishiyama, A., Pimpao, C.T., Michelotto, P.V., Jr., 2016. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respiratory physiology & neurobiology* 232, 35-42.
19. Beattie, G.M., Otonkoski, T., Lopez, A.D., Hayek, A., 1997. Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? *Diabetes* 46, 244-248.
20. Becerra, P., Valdes Vazquez, M.A., Dudhia, J., Fiske-Jackson, A.R., Neves, F., Hartman, N.G., Smith, R.K., 2013. Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31, 1096-1102.
21. Beluche, L.A., Bertone, A.L., Anderson, D.E., Rohde, C., 2001. Effects of oral administration of phenylbutazone to horses on in vitro articular cartilage metabolism. *American journal of veterinary research* 62, 1916-1921.
22. Berenbaum, F., 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 21, 16-21.

23. Berglund, A.K., Schnabel, L.V., 2016. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. *Equine veterinary journal*.
24. Berman, D.M., Willman, M.A., Han, D., Kleiner, G., Kenyon, N.M., Cabrera, O., Karl, J.A., Wiseman, R.W., O'Connor, D.H., Bartholomew, A.M., Kenyon, N.S., 2010. Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes* 59, 2558-2568.
25. Bertone, A.L., 2011. Noninfectious Arthritis en *Diagnosis and management of lameness in the horse* (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St.Louis, EE.UU.
26. Bertone, A.L., Palmer, J.L., Jones, J., 2001. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. *Veterinary Surgery* 30, 528-538.
27. Blanc, K., Mougiakakos, D., 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature reviews Immunology* 12.
28. Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., Fuchs, E., 2004. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118, 635-648.
29. Boado, A., López-Sanromán, F.J., 2016. Prevalence and characteristics of osteochondrosis in 309 Spanish Purebred horses. *The Veterinary Journal* 207, 112-117.
30. Bonfield, T.L., Nolan Koloze, M.T., Lennon, D.P., Caplan, A.I., 2010. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *Journal of inflammation (London, England)* 7, 51.
31. Bongso, A., Eng, H.L., 2011. *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources* en *Stem Cells: From Bench to Bedside* (2ª Edición) Bongso, A.; Eng, H.L. Editorial World Scientific, 5 Toh Tuck Link, Singapur.
32. Bonnet, C.S., Walsh, D.A., 2005. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology* 44, 7-16.
33. Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., Noel, D., 2010. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS one* 5, e14247.
34. Broeckx, S., Suls, M., Beerts, C., Vandenberghe, A., Seys, B., Wuertz-Kozak, K., Duchateau, L., Spaas, J.H., 2014a. Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Current stem cell research & therapy* 9, 497-503.
35. Broeckx, S., Zimmerman, M., Crocetti, S., Suls, M., Marien, T., Ferguson, S.J., Chiers, K., Duchateau, L., Franco-Obregon, A., Wuertz, K., Spaas, J.H., 2014b. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *PLoS one* 9, e85917.

36. Brossi, P.M., Moreira, J.J., Machado, T.S., Baccarin, R.Y., 2015. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC veterinary research* 11, 98.
37. Buckwalter, J.A., Brown, T.D., 2004. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*, 7-16.
38. Buff, P.R., Dodds, A.C., Morrison, C.D., Whitley, N.C., McFadin, E.L., Daniel, J.A., Djiane, J., Keisler, D.H., 2002. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *Journal of animal science* 80, 2942-2948.
39. Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszyc, C., Brehm, W., 2013. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *The Veterinary Journal* 195, 98-106.
40. Burr, D.B., 1998. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. *Current opinion in rheumatology* 10, 256-262.
41. Cadby, J.A., David, F., van de Lest, C., Bosch, G., van Weeren, P.R., Snedeker, J.G., van Schie, H.T., 2013. Further characterisation of an experimental model of tendinopathy in the horse. *Equine veterinary journal* 45, 642-648.
42. Canisso, I.F., Ball, B.A., Cray, C., Williams, N.M., Scoggin, K.E., Davolli, G.M., Squires, E.L., Troedsson, M.H., 2014. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *American journal of reproductive immunology* 72, 376-385.
43. Carmalt, J.L., Bell, C.D., Panizzi, L., Wolker, R.R., Lanovaz, J.L., Bracamonte, J.L., Wilson, D.G., 2012. Alcohol-facilitated ankylosis of the distal intertarsal and tarsometatarsal joints in horses with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240, 199-204.
44. Carmona, J.U., Argüelles, D., Climent, F., Prades, M., 2007. Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. *Journal of Equine Veterinary Science* 27, 167-170.
45. Carmona, J.U., Argüelles, D., Deulofeu, R., Martínez-Puig, D., Prades, M., 2009. Effect of the administration of an oral hyaluronan formulation on clinical and biochemical parameters in young horses with osteochondrosis. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 22, 455-459.
46. Caron, J.P., 2005. Intra-articular injections for joint disease in horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 21, 559-573, v.

47. Caron, J.P., 2011. Osteoarthritis en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
48. Carrade, D.D., Borjesson, D.L., 2013. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative medicine* 63, 207-217.
49. Carrade, D.D., Lame, M.W., Kent, M.S., Clark, K.C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2012a. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell medicine* 4, 1-11.
50. Carrade, D.D., Lame, M.W., Kent, M.S., Clark, K.C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2012b. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells(). *Cell Medicine* 4, 1-11.
51. Carrade, D.D., Owens, S.D., Galuppo, L.D., Vidal, M.A., Ferraro, G.L., Librach, F., Buerchler, S., Friedman, M.S., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2011. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy* 13, 419-430.
52. Carrade Holt, D.D., Wood, J.A., Granick, J.L., Walker, N.J., Clark, K.C., Borjesson, D.L., 2014. Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. *Stem Cells and Development* 23, 1258-1265.
53. Caston, S., McClure, S., Beug, J., Kersh, K., Reinertson, E., Wang, C., 2013. Retrospective evaluation of facilitated pastern ankylosis using intra-articular ethanol injections: 34 cases (2006-2012). *Equine veterinary journal* 45, 442-447.
54. Castro-Manrreza, M.E., Montesinos, J.J., 2015. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research* 2015, 394917.
55. Climent, F., Carmona, J.U., Cuenca, R., Prades, M., 2007. Eosinophilic synovitis of the tarsocrural joint in a horse. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 20, 142-145.
56. Clutterbuck, A.L., Harris, P., Allaway, D., Mobasher, A., 2010. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *The Veterinary Journal* 183, 27-38.
57. Cokelaere, S., Malda, J., van Weeren, R., 2016. Cartilage defect repair in horses: Current strategies and recent developments in regenerative medicine of the equine joint with emphasis on the surgical approach. *The Veterinary Journal* 214, 61-71.
58. Colbath, A.C., Dow, S.W., Phillips, J.N., McIlwraith, C.W., Goodrich, L.R., 2017a. Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit Equivalent Immunomodulatory Properties In Vitro. *Stem Cells Dev.* [Epub ahead of print]

