

EMPLEO DE CÉLULAS MADRE EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES TENDINOSAS EN EL CABALLO DE DEPORTE

Use of stem cells for the treatment of tendinopathies in sport horses

Diego, R.^{1,2}; Gadea, J.^{2*}

¹ HVT Veterinarios, España. ² Grupo de Fisiología de la Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Campus de Espinardo (Murcia, España).

***Autor para correspondencia:** Joaquín Gadea, Grupo de Fisiología de la Reproducción, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100 Campus de Espinardo (Murcia, España). Tel: 00 34 868 88 4655, Fax: 00 34 868 88 4147, email: jgadea@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 27 octubre 2014

Aceptado: 2 julio 2015

RESUMEN

Los caballos presentan un potente aparato tendinoso en la región distal de sus extremidades que se originan en los sistemas musculares que se disponen proximalmente al carpo o tarso y se insertan en la falange distal. Como consecuencia de las exigencias deportivas a las que están sometidos los caballos, son frecuentes las lesiones tendinosas que comprometen su vida deportiva. Tradicionalmente, el tratamiento se ha basado en regeneradores de la matriz extracelular (polisulfato glicosaminoglicano, ácido hialurónico) o inhibidores del colágeno (β -aminopropionitrilo de fumarato) combinado con reposo, con unos resultados limitados. Es por ello que en la última década se han desarrollado opciones terapéuticas basadas en la medicina regenerativa y la terapia celular, permitiendo la recuperación funcional de la estructura lesionada mediante el uso de células madre mesenquimales (MSCs). En este artículo se revisa el estado actual de la terapia celular con MSCs como tratamiento de lesiones tendinosas en caballos de deporte. A nivel de terapia celular destaca el uso de células madre mesenquimales de origen óseo y adiposo, con unos resultados de recuperación realmente alentadores con respecto a caballos mantenidos en reposo, que se traduce en la presencia en la zona lesionada de un mayor porcentaje de colágeno tipo I, menor cantidad de agua y glucosaminoglicanos y disminución del infiltrado inflamatorio; también se ha descrito un aumento en la neovascularización. En cuanto a las propiedades biomecánicas, los tendones tratados con células madre tienen menor rigidez y mejor organización fibrilar que los tratados de forma clásica, apreciándose también mejoras en la elasticidad. Los datos que ofrecen los últimos estudios, muestran que de los animales

tratados con MSCs (n=113), el 98,2% volvió a la vida deportiva. De este 98,2% de caballos, el 27,4% presentó recidivas y el 5,3% tuvo una lesión tendinosa en la extremidad contralateral. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la resolución de tendinopatías tratadas con MSCs por edad ni por sexo.

Aunque los resultados de los primeros estudios sean favorables, hasta la fecha, la falta de estandarización de los protocolos y el número reducido de animales estudiados no permiten alcanzar conclusiones definitivas.

Palabras clave: células madre, factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas, caballo, tendinitis.

ABSTRACT

Horses have a potent tendinous system in the distal region, which originate in the muscle systems, proximally to carpus or tarsus, to attach the coffin bone. As a result of sports requirements which horses are require to, tendinopathies are becoming a common pathology, affecting their sport life. Classically, tendinopathies treatment was being based in extracellular matrix regenerators (PSGAG and hyaluronic acid) or collagen inhibitors (BAPN) with a rest period, but the results weren't encouraging. So that, from ten years ago, therapeutics options are being developed based on regenerative medicine and cell therapy because they let recover the same biomechanical properties to the tendon. In this paper, we review the state of the art in cellular therapy with MSCs for the treatment of tendon injuries in sports horses. Use of adipose derived stem cells or bone derived stem cells are the most common strategies use in cell therapy with great results compared with control groups (treatment based in rest periods), it shows higher number of collagen type I fibres, less water, glicosaminoglicans concentration and inflammatory cells in the lesion area; also, it is reported a higher neovascularization process. In relation with biomechanical properties, tendons treated with MSCs have less stiffness and higher crimp pattern, they are more elastic too. 98,2% of horses treated (n=113) with MSCs returned to their sports competition. 27,4% of the 98,2% horses, have recurrence lesions and 5,3% of the horses witch return to their sports training and competition, have a tendinopathy of the contralateral limb. However, it isn't found differences related with gender and age in the resolution of tendon lesions in horses treated with MSCs.