59. Colbath, A.C., Frisbie, D.D., Dow, S.W., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Goodrich, L.R., 2017b. Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopedic Disease. *Operative Techniques in Sports Medicine*.
60. Consentius, C., Reinke, P., Volk, H.D., 2015. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regenerative Medicine* 10, 305-315.
61. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., Uccelli, A., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372.
62. Cortez, M., Carmo, L.S., Rogero, M.M., Borelli, P., Fock, R.A., 2013. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation* 36, 379-386.
63. Cruz, A.M., 2011. Stem cell and cell regeneration: products and techniques, *Proceedings of the 2011 American College of Veterinary Surgeons (ACVS) Veterinary Symposium, Chicago, US*, pp. 533-539.
64. Cruz Villagran, C., Amelse, L., Neilsen, N., Dunlap, J., Dhar, M., 2014. Differentiation of equine mesenchymal stromal cells into cells of neural lineage: potential for clinical applications. *Stem cells international* 2014, 891518.
65. Cuerquis, J., Romieu-Mourez, R., Francois, M., Routy, J.P., Young, Y.K., Zhao, J., Eliopoulos, N., 2014. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy* 16, 191-202.
66. Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., Rameshwar, P., 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107, 4817-4824.
67. Chan, W.K., Lau, A.S., Li, J.C., Law, H.K., Lau, Y.L., Chan, G.C., 2008. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge. *Experimental hematology* 36, 1545-1555.
68. Chang, J.W., Hung, S.P., Wu, H.H., Wu, W.M., Yang, A.H., Tsai, H.L., Yang, L.Y., Lee, O.K., 2011. Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell transplantation* 20, 245-257.
69. Chen, C., Liang, J., Yao, G., Chen, H., Shi, B., Zhang, Z., Zhao, C., Zhang, H., Sun, L., 2017. Mesenchymal stem cells upregulate Treg cells via sHLA-G in SLE patients. *International immunopharmacology* 44, 234-241.
70. Chen, F.H., Tuan, R.S., 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy* 10, 223.

71. Chen, H., Min, X.H., Wang, Q.Y., Leung, F.W., Shi, L., Zhou, Y., Yu, T., Wang, C.M., An, G., Sha, W.H., Chen, Q.K., 2015. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF-alpha, IL-1beta and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Scientific reports* 5, 8718.
72. Chinnadurai, R., Copland, I.B., Patel, S.R., Galipeau, J., 2014. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. *Journal of immunology* 192, 1491-1501.
73. Cho, K.S., Park, H.K., Park, H.Y., Jung, J.S., Jeon, S.G., Kim, Y.K., Roh, H.J., 2009. IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 259-265.
74. Chou, C.H., Lee, C.H., Lu, L.S., Song, I.W., Chuang, H.P., Kuo, S.Y., Wu, J.Y., Chen, Y.T., Kraus, V.B., Wu, C.C., Lee, M.T., 2013. Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage* 21, 450-461.
75. Christensen, L., Camitz, L., Illigen, K.E., Hansen, M., Sarvaa, R., Conaghan, P.G., 2016. Synovial incorporation of polyacrylamide hydrogel after injection into normal and osteoarthritic animal joints. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 24, 1999-2002.
76. Christensen, L.H., Nielsen, J.B., Mouritsen, L., Sorensen, M., Lose, G., 2008. Tissue integration of polyacrylamide hydrogel: an experimental study of periurethral, perivesical, and mammary gland tissue in the pig. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* 34 Suppl 1, S68-77; discussion S77.
77. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119, 2204-2213.
78. da Silva Meirelles, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., Caplan, A.I., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factors Review* 20, 419-427.
79. Dahlgren, L.A., 2007. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 168-173.
80. De Filippis, L., Binda, E., 2012. Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult. *Stem cells translational medicine* 1, 298-308.
81. de Grauw, J.C., Visser-Meijer, M.C., Lashley, F., Meeus, P., van Weeren, P.R., 2016. Intra-articular treatment with triamcinolone compared with triamcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. *Equine veterinary journal* 48, 152-158.

82. De Schauwer, C., Goossens, K., Piepers, S., Hoogewijs, M.K., Govaere, J.L., Smits, K., Meyer, E., Van Soom, A., Van de Walle, G.R., 2014. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Research and Therapy* 5, 6.
83. de Sousa, E.B., Casado, P.L., Moura Neto, V., Duarte, M.E., Aguiar, D.P., 2014. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research and Therapy* 5, 112.
84. Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., Woessner, J.F., Jr., 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 84, 678-685.
85. Dechant, J.E., Baxter, G.M., Southwood, L.L., Crawford, W.H., Jackman, B.R., Stashak, T.S., Trotter, G.W., Hendrickson, D.A., 2003. Use of a three-drill-tract technique for arthrodesis of the distal tarsal joints in horses with distal tarsal osteoarthritis: 54 cases (1990-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 1800-1805.
86. Demircan, P.C., Sariboyaci, A.E., Unal, Z.S., Gacar, G., Subasi, C., Karaoz, E., 2011. Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* 13, 1205-1220.
87. Deraga, D., 2007. El caballo y el deporte. *Estudios del hombre* 23, 193-209.
88. Dhamodaran, K., Subramani, M., Ponnalagu, M., Shetty, R., Das, D., 2014. Ocular stem cells: a status update! *Stem Cell Research and Therapy* 5, 56.
89. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
90. Dighe, A.S., Yang, S., Madhu, V., Balian, G., Cui, Q., 2013. Interferon gamma and T cells inhibit osteogenesis induced by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31, 227-234.
91. Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., Broux, O., Chauveau, C., Devedjian, J.C., Hardouin, P., Magne, D., 2009. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 84, 499-504.
92. Djouad, F., Charbonnier, L.M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., Noel, D., 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 2025-2032.

93. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
94. Dowling, B.A., Dart, A.J., Matthews, S.M., 2004. Chemical arthrodesis of the distal tarsal joints using sodium monoiodoacetate in 104 horses. *Australian veterinary journal* 82, 38-42.
95. Duesterdieck-Zellmer, K.F., Moneta, L., Ott, J.F., Larson, M.K., Gorman, E.M., Hunter, B., Lohr, C.V., Payton, M.E., Morre, J.T., Maier, C.S., 2014. Effects of low and high dose intraarticular tiludronate on synovial fluid and clinical variables in healthy horses-a preliminary investigation. *PeerJ* 2, e534.
96. Duijvestein, M., Wildenberg, M.E., Welling, M.M., Hennink, S., Molendijk, I., van Zuylen, V.L., Bosse, T., Vos, A.C., de Jonge-Muller, E.S., Roelofs, H., van der Weerd, L., Verspaget, H.W., Fibbe, W.E., te Velde, A.A., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2011. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29, 1549-1558.
97. Dumond, H., Presle, N., Terlain, B., Mainard, D., Loeuille, D., Netter, P., Pottie, P., 2003. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 3118-3129.
98. Dunlop, R.H., Williams, D.J., 1996. *Veterinary medicine. An illustrated history* (1ª edición). Editorial Mosby, St. Louis, EE.UU.
99. Dyson, S., 2011. The distal phalanx and distal interphalangeal joint en *Diagnosis and management of lameness in the horse* (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
100. Dyson, S., Ross, M.W., 2011. The Tarsus en *Diagnosis and management of lameness in the horse* (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St.Louis, EE.UU.
101. Eaves, C.J., 2015. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125, 2605-2613.
102. El-Jawhari, J.J., El-Sherbiny, Y.M., Jones, E.A., McGonagle, D., 2014. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 107, 505-514.
103. Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R.J., 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunology Reviews* 229, 152-172.
104. Elsaid, K.A., Fleming, B.C., Oksendahl, H.L., Machan, J.T., Fadale, P.D., Hulstyn, M.J., Shalvoy, R., Jay, G.D., 2008. Decreased lubricin concentrations and markers of joint

- inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis and rheumatism* 58, 1707-1715.
- 105.English, K., Barry, F.P., Mahon, B.P., 2008. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters* 115, 50-58.
- 106.English, K., French, A., Wood, K.J., 2010. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell* 7, 431-442.
- 107.Evans, C.H., Gouze, J.N., Gouze, E., Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C., 2004. Osteoarthritis gene therapy. *Gene therapy* 11, 379-389.
- 108.Eyre, D.R., Wu, J.J., 1995. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *The Journal of rheumatology. Supplement* 43, 82-85.
- 109.Falomo, M.E., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., Zavan, B., 2015. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. *BioMed research international* 2015, 141485.
- 110.Fasslrunner, F., Wobus, M., Duryagina, R., Muller, K., Stopp, S., Wehner, R., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Schmitz, M., Bornhauser, M., 2012. Differential effects of mixed lymphocyte reaction supernatant on human mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* 40, 934-944.
- 111.Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E., Goodrich, L.R., 2014a. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Veterinary surgery : VS* 43, 255-265.
- 112.Ferris, R.A., Frisbie, D.D., McCue, P.M., 2014b. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 82, 36-42.
- 113.Ford, T.S., Ross, M.W., Orsini, P.G., 1989. A comparison of methods for proximal palmar metacarpal analgesia in horses. *Veterinary Surgery* 18, 146-150.
- 114.Francois, M., Copland, I.B., Yuan, S., Romieu-Mourez, R., Waller, E.K., Galipeau, J., 2012. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon-gamma licensing. *Cytotherapy* 14, 147-152.
- 115.Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3, 393-403.
- 116.Frisbie, D.D., 2016a. Hyaluronan en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE. UU.

117. Frisbie, D.D., 2016b. Synovial Fluid and Serum Biomarkers en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
118. Frisbie, D.D., Ghivizzani, S.C., Robbins, P.D., Evans, C.H., McIlwraith, C.W., 2002. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene therapy* 9, 12-20.
119. Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., Park, R.D., McIlwraith, C.W., 2007. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *American journal of veterinary research* 68.
120. Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M., McIlwraith, C.W., 2009. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 27, 1675-1680.
121. Frisbie, D.D., McCarthy, H.E., Archer, C.W., Barrett, M.F., McIlwraith, C.W., 2015. Evaluation of articular cartilage progenitor cells for the repair of articular defects in an equine model. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 97, 484-493.
122. Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., 2001. Gene therapy: future therapies in osteoarthritis. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 17, 233-243, vi.
123. Frisbie, D.D., Morisset, S., Ho, C.P., Rodkey, W.G., Steadman, J.R., McIlwraith, C.W., 2006. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *The American journal of sports medicine* 34, 1824-1831.
124. Frisbie, D.D., Sandler, E.A., Trotter, G.W., McIlwraith, C.W., 2000. Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1-conditioned equine cartilage. *American journal of veterinary research* 61, 436-441.
125. Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine* 340, 448-454.
126. Gang, E.J., Jeong, J.A., Hong, S.H., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., Kim, H., 2004. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 617-624.
127. Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.L., Tse, H.F., Fu, Q.L., Lian, Q., 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease* 7, e2062.
128. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., Noel, D., 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research and therapy* 1, 2.

129. Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Stein, G.S., Nanes, M.S., 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* 277, 2695-2701.
130. Gilbert, L.C., Rubin, J., Nanes, M.S., 2005. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism* 288, e1011-1018.
131. Godfrey, D.I., Stankovic, S., Baxter, A.G., 2010. Raising the NKT cell family. *Nature immunology* 11, 197-206.
132. Goldring, M.B., Goldring, S.R., 2010. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Abdominal aortic aneurysm: genetics, pathophysiology and molecular biology* 1192, 230-237.
133. Goldring, S.R., Goldring, M.B., 2004. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*.
134. Gomiero, C., Bertolutti, G., Martinello, T., Van Bruaene, N., Broeckx, S.Y., Patruno, M., Spaas, J.H., 2016. Tenogenic induction of equine mesenchymal stem cells by means of growth factors and low-level laser technology. *Veterinary Research Communications* 40, 39-48.
135. Gong, X., Sun, Z., Cui, D., Xu, X., Zhu, H., Wang, L., Qian, W., Han, X., 2014. Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells. *Cell biology international* 38, 405-411.
136. Gonzalez-Fernandez, M.L., Perez-Castrillo, S., Sanchez-Lazaro, J.A., Prieto-Fernandez, J.G., Lopez-Gonzalez, M.E., Lobato-Perez, S., Colaco, B.J., Olivera, E.R., Villar-Suarez, V., 2016. Assessment of regeneration in meniscal lesions by use of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *American journal of veterinary research* 77, 779-788.
137. Goodrich, L.R., Chen, A.C., Werpy, N.M., Williams, A.A., Kisiday, J.D., Su, A.W., Cory, E., Morley, P.S., McIlwraith, C.W., Sah, R.L., Chu, C.R., 2016. Addition of Mesenchymal Stem Cells to Autologous Platelet-Enhanced Fibrin Scaffolds in Chondral Defects: Does It Enhance Repair? *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 98, 23-34.
138. Goodrich, L.R., Nixon, A.J., 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *The Veterinary Journal* 171, 51-69.
139. Gough, M.R., Thibaud, D., Smith, R.K., 2010. Tiludronate infusion in the treatment of bone spavin: a double blind placebo-controlled trial. *Equine veterinary journal* 42, 381-387.

140. Guest, D.J., Smith, M.R., Allen, W.R., 2010. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine veterinary journal* 42.
141. Halper, J., Kim, B., Khan, A., Yoon, J.H., Mueller, P.O., 2006. Degenerative suspensory ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. *BMC veterinary research* 2, 12.
142. Ham, O., Lee, C.Y., Kim, R., Lee, J., Oh, S., Lee, M.Y., Kim, J., Hwang, K.C., Maeng, L.S., Chang, W., 2015. Therapeutic Potential of Differentiated Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 14961-14978.
143. Hatsushika, D., Muneta, T., Nakamura, T., Horie, M., Koga, H., Nakagawa, Y., Tsuji, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., Sekiya, I., 2014. Repetitive allogeneic intraarticular injections of synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration in a porcine massive meniscus defect model. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 941-950.
144. Haussler, K.K., King, M.R., 2016. *Physical Rehabilitation en Joint disease in the horse (2ª Edición)* McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
145. Heinegard, D., 2009. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *International journal of experimental pathology* 90, 575-586.
146. Hemphill, D.D., McIlwraith, C.W., Slayden, R.A., Samulski, R.J., Goodrich, L.R., 2016. Adeno-associated virus gene therapy vector scAAVIGF-I for transduction of equine articular chondrocytes and RNA-seq analysis. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 902-911.
147. Herthel, T.D., Rick, M.C., Judy, C.E., Cohen, N.D., Herthel, D.J., 2016. Retrospective analysis of factors associated with outcome of proximal interphalangeal joint arthrodesis in 82 horses including Warmblood and Thoroughbred sport horses and Quarter Horses (1992-2014). *Equine veterinary journal* 48, 557-564.
148. Hoogduijn, M.J., Popp, F., Verbeek, R., Masoodi, M., Nicolaou, A., Baan, C., Dahlke, M.H., 2010. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *International immunopharmacology* 10, 1496-1500.
149. Howard, R.D., McIlwraith, C.W., 1993. Sodium hyaluronate in the treatment of equine joint disease. *The Compendium on Continuing Education* 15, 473-483.
150. Hraha, T.H., Doremus, K.M., McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., 2011. Autologous conditioned serum: the comparative cytokine profiles of two commercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. *Equine veterinary journal* 43, 516-521.
151. Hulten, C., Gronlund, U., Hirvonen, J., Tulamo, R.M., Suominen, M.M., Marhaug, G., Forsberg, M., 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A