Although the results of the first studies are favourable, it is needed a standardization of protocols and a higher number of animals in study for reaching definitive conclusions.

Keywords: stem cells, growth factor, plasma rich in platelets, horse, tendonitis.

INTRODUCCIÓN

Anatómicamente, la conformación del dedo del caballo es compleja, ya que en él no se dispone ningún paquete muscular, sino que encontramos proyecciones de los músculos a través de los tendones flexores y extensores que se insertan en la falange distal. Estos largos tendones, que se originan proximalmente al carpo o tarso, permiten la flexión y la extensión de las articulaciones del dedo (Sandoval, 1998). Por tanto, todos los movimientos del miembro distal son controlados por músculos que se encuentran en disposiciones más proximales, y por movimientos de cabeza, cuello y cuerpo (Davies *et al.*, 2009).

Los tendones van a estar sometidos a tensiones máximas durante las diferentes fases del paso, trote o galope, viéndose afectados por la

conformación anatómica del caballo, la superficie sobre la que se desplaza, el nivel de entrenamiento y el manejo del animal. Los tendones están compuestos, en su mayoría, por fibras de colágeno tipo I encargadas de soportar las fuerzas de tracción, y la matriz extracelular (ECM) formada por proteoglicanos, glicoproteínas, tenocitos (fibroblastos) y agua (Crevier-Denoix *et al.*, 1998). La ECM es la responsable de las funciones biomecánicas y de la diferenciación de células precursoras a tenocitos. Los tendones son ricos en esta matriz, en la que se encuentran factores de crecimiento, que intervienen en la regulación de la proliferación y diferenciación de los tenocitos (Yang *et al.*, 2013).

Debido al creciente auge en la industria del caballo, y por extensión mayor exigencia, generalmente a nivel deportivo, son cada vez más

frecuentes las lesiones en el sistema musculoesquelético, pudiendo comprometer, incluso, la vida deportiva del animal. A nivel de tejidos blandos, las lesiones más representativas se localizan en los tendones y ligamentos. El ejercicio intenso provoca una disminución de glicosaminoglicanos en el tendón, con una disminución en el diámetro de sus fibras pero sin cambio en la cantidad de colágeno (Clegg, 2012). Todo ello va a provocar micro-roturas o roturas parciales del tejido tendinoso con su consiguiente inflamación (tendinitis). Según un reciente estudio de Clegg (2012), el 46% de las cojeras en los caballos de carreras están asociadas a lesiones en tendones y ligamentos, siendo mayor esta proporción cuando la actividad deportiva se desarrolla sobre superficies más blandas. Sin embargo, este autor no encontró diferencias en la prevalencia de cojera asociada a distintos entrenadores, ni entre lesiones producidas durante la competición (41%) o el entrenamiento (59%).

Las tendinitis se resuelven, en condiciones normales, con la formación de tejido conectivo no especializado en el lugar de la lesión que altera la composición de la matriz extracelular (Smith *et al.*, 2013). Las citoquinas juegan un papel importante en el desarrollo de las tendinopatías por su función en la regulación de la diferenciación, actividad y síntesis de matriz tendinosa. Junto con las citoquinas, los macrófagos contribuyen al desbridamiento y curación del tendón dañado. Por otra parte, los tendones sometidos a un sobreesfuerzo permanente liberan prostaglandinas que activan mediadores lipídicos como lipoxinas y resolvinas, esenciales para restaurar la homeostasis después de una inflamación o lesión (Dakin *et al.*, 2014).

Un estímulo inflamatorio continuo o permanente, con una producción excesiva de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas y citoquinas, conlleva la síntesis de tejido conectivo no especializado, ya que se ve alterada la composición de la ECM (Dakin *et al.*, 2014). Este hecho compromete las propiedades biomecánicas del tendón que permite transmitir la fuerza del músculo

lo a la zona distal de la extremidad, provocando un compromiso en la locomoción, la posibilidad de recidivas e incluso el impedimento para volver a la vida deportiva (Crevier-Denoix *et al.*, 1997).