- (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine veterinary journal* 34, 699-704.
152. Hunziker, E.B., Lippuner, K., Keel, M.J., Shintani, N., 2015. An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 334-350.
153. Iqbal, J., Dudhia, J., Bird, J.L., Bayliss, M.T., 2000. Age-related effects of TGF-beta on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. *Biochemical and Biophysics Research Communications* 274, 467-471.
154. Jacobsen, S., Andersen, P.H., 2007. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* 19, 38-46.
155. Jacobsen, S., Niewold, T.A., Halling-Thomsen, M., Nanni, S., Olsen, E., Lindegaard, C., Andersen, P.H., 2006a. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 110, 325-330.
156. Jacobsen, S., Thomsen, M.H., Nanni, S., 2006b. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *American journal of veterinary research* 67, 1738-1742.
157. Jansson, N., 1996. Equine osteoarthritis: A review of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Pferdeheilkunde* 14, 151-154.
158. Jayasuriya, C.T., Chen, Q., 2015. Potential benefits and limitations of utilizing chondroprogenitors in cell-based cartilage therapy. *Connect Tissue Res* 56, 265-271.
159. Jiang, M.H., Li, G., Liu, J., Liu, L., Wu, B., Huang, W., He, W., Deng, C., Wang, D., Li, C., Lahn, B.T., Shi, C., Xiang, A.P., 2015. Nestin(+) kidney resident mesenchymal stem cells for the treatment of acute kidney ischemia injury. *Biomaterials* 50, 56-66.
160. Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D., Mao, N., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120-4126.
161. Kaneps, A.J., 2016. Practical Rehabilitation and Physical Therapy for the General Equine Practitioner. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 32, 167-180.
162. Kang, J.W., Kang, K.S., Koo, H.C., Park, J.R., Choi, E.W., Park, Y.H., 2008. Soluble factor-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 17, 681-693.
163. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.P., Fahmi, H., 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7, 33-42.

164. Kawcak, C.E., 2016. Biomechanics in Joints en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE. UU.
165. Kawcak, C.E., Barrett, M.F., 2016. Carpus en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
166. Kawcak, C.E., Frisbie, D.D., Werpy, N.M., Park, R.D., McIlwraith, C.W., 2008. Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, 1519-1525.
167. Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., Norrdin, R.W., Park, R.D., Steyn, P.S., 2000. Clinical effects of exercise on subchondral bone of carpal and metacarpophalangeal joints in horses. *American journal of veterinary research* 61, 1252-1258.
168. Kidd, J.A., Fuller, C., Barr, A.R.S., 2001. Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education* 13, 160-168.
169. Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., Marini, F.C., 2009. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 2614-2623.
170. Kim, H.S., Kim, K.H., Kim, S.H., Kim, Y.S., Koo, K.T., Kim, T.I., Seol, Y.J., Ku, Y., Rhyu, I.C., Chung, C.P., Lee, Y.M., 2010. Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. *Journal of periodontal & implant science* 40, 265-270.
171. Kim, N., Cho, S.G., 2013. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean journal of internal medicine* 28, 387-402.
172. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S.E., 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543-1549.
173. Koj, A., 1996. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et biophysica acta* 1317, 84-94.
174. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 386-398.
175. Kurtz, A., 2008. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *International journal of stem cells* 1, 1-7.
176. Kushner, I., 1993. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspectives in biology and medicine* 36, 611-622.

177. Lacey, D.C., Simmons, P.J., Graves, S.E., Hamilton, J.A., 2009. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage* 17, 735-742.
178. Lang, H.M., Panizzi, L., Allen, A.L., Woodbury, M.R., Barber, S.M., 2009. Comparison of three drilling techniques for carpometacarpal joint arthrodesis in horses. *Veterinary Surgery* 38, 990-997.
179. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O., 2003a. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31, 890-896.
180. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., Ringden, O., 2003b. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology* 57, 11-20.
181. Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology (Carlton, Vic.)* 16, 1027-1046.
182. Lee, H.Y., Han, L., Roughley, P.J., Grodzinsky, A.J., Ortiz, C., 2013. Age-related nanostructural and nanomechanical changes of individual human cartilage aggrecan monomers and their glycosaminoglycan side chains. *Journal of structural biology* 181, 264-273.
183. Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., Prockop, D.J., 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell* 5, 54-63.
184. Lee, S., Jeong, S., 2016. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Exocrine Pancreas Spontaneously Express Pancreas Progenitor-Cell Markers in a Cell-Passage-Dependent Manner. *Stem cells international* 2016, 2142646.
185. Leijts, M.J., van Buul, G.M., Lubberts, E., Bos, P.K., Verhaar, J.A., Hoogduijn, M.J., van Osch, G.J., 2012. Effect of Arthritic Synovial Fluids on the Expression of Immunomodulatory Factors by Mesenchymal Stem Cells: An Explorative in vitro Study. *Frontiers in immunology* 3, 231.
186. Li, H., Jasper, H., 2016. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Disease models & mechanisms* 9, 487-499.
187. Li, Q., Sun, W., Wang, X., Zhang, K., Xi, W., Gao, P., 2015a. Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Atherosclerosis via Modulating Macrophage Function. *Stem cells translational medicine* 4, 1294-1301.

- 188.Li, S., Huang, K.J., Wu, J.C., Hu, M.S., Sanyal, M., Hu, M., Longaker, M.T., Lorenz, H.P., 2015b. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: candidate cells responsible for healing critical-sized calvarial bone defects. *Stem cells translational medicine* 4, 359-368.
- 189.Li, T., Xia, M., Gao, Y., Chen, Y., Xu, Y., 2015c. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert opinion on biological therapy* 15, 1293-1306.
- 190.Liebich, H.G., König, H.E., 2005a. Articulaciones del miembro torácico en Anatomía de los animales domésticos: aparato locomotor (2ª Edición). Liebich H.G and König H.E. Editorial médica Panamericana, Madrid, España.
- 191.Liebich, H.G., König, H.E., 2005b. Artrología en Anatomía de los animales domésticos: aparato locomotor (2ª Edición). Liebich H.G. and König H.E. Editorial médica Panamericana, Madrid, España.
- 192.Liu, C.T., Yang, Y.J., Yin, F., Wang, X., Yu, X.H., Wang, Q.H., Wang, X.L., Xie, M., 2006a. The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. *Cell Immunology* 244, 19-32.
- 193.Liu, H., Kemeny, D.M., Heng, B.C., Ouyang, H.W., Melendez, A.J., Cao, T., 2006b. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *The Journal of Immunology* 176, 2864-2871.
- 194.Liu, K., Nussenzweig, M.C., 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunology Reviews* 234, 45-54.
- 195.Liu, X.J., Zhang, J.F., Sun, B., Peng, H.S., Kong, Q.F., Bai, S.S., Liu, Y.M., Wang, G.Y., Wang, J.H., Li, H.L., 2009. Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *Clinical and Experimental Immunology* 158, 37-44.
- 196.Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., Shi, S., 2011. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nature Medicine* 17, 1594-1601.
- 197.Loewille, D., Chary-Valckenaere, I., Champigneulle, J., Rat, A.C., Toussaint, F., Pinzano-Watrin, A., Goebel, J.C., Mainard, D., Blum, A., Pourel, J., Netter, P., Gillet, P., 2005. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis and rheumatism* 52, 3492-3501.
- 198.Lohan, P., Coleman, C.M., Murphy, J.M., Griffin, M.D., Ritter, T., Ryan, A.E., 2014. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned? *Stem Cell Research and Therapy* 5, 99.

199. Lojewski, X., Srimasorn, S., Rauh, J., Francke, S., Wobus, M., Taylor, V., Arauzo-Bravo, M.J., Hallmeyer-Elgner, S., Kirsch, M., Schwarz, S., Schwarz, J., Storch, A., Hermann, A., 2015. Perivascular Mesenchymal Stem Cells From the Adult Human Brain Harbor No Intrinsic Neuroectodermal but High Mesodermal Differentiation Potential. *Stem cells translational medicine* 4, 1223-1233.
200. Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y., 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation* 21, 216-225.
201. Madison, J.B., Scarratt, W.K., 1988. Immune-mediated polysynovitis in four foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192, 1581-1584.
202. Madison, J.B., Ziemer, E.L., 1993. Eosinophilic synovitis following the intra-articular injection of bacterial antigen in horses. *Research in veterinary science* 54, 256-258.
203. Mafi, R., Hindocha, S., Mafi, P., Griffin, M., Khan, W.S., 2011. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *The open orthopaedics journal* 5 Suppl 2, 242-248.
204. Magnusson, L., Ekman, S., 2001. Osteoarthritis of the Antebrachio-carpal Joint of 7 Riding Horses. *Acta veterinaria Scandinavica* 42, 429-434.
205. Mahaffey, E.A., 2002. *Synovial Fluid en Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse* (2ª Edición). Cowell R.L and Tyler R.D. Editorial Mosby, St. Louis, EE.UU.
206. Maldonado, M., Nam, J., 2013. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed research international* 2013, 284873.
207. Manferdini, C., Maumus, M., Gabusi, E., Piacentini, A., Filardo, G., Peyrafitte, J.A., Jorgensen, C., Bourin, P., Fleury-Cappellesso, S., Facchini, A., Noel, D., Lisignoli, G., 2013. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis and rheumatism* 65, 1271-1281.
208. Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6, 13.
209. Maumus, M., Manferdini, C., Toupet, K., Peyrafitte, J.A., Ferreira, R., Facchini, A., Gabusi, E., Bourin, P., Jorgensen, C., Lisignoli, G., Noel, D., 2013. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Research* 11, 834-844.
210. Maumus, M., Roussignol, G., Toupet, K., Penarier, G., Bentz, I., Teixeira, S., Oustric, D., Jung, M., Lepage, O., Steinberg, R., Jorgensen, C., Noel, D., 2016. Utility of a Mouse Model of Osteoarthritis to Demonstrate Cartilage Protection by IFN γ -Primed Equine Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Immunology* 7, 392.

211. McCarrel, T.M., Minas, T., Fortier, L.A., 2012. Optimization of Leukocyte Concentration in Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tendinopathy. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 94, e143.
212. McCarthy, H.E., Bara, J.J., Brakspear, K., Singhrao, S.K., Archer, C.W., 2012. The comparison of equine articular cartilage progenitor cells and bone marrow-derived stromal cells as potential cell sources for cartilage repair in the horse. *The Veterinary Journal* 192, 345-351.
213. McIlwraith, C.W., 2005. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine veterinary journal* 37, 473-482.
214. McIlwraith, C.W., 2010. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: what is known on a scientific basis? *Equine veterinary journal* 42, 563-571.
215. McIlwraith, C.W., 2011. Principles and Practices of Joint Disease Treatment en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
216. McIlwraith, C.W., 2013. Oral joint supplements in the management of osteoarthritis en Equine applied and clinical nutrition. Geor R.J., Harris P.A., Coenen M. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
217. McIlwraith, C.W., 2016a. Subchondral cystic lesions en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis.
218. McIlwraith, C.W., 2016b. Traumatic Arthritis and Posttraumatic Osteoarthritis in the Horse en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
219. McIlwraith, C.W., Billingham, R.C., Frisbie, D.D., 2001. Current and Future Diagnostic Means to Better Characterize Osteoarthritis in the Horse—Routine Synovial Fluid Analysis and Synovial Fluid and Serum Markers, Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Diego, EE.UU, pp. 171-179.
220. McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., 2012. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & joint research* 1, 297-309.
221. McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Fuller, C.J., Hurtig, M., Cruz, A., 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 Suppl 3, S93-105.
222. McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Rodkey, W.G., Kisiday, J.D., Werpy, N.M., Kawcak, C.E., Steadman, J.R., 2011. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 27, 1552-1561.

223. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., Dilloo, D., 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619-4621.
224. Menendez, M.I., Clark, D.J., Carlton, M., Flanigan, D.C., Jia, G., Sammet, S., Weisbrode, S.E., Knopp, M.V., Bertone, A.L., 2011. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model. *Osteoarthritis and Cartilage* 19, 1066-1075.
225. Mensing, N., Gasse, H., Hambruch, N., Haeger, J.-D., Pfarrer, C., Staszky, C., 2011. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC veterinary research* 7, 42.
226. Metsaranta, M., Kujala, U.M., Pelliniemi, L., Osterman, H., Aho, H., Vuorio, E., 1996. Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Matrix Biology* 15, 39-47.
227. Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., Troyer, D., Medicetty, S., 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21, 50-60.
228. Mobasher, A., Bay-Jensen, A.C., van Spil, W.E., Larkin, J., Levesque, M.C., 2017. Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage* 25, 199-208.
229. Mokbel, A.N., El Tookhy, O.S., Shamaa, A.A., Rashed, L.A., Sabry, D., El Sayed, A.M., 2011. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC musculoskeletal disorders* 12, 259.
230. Montzka, K., Fuhrmann, T., Muller-Ehmsen, J., Woltje, M., Brook, G.A., 2010. Growth factor and cytokine expression of human mesenchymal stromal cells is not altered in an in vitro model of tissue damage. *Cytotherapy* 12, 870-880.
231. Moreno, R., Martinez-Gonzalez, I., Rosal, M., Farwati, A., Gratacos, E., Aran, J.M., 2010. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the rabbit fetal liver. *Stem Cells Dev* 19, 1579-1588.
232. Mountziaris, P.M., Tzouanas, S.N., Mikos, A.G., 2010. Dose effect of tumor necrosis factor- α on in vitro osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds. *Biomaterials* 31, 1666-1675.
233. Mrugala, D., Bony, C., Neves, N., Caillot, L., Fabre, S., Moukoko, D., Jorgensen, C., Noel, D., 2008. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Annals of the rheumatic diseases* 67, 288-295.

234. Murakami, S., Lefebvre, V., de Crombrughe, B., 2000. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* 275, 3687-3692.
235. Murphy, J.M., Fink, D.J., Hunziker, E.B., Barry, F.P., 2003. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 3464-3474.
236. Nagy, A., Dyson, S., 2012. Magnetic resonance imaging findings in the carpus and proximal metacarpal region of 50 lame horses. *Equine veterinary journal* 44, 163-168.
237. Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., De Bruyn, C., Bron, D., Toungouz, M., Lagneaux, L., 2012. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem cell reviews* 8, 1188-1198.
238. Nanes, M.S., McKoy, W.M., Marx, S.J., 1989. Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* 124, 339-345.
239. Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., Francois, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.C., Thierry, D., Fouillard, L., 2007. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 84, 231-237.
240. Nasef, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Francois, S., Chapel, A., Thierry, D., Gorin, N.C., Fouillard, L., 2008. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunology* 253, 16-22.
241. Nauta, A.J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G., Willemze, R., Fibbe, W.E., 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114-2120.
242. Nejadnik, H., Hui, J.H., Feng Choong, E.P., Tai, B.C., Lee, E.H., 2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *The American journal of sports medicine* 38, 1110-1116.
243. Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R.A., Mezey, E., 2009. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 15, 42-49.
244. Nicpon, J., Marycz, K., Grzesiak, J., 2013. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Polish journal of veterinary sciences* 16, 753-754.
245. Ohgushi, H., Caplan, A.I., 1999. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *Journal of biomedical materials research* 48, 913-927.