El tratamiento convencional se ha enfocado hacia la estimulación de la síntesis de ECM del tendón o hacia la prevención de la formación de un exceso de tejido conectivo (Ross y Dyson, 2011). Los fármacos tradicionalmente utilizados en el tratamiento de las tendinitis han sido por una parte, polisulfato de glicosaminoglicano (PSGAG) y el ácido hialurónico cuya función se basa en favorecer la síntesis de ECM; así como, el uso de β -aminopropionitrilo de fumarato (BAPN), con propiedades inhibitorias de la formación de colágeno, todos ellos aplicados intralesionalmente en varias dosis no estandarizadas, en función de los hallazgos ecográficos encontrados durante la resolución de la lesión (Dyson, 2004).

Como alternativa, en la última década se han desarrollado terapias que permiten recuperar en mayor medida el tejido funcional propio del tendón. Dentro de las terapias que mejores resultados han revelado encontramos los tratamientos con factores de crecimiento y el empleo de células madre mesenquimales (MSCs) intralesionales (Sutter, 2007).

Las MSCs son células multipotentes que bajo condiciones *in vivo* o *in vitro* específicas pueden derivar, entre otras células, a tenocitos, osteocitos y condrocitos (Jiang *et al.*, 2014). El primer trabajo publicado basado en la aplicación de células madre en lesiones tendinosas en caballos de deporte data de 2003 (Smith *et al.*, 2003) y desde entonces el uso de estas células se ha convertido paulatinamente en una herramienta viable para el tratamiento de tendinitis agudas en el caballo de deporte (Smith *et al.*, 2003, Carvalho *et al.*, 2011, Godwin *et al.*, 2012, Marfe *et al.*, 2012).

El desarrollo de la terapia celular autóloga, que permite evitar o reducir los fenómenos de intolerancia inmunológica, supone una mejora sustancial al uso de células madre mesenquimales procedentes de biobancos (Marfe *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo es revisar el estado actual de la terapia celular con MSCs como tratamiento en lesiones tendinosas en el caballo de deporte. Para ello, se ha analizado la información disponible sobre los tipos celulares existentes, las condiciones de cultivo, el empleo clínico de las MSCs y sus resultados.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSCs tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, si las condiciones de cultivo o ambientales son las adecuadas, permitiendo la regeneración o renovación del tejido afectado (Dor y Melton, 2004).

Éstas células se pueden obtener de diversos tejidos, médula ósea (BMSC), grasa (AMSC), sangre (BDMSC), incluso de tejido gingival (GMSC) y de ligamento periodontal (PMSC). Éstas pueden cultivarse *in vitro* y diferenciarse en tejido funcional para ser aplicadas intralesionalmente y actuarán como matriz extracelular, permitiendo una reparación funcional, pero no la regeneración completa del tendón lesionado (Mercati *et al.*, 2014).

1. Células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (BMSCs)

Fueron las primeras células mesenquimales estudiadas (Smith *et al.*, 2003) y se obtienen por aspirado de médula ósea de esternón o ilion. Este aspirado puede procesarse directamente por centrifugación para concentrar las células o bien pueden ser cultivadas durante dos o tres semanas para, finalmente, obtener un concentrado de células mesenquimales. Tanto las células mesenquimales procedentes de cultivo celular, como las obtenidas tras la centrifugación de aspirado medular pueden ser administradas intralesionalmente, encontrándose en éste último un menor número de células (Radcliffe *et al.*, 2010).

Se obtienen relativamente pocas células mesenquimales tras el tiempo de cultivo de un aspirado medular. Realmente, existe disparidad de resultados, ya que se han llegado a documentar la presencia de 30-40 células progenitoras por cada 10^6 células nucleadas frente a una célula progenitora por cada 4×10^3 células nucleadas (Vidal *et al.*, 2006). Probablemente, esta diferencia se deba a la edad de los animales estudiados, consiguiéndose mejores resultados con animales de menor edad (Vidal *et al.*, 2006).

2. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSCs)

Quizás sea este tipo celular el más representativo en terapia celular heteróloga, justificándose por la accesibilidad y disposición que se tiene del tejido adiposo. El punto de elección para su extracción es la región glútea.

Cuándo obtenemos tejido adiposo, y tras su cultivo celular, nos encontramos con una población heterogénea que incluye células endoteliales y epiteliales, preadipocitos y células precursoras mesenquimales (Carvalho *et al.*, 2011).

Se ha descrito la adición de ECM bovina a cultivos de AMSCs, *in vitro*, proliferando y diferenciándose en tenocitos. Así mismo, se han cultivado AMSCs en geles de colágeno, sometidas a una tensión estática, evidenciándose la progresión a tenocitos, con un aumento de las propiedades biomecánicas (Yang *et al.* 2013).

3. Células madre derivadas de sangre (BDSCs)

Se está probando este tipo celular con muy buenos resultados (Marfe *et al.*, 2012). Las principales ventajas radican en la facilidad para obtener una cantidad suficiente de muestra y la posibilidad de realizar terapia celular autóloga, lo que aumenta la tolerancia inmunitaria. Marfe *et al.* (2012) utilizan BDSCs cultivadas *in vitro* e inyectadas intralesionalmente en el mismo caballo, obteniendo unos resultados similares a los descritos en células madre mesenquimales

procedentes de médula ósea, con un mayor potencial proliferativo y de diferenciación.

4. Células madre de origen gingival (GMSCs) y periodontal (PMSCs)

Dado la similitud entre las lesiones tendinosas que sufren los équidos y las que se presentan en la clínica humana, se emplea al caballo como modelo experimental para el estudio de la terapia celular en ortopedia (Jiang *et al.*, 2014). Por ello, a modo experimental se están empleando células madre obtenidas de tejido gingival y ligamento periodontal para el tratamiento de tendinopatías, pudiendo ser una alternativa si se suplementa con factores de crecimiento tales como TGF β 3 (Moshaverinia *et al.*, 2014).

CONDICIONES DE CULTIVO

Independientemente del origen de las células progenitoras, las condiciones de cultivo son similares para todas ellas, siendo el suero fetal bovino el principal suplemento, presentando el inconveniente de que sus componentes no están definidos (Schwarz *et al.*, 2012, Seo *et al.*, 2013). Por ello, la repetitividad de los resultados se puede ver comprometida, a la vez que se incluyen proteínas xenogénicas que pueden llegar a producir respuesta inmunológica (Schwarz *et al.*, 2012). Actualmente, se están probando sustitutos serológicos comerciales (Schwarz *et al.*, 2012) o lisado de plaquetas (Seo *et al.*, 2013), formado este último por factores de crecimiento como pueden ser: factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) o factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).

Durante su cultivo, las MSCs son sometidas a una baja tensión superficial de oxígeno (3%) que es la que regula aspectos funcionales de las células tales como supervivencia, proliferación, viabilidad, diferenciación y migración, favoreciendo a su vez la síntesis de colágeno tipo II (Shell *et al.*, 2013).

SELECCIÓN DE LOS TIPOS CELULARES

Tras el cultivo celular, proliferan diferentes tipos celulares, por lo que se deben seleccionar aquellas células objeto de nuestro interés. Esta caracterización se realiza mediante el empleo de la citometría de flujo, que permite detectar antígenos específicos que expresan de forma diferencial las distintas células MSCs (Ranera *et al.*, 2011; Marfe *et al.*, 2012). Así las células BNM-SCs y AMSCs expresan en la superficie de su membrana CD29 y CD90, además AMSCs expresan también CD34 (Ranera *et al.*, 2011). Sin embargo, la selección de BDSCs se basa en la expresión de CD90 y CD117 (Marfe *et al.*, 2012).