- 246.Oke, S., 2009. Equine Osteoarthritis: The Economic Impact <http://www.thehorse.com/articles/24074/equine-osteoarthritis-the-economic-impact>
Fecha de consulta: 09/02/2017 Lexington, EE. UU.
- 247.OMS, 1993. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm> World Health Organization.
Fecha de consulta: 09/02/2017 Ginebra, Suiza.
- 248.Ortved, K., Wagner, B., Calcedo, R., Wilson, J., Schaefer, D., Nixon, A., 2015. Humoral and cell-mediated immune response, and growth factor synthesis after direct intraarticular injection of rAAV2-IGF-I and rAAV5-IGF-I in the equine middle carpal joint. *Human gene therapy* 26, 161-171.
- 249.Ortved, K.F., Nixon, A.J., Mohammed, H.O., Fortier, L.A., 2012. Treatment of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle of mature horses with growth factor enhanced chondrocyte grafts: a retrospective study of 49 cases. *Equine veterinary journal* 44, 606-613.
- 250.Osborne, A.C., Carter, S.D., May, S.A., Bennett, D., 1995. Anti-collagen antibodies and immune complexes in equine joint diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45, 19-30.
- 251.Owens, J.G., Kamerling, S.G., Barker, S.A., 1995. Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 18, 187-195.
- 252.Owens, J.G., Kamerling, S.G., Stanton, S.R., Keowen, M.L., Prescott-Mathews, J.S., 1996. Effects of pretreatment with ketoprofen and phenylbutazone on experimentally induced synovitis in horses. *American journal of veterinary research* 57, 866-874.
- 253.Owens, S.D., Kol, A., 2016. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem cells international* 2016, 5830103.
- 254.Paebst, F., Piehler, D., Brehm, W., Heller, S., Schroeck, C., Tarnok, A., Burk, J., 2014. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85, 678-687.
- 255.Palmer, J.L., Bertone, A.L., Malemud, C.J., Mansour, J., 1998. Changes in third carpal bone articular cartilage after synovectomy in normal and inflamed joints. *Veterinary Surgery* 27, 321-330.
- 256.Panizzi, L., Barber, S.M., Lang, H.M., Allen, A.L., Woodbury, M.R., 2011. Evaluation of a minimally invasive arthrodesis technique for the carpometacarpal joint in horses. *Veterinary Surgery* 40, 464-472.

- 257.Parekkadan, B., Tilles, A.W., Yarmush, M.L., 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 1913-1919.
- 258.Paterson, Y.Z., Rash, N., Garvican, E.R., Paillot, R., Guest, D.J., 2014. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. *Stem cell research and therapy* 5, 90.
- 259.Paulsson, M., Morgelin, M., Wiedemann, H., Beardmore-Gray, M., Dunham, D., Hardingham, T., Heinegard, D., Timpl, R., Engel, J., 1987. Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans. *Biochemical Journal* 245, 763-772.
- 260.Peloso, J.G., Mundy, G.D., Cohen, N.D., 1994. Prevalence of, and factors associated with, musculoskeletal racing injuries of thoroughbreds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204, 620-626.
- 261.Penraat, J.H., Allen, A.L., Fretz, P.B., Bailey, J.V., 2000. An evaluation of chemical arthrodesis of the proximal interphalangeal joint in the horse by using monoiodoacetate. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64, 212-221.
- 262.Peroni, J.F., Borjesson, D.L., 2011. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 27, 351-362.
- 263.Pers, Y.M., Ruiz, M., Noel, D., Jorgensen, C., 2015. Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 2027-2035.
- 264.Pezzanite, L.M., Fortier, L.A., Antczak, D.F., Cassano, J.M., Brosnahan, M.M., Miller, D., Schnabel, L.V., 2015. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem cell research and therapy* 6, 54.
- 265.Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013a. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology* 26, 453-460.
- 266.Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013b. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary immunology and immunopathology* 156, 99-106.
- 267.Pihl, T.H., Andersen, P.H., Kjelgaard-Hansen, M., Morck, N.B., Jacobsen, S., 2013. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology* 42, 177-183.

268. Poh, K.-K., Sperry, E., Young, R.G., Freyman, T., Barringhaus, K.G., Thompson, C.A., 2007. Repeated direct endomyocardial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells: Safety of a high dose, "off-the-shelf", cellular cardiomyoplasty strategy. *International Journal of Cardiology* 117, 360-364.
269. Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., Bartholomew, A., 2008. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European journal of immunology* 38, 1745-1755.
270. Poncelet, A.J., Vercruyse, J., Saliez, A., Gianello, P., 2007. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation* 83, 783-790.
271. Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., Domenech, J., 2007. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 1737-1745.
272. Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Laverty, S., Lockwood, S., Matyas, J., McDougall, J., Pritzker, K., Rudolphi, K., van den Berg, W., Yaksh, T., 2010. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 Suppl 3, S10-16.
273. Porter, M., 2005. Equine rehabilitation therapy for joint disease. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 21, 599-607, vi.
274. Prades, M., Carmona, J., 2009. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Compendium Equine: Continuing Education for Veterinarians* 4, 28-40.
275. Prockop, D.J., 1998. Marrow stromal cells as stem cells for continual renewal of nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* 30-31, 284-285.
276. Prockop, D.J., 2007. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clinical pharmacology and therapeutics* 82, 241-243.
277. Prockop, D.J., Oh, J.Y., 2012. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 14-20.
278. Qi, Y., Jiang, D., Sindrilaru, A., Stegemann, A., Schatz, S., Treiber, N., Rojewski, M., Schrezenmeier, H., Vander Beken, S., Wlaschek, M., Bohm, M., Seitz, A., Scholz, N., Durselen, L., Brinckmann, J., Ignatius, A., Scharffetter-Kochanek, K., 2014. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and

- reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *The Journal of investigative dermatology* 134, 526-537.
- 279.R.F.H.E, 2013. Estudio sobre el Impacto Económico del Sector del Caballo en España <http://www.rfhe.com/presentado-el-primer-estudio-del-impacto-economico-del-sector-ecuestre/> Real Federación Hípica Española. Fecha de consulta: 09/02/2017 Madrid, España.
- 280.Radtke, C.L., Nino-Fong, R., Esparza Gonzalez, B.P., Stryhn, H., McDuffee, L.A., 2013. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American journal of veterinary research* 74, 790-800.
- 281.Raekallio, M., Taylor, P.M., Bennett, R.C., 1997. Preliminary investigations of pain and analgesia assessment in horses administered phenylbutazone or placebo after arthroscopic surgery. *Veterinary Surgery* 26, 150-155.
- 282.Ranera, B., Antczak, D., Miller, D., Doroshenkova, T., Ryan, A., McIlwraith, C.W., Barry, F., 2016. Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes. *Equine veterinary journal* 48, 253-260.
- 283.Ranera, B., Barry, F., 2014. A horse of a different color. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85, 658-659.
- 284.Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vazquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C., Martin-Burriel, I., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 144, 147-154.
- 285.Ranera, B., Ordovas, L., Lyahyai, J., Bernal, M.L., Fernandes, F., Remacha, A.R., Romero, A., Vazquez, F.J., Osta, R., Cons, C., Varona, L., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine veterinary journal* 44, 33-42.
- 286.Ray, C.S., Baxter, G.M., McIlwraith, C.W., Trotter, G.W., Powers, B.E., Park, R.D., Steyn, P.F., 1996. Development of subchondral cystic lesions after articular cartilage and subchondral bone damage in young horses. *Equine veterinary journal* 28, 225-232.
- 287.Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., March, K.L., 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109, 1292-1298.
- 288.Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., Shi, Y., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* 2, 141-150.

289. Richardson, D.W., Dyson, S., 2011. The Metacarpophalangeal Joint en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
290. Richardson, D.W., Loinaz, R., 2007. An evidence-based approach to selected joint therapies in horses. The Veterinary clinics of North America. Equine practice 23, 443-460.
291. Rosado, M.M., Bernardo, M.E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., Dello Strologo, L., Emma, F., Locatelli, F., Carsetti, R., 2015. Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. Stem Cells and Development 24, 93-103.
292. Ross, M.W., 2011. The Carpus en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
293. Ross, M.W., McIlwraith, C.W., 2011. Conformation and Lameness en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
294. Ruggles, A.J., 2011. The Proximal and Middle Phalanges and Proximal Interphalangeal Joint en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
295. Rui, Y.F., Lui, P.P., Li, G., Fu, S.C., Lee, Y.W., Chan, K.M., 2010. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. Tissue engineering. Part A 16, 1549-1558.
296. Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistran, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J., Henschler, R., 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. Blood 108, 3938-3944.
297. Rutgers, M., Saris, D.B., Dhert, W.J., Creemers, L.B., 2010. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. Arthritis research & therapy 12, R114.
298. Ryan, A.E., Lohan, P., O'Flynn, L., Treacy, O., Chen, X., Coleman, C., Shaw, G., Murphy, M., Barry, F., Griffin, M.D., Ritter, T., 2014. Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 22, 655-667.
299. Sala, E., Genua, M., Petti, L., Anselmo, A., Arena, V., Cibella, J., Zanotti, L., D'Alessio, S., Scaldaferrì, F., Luca, G., Arato, I., Calafiore, R., Sgambato, A., Rutella, S., Locati, M., Danese, S., Vetrano, S., 2015. Mesenchymal Stem Cells Reduce Colitis in Mice via Release of TSG6, Independently of Their Localization to the Intestine. Gastroenterology 149, 163-176.e120.

- 300.Sanchez-Teran, A.F., Bracamonte, J.L., Hendrick, S., Burguess, H.J., Duke-Novakovski, T., Schott, M., Hoff, B., Rubio-Martinez, L.M., 2016. Effect of Arthroscopic Lavage on Systemic and Synovial Fluid Serum Amyloid A in Healthy Horses. *Veterinary Surgery*.
- 301.Sanchez Teran, A., Rubio Martinez, LM.,Villarino, N.,Sanz,M., , 2012. Synovial serum amyloid A after repeated intraraticular administration of amikacin into equine healthy joints. Large animal sessions ECVS proceedings.
- 302.Santschi, E.M., Williams, J.M., Morgan, J.W., Johnson, C.R., Bertone, A.L., Juzwiak, J.S., 2015. Preliminary investigation of the treatment of equine medial femoral condylar subchondral cystic lesions with a transcondylar screw. *Veterinary Surgery* 44, 281-288.
- 303.Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K., 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- 304.Saulnier, N., Viguier, E., Perrier-Groult, E., Chenu, C., Pillet, E., Roger, T., Maddens, S., Boulocher, C., 2015. Intra-articular administration of xenogeneic neonatal Mesenchymal Stromal Cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 122-133.
- 305.Schaefer, L., Iozzo, R.V., 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 283, 21305-21309.
- 306.Schelbergen, R.F., van Dalen, S., ter Huurne, M., Roth, J., Vogl, T., Noël, D., Jorgensen, C., van den Berg, W.B., van de Loo, F.A., Blom, A.B., van Lent, P.L.E.M., 2014. Treatment efficacy of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis is driven by high synovial activation and reflected by S100A8/A9 serum levels. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 22, 1158-1166.
- 307.Schlueter, A.E., Orth, M.W., 2004. Equine osteoarthritis: A brief review of the disease and its causes. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 1, 221-231.
- 308.Schnabel, L.V., Fortier, L.A., McIlwraith, C.W., Nobert, K.M., 2013b. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *The Veterinary Journal* 197, 570-577.
- 309.Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J., Fortier, L.A., 2014. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research and Therapy* 5, 13.
- 310.Sellam, J., Berenbaum, F., 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology* 6, 625-635.
- 311.Seo, J.P., Kambayashi, Y., Itho, M., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2015. Effects of a synovial flap and gelatin/beta-tricalcium phosphate sponges loaded

- with mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on equine osteochondral defects. *Research in veterinary science* 101, 140-143.
- 312.Seo, J.P., Tanabe, T., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2013. Effects of bilayer gelatin/beta-tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. *Research in veterinary science* 95, 1210-1216.
- 313.Serrano Hernandez, A., 2009. [Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis]. *Reumatologia clinica* 5 Suppl 1, 1-5.
- 314.Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Gearhart, J.D., 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13726-13731.
- 315.Sharpe, A.H., Abbas, A.K., 2006. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *The New England journal of medicine* 355, 973-975.
- 316.Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., Li, N., 2008. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell research* 18, 846-857.
- 317.Shi, Q., Gu, Y., Cai, Y., Ni, L., Huang, C., Yang, H., Zhang, X., 2010. Human mesenchymal stem cell-differentiated osteoblast derived from bone marrow increases its immunogenicity by upregulating the expressions of co-stimulatory molecules. *Bone* 47, S454.
- 318.Sivanathan, K.N., Gronthos, S., Rojas-Canales, D., Thierry, B., Coates, P.T., 2014. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Reviews* 10, 351-375.
- 319.Soler, R., Orozco, L., Munar, A., Huguet, M., Lopez, R., Vives, J., Coll, R., Codinach, M., Garcia-Lopez, J., 2016. Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee* 23, 647-654.
- 320.Sorrell, J.M., Baber, M.A., Caplan, A.I., 2009. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue engineering. Part A* 15, 1751-1761.
- 321.Soto, S.A., Chiappe Barbará, A., 2014. Bisphosphonates: Pharmacology and Clinical Approach to Their Use in Equine Osteoarticular Diseases. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 727-737.
- 322.Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., Moretta, L., 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are

- capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107, 1484-1490.
- 323.Steinert, A.F., Rackwitz, L., Gilbert, F., Noth, U., Tuan, R.S., 2012. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem cells translational medicine* 1, 237-247.
- 324.Stromberg, B., 1979. A review of the salient features of osteochondrosis in the horse. *Equine veterinary journal* 11, 211-214.
- 325.Suga, H., Eto, H., Shigeura, T., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Nishimura, S., Manabe, I., Gonda, K., Yoshimura, K., 2009. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 238-249.
- 326.Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., Nagasawa, T., 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988.
- 327.Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., Mobasher, A., 2009. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal* 179, 10-24.
- 328.Sweeney, C.R., Sweeney, R.W., Divers, T.J., 1987. *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. *Veterinary microbiology* 14, 329-336.
- 329.Taira, T., Fujinaga, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N., Mizuno, S., 1992. Equine haptoglobin: isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 54, 435-442.
- 330.Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- 331.Tang, L., Li, N., Xie, H., Jin, Y., 2011. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *Journal of Cellular Physiology* 226, 832-842.
- 332.Tessier, L., Bienzle, D., Williams, L.B., Koch, T.G., 2015. Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *PloS one* 10, e0122954.
- 333.Tnibar, A., Schougaard, H., Camitz, L., Rasmussen, J., Koene, M., Jahn, W., Markussen, B., 2015. An international multi-centre prospective study on the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: a 24 months follow-up. *Acta veterinaria Scandinavica* 57.

334. Tnibar, M., Kaser-Hotz, B., Auer, J.A., 1993. Ultrasonography of the dorsal and lateral aspects of the equine carpus: technique and normal appearance. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 34, 413-425.
335. Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., Kessler, P.D., 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.
336. Troeberg, L., Nagase, H., 2012. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta* 1824, 133-145.
337. Trotter, G.W., McIlwraith, C.W., 1981. Osteochondritis dissecans and subchondral cystic lesions and their relationship to osteochondrosis in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 1, 157-162.
338. Trowsdale, J., Knight, J.C., 2013. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* 14, 301-323.
339. Tse, W.T., Pendleton, J.D., Beyer, W.M., Egalka, M.C., Guinan, E.C., 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 75, 389-397.
340. Tsuzuki, N., Seo, J.P., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N., 2013. The effect of a gelatin beta-tricalcium phosphate sponge loaded with mesenchymal stem cells (MSC), bone morphogenic protein-2, and platelet-rich plasma (PRP) on equine articular cartilage defect. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 54, 573-580.
341. Turner, A.S., Gustafson, S.B., Zeidner, N.S., McIlwraith, C.W., Thrall, M.A., 1990. Acute eosinophilic synovitis in a horse. *Equine veterinary journal* 22, 215-217.
342. U.S.N.I.H, 2017. <https://clinicaltrials.gov/> U.S. National Institutes of Health. Fecha de consulta: 09/02/2017 Bethesda, Maryland, EE. UU.
343. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology* 8, 726-736.
344. van Buul, G.M., Villafuertes, E., Bos, P.K., Waarsing, J.H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J.A., Bernsen, M.R., van Osch, G.J., 2012. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20, 1186-1196.
345. Van Weeren, P.R., 2006. Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). *Clinical Techniques in Equine Practice* 5, 248-258.

346. Van Weeren, P.R., 2016a. General Anatomy and Physiology of Joints en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
347. Van Weeren, P.R., 2016b. Septic arthritis en Joint disease in the horse (2ª Edición) McIlwraith C.W, Frisbie D.D, Kawcak C.E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
348. Vega, A., Martin-Ferrero, M.A., Del Canto, F., Alberca, M., Garcia, V., Munar, A., Orozco, L., Soler, R., Fuertes, J.J., Huguet, M., Sanchez, A., Garcia-Sancho, J., 2015. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* 99, 1681-1690.
349. Vézina Audette, R., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., Laverty, S., 2013. Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 21, 1116-1124.
350. Villa, A., Snyder, E.Y., Vescovi, A., Martinez-Serrano, A., 2000. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Experimental neurology* 161, 67-84.
351. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* 9, 503-510.
352. Walker-Bone, K., Javaid, K., Arden, N., Cooper, C., 2000. Regular review: medical management of osteoarthritis. *British Medical Journal* 321, 936-940.
353. Walmsley, J.P., 2011. The Stifle en Diagnosis and management of lameness in the horse (2ª Edición). Ross M.W. and Dyson S.J. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
354. Wallis, T.W., Goodrich, L.R., McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Hendrickson, D.A., Trotter, G.W., Baxter, G.M., Kawcak, C.E., 2008. Arthroscopic injection of corticosteroids into the fibrous tissue of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle in horses: a retrospective study of 52 cases (2001-2006). *Equine veterinary journal* 40, 461-467.
355. Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Lu, L., Gilkeson, G.S., Silver, R.M., Chen, W., Shi, S., Sun, L., 2013a. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. *Cell transplantation* 22, 2267-2277.
356. Wang, L., Zhao, Y., Liu, Y., Akiyama, K., Chen, C., Qu, C., Jin, Y., Shi, S., 2013b. IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 1383-1395.
357. Wang, S., Mundada, L., Johnson, S., Wong, J., Witt, R., Ohye, R.G., Si, M.S., 2015. Characterization and angiogenic potential of human neonatal and infant thymus mesenchymal stromal cells. *Stem cells translational medicine* 4, 339-350.

358. Warrington, R., Watson, W., Kim, H.L., Antonetti, F.R., 2011. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology 7 Suppl 1, S1.
359. Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M., 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. PLoS one 5, e10088.
360. Wehling, P., Moser, C., Frisbie, D., Wayne McIlwraith, C., Kawcak, C.E., Krauspe, R., Reinecke, J.A., 2007. Autologous Conditioned Serum in the Treatment of Orthopedic Diseases. BioDrugs 21, 323-332.
361. Wereszka, M.M., White, N.A., 2nd, Furr, M.O., 2007. Factors associated with outcome following treatment of horses with septic tenosynovitis: 51 cases (1986-2003). Journal of the American Veterinary Medical Association 230, 1195-1200.
362. Wieland, H.A., Michaelis, M., Kirschbaum, B.J., Rudolphi, K.A., 2005. Osteoarthritis - an untreatable disease? Nature reviews. Drug discovery 4, 331-344.
363. Wilke, M.M., Nydam, D.V., Nixon, A.J., 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society 25.
364. Williams, L.B., Koenig, J.B., Black, B., Gibson, T.W., Sharif, S., Koch, T.G., 2016. Equine allogeneic umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells reduce synovial fluid nucleated cell count and induce mild self-limiting inflammation when evaluated in an lipopolysaccharide induced synovitis model. Equine veterinary journal 48, 619-625.
365. Williams, L.B., Tessier, L., Koenig, J.B., Koch, T.G., 2014. Post-thaw non-cultured and post-thaw cultured equine cord blood mesenchymal stromal cells equally suppress lymphocyte proliferation in vitro. PLoS one 9, e113615.
366. Wright, I.M., Phillips, T.J., Walmsley, J.P., 1999. Endoscopy of the navicular bursa: a new technique for the treatment of contaminated and septic bursae. Equine veterinary journal 31, 5-11.
367. Wu, L., Leijten, J., van Blitterswijk, C.A., Karperien, M., 2013. Fibroblast growth factor-1 is a mesenchymal stromal cell-secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture. Stem Cells and Development 22, 2356-2367.
368. Wyles, C.C., Houdek, M.T., Behfar, A., Sierra, R.J., 2015. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. Stem cells and cloning : advances and applications 8, 117-124.
369. Xia, C., Cao, J., 2013. Imaging the survival and utility of pre-differentiated allogeneic MSC in ischemic heart. Biochemical and Biophysical Research Communications 438, 382-387.

- 370.Xiao, J., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, X., Zhao, J., Liang, J., Zhong, X., Chen, Y., 2012. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells into a murine model of passive chronic immune thrombocytopenia. *Transfusion* 52, 2551-2558.
- 371.Yan, Z., Zhuansun, Y., Chen, R., Li, J., Ran, P., 2014. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental Cell Research* 324, 65-74.
- 372.Zayed, M.N., Schumacher, J., Misk, N., Dhar, M.S., 2016. Effects of pro-inflammatory cytokines on chondrogenesis of equine mesenchymal stromal cells derived from bone marrow or synovial fluid. *The Veterinary Journal* 217, 26-32.
- 373.Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y., Hu, D., 2015a. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research and Therapy* 6, 234.
- 374.Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., Le, A.D., 2009a. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *Journal of Immunology* 183, 7787-7798.
- 375.Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., Zhao, R.C., 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells and Development* 13, 263-271.
- 376.Zhang, X., Tang, T., Shi, Q., Fernandes, J.C., Dai, K., 2009b. The immunologic properties of undifferentiated and osteogenic differentiated mouse mesenchymal stem cells and its potential application in bone regeneration. *Immunobiology* 214, 179-186.
- 377.Zhang, Y., Sivakumaran, P., Newcomb, A.E., Hernandez, D., Harris, N., Khanabdali, R., Liu, G.S., Kelly, D.J., Pebay, A., Hewitt, A.W., Boyle, A., Harvey, R., Morrison, W.A., Elliott, D.A., Dusting, G.J., Lim, S.Y., 2015b. Cardiac Repair With a Novel Population of Mesenchymal Stem Cells Resident in the Human Heart. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33, 3100-3113.
- 378.Zimmermann, J.A., McDevitt, T.C., 2014. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy* 16, 331-345.
- 379.Ziskoven, C., Jager, M., Zilkens, C., Bloch, W., Brixius, K., Krauspe, R., 2010. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthopedic reviews* 2, e23.
- 380.Zubrod, C.J., Schneider, R.K., 2005. Arthrodesis Techniques in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 21, 691-711.
- 381.Zulewski, H., Abraham, E.J., Gerlach, M.J., Daniel, P.B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M.K., Habener, J.F., 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-533.