TRATAMIENTO CON MSCS

Las células madre más utilizadas son las obtenidas a partir del tejido adiposo y la médula ósea, permitiendo generar células diferenciadas para regenerar diversos órganos como músculo, hueso, hígado o corazón, y tejidos dañados como consecuencia de una lesión aguda o crónica (Reed y Leahy, 2013).

En cuanto a las lesiones tendinosas se refiere, son candidatos para recibir esta terapia celular aquéllos caballos cuya lesión en el área total transversal del tendón, medida por ecografía, comprenda entre el 10% y el 40% del tejido sin afección del paratendón (Godwin *et al.*, 2012). Las células se inyectan cuando existe un tejido de granulación muy vascularizado que actúa como soporte aportando nutrientes a la matriz extracelular (Carvalho *et al.*, 2011).

El tratamiento basado en la infiltración intralesional del aspirado obtenido directamente de médula ósea se ha utilizado en tendinopatías, pero este aspirado contiene una concentración baja de células madre, diluidas en otros componentes celulares, e incluso tejido óseo, proveniente de la médula ósea (Schnable *et al.*, 2009). El cultivo del aspirado nos permite aumentar el número de células disponibles, requiriendo entre 3 y 7 días para ello.

Para diversos autores (Carvalho *et al.*, 2011 Godwin *et al.*, 2012, Marfe *et al.*, 2012, Becerra *et al.*, 2013, Renzi *et al.*, 2013 y Smith *et al.*, 2013), la concentración celular de elección es 10×10^6 MSCs por infiltración junto con suero autólogo o sobrenadante de aspirado medular que provocan un estímulo anabólico. El mayor porcentaje de permanencia (número de células que permanecen en la lesión) de MSCs en tendinitis agudas se ha obtenido con la administración intralesional (24%), frente a la administración regional o intravenosa (0%), existiendo una pérdida significativa de células (Becerra *et al.*, 2013). La administración intralesional disminuye la inflamación, facilitando la regeneración del tejido dañado (Carvalho *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN

El tratamiento médico convencional de tendinopatías equinas se ha basado en largos periodos de reposo con infiltraciones intralesionales de ácido hialurónico, PSGAG o BAPN obteniendo un elevado porcentaje de recidivas (43%) y entre el 40-60% de los caballos vuelven a la vida deportiva (Dyson, 2004). Además, tradicionalmente, se viene empleando antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) e incluso corticoides, con el fin de minimizar el proceso inflamatorio (Dyson, 2004), pero el empleo de estos antiinflamatorios en tendinitis están relacionados con una pérdida funcional del tendón (Virchenko *et al.*, 2004) y predisposición a su ruptura (Shrier *et al.*, 1996).

En los últimos años, la medicina regenerativa se ha convertido en una disciplina muy importante dentro de la ortopedia, adquiriendo importancia el empleo de las MSCs y factores de crecimiento con fines terapéuticos. Se entiende que la terapia con MSCs provoca una resolución de la lesión tendinosa con un tejido más parecido al original que el tejido cicatricial que se genera por resolución espontánea (Smith *et al.*, 2003). Todavía no se han pu-

blicado datos suficientes que confirmen con contundencia estos resultados preliminares, lo que sí parece evidente es que el porcentaje de caballos con recidivas es mucho menor en aquéllos que se han tratado con MSCs frente al tratamiento convencional (Dyson *et al.*, 2004). También, el tratamiento con MSCs autólogas resuspendidas en sobrenadante de médula ósea revela mejores resultados si se compara con tendones no tratados analizando propiedades biomecánicas, morfológicas y estructurales (Smith *et al.*, 2013). Esto se debe a que una reducción en la rigidez, proporciona una mejor funcionalidad del tendón por mantener sus propiedades elásticas y mejores propiedades locomotoras (Crenois-Denoix *et al.*, 1997). Está reducción de la rigidez del área dañada minimiza el gradiente de tensión adyacente en tendones, que es el factor desencadenante de las recidivas cuándo el caballo vuelve a niveles altos y exigentes de entrenamiento (Smith *et al.*, 2010).

La valoración ecográfica de las lesiones y el examen dinámico de cojeras no revelan diferencias significativas en la resolución de la lesión entre grupos control tratados con placebo y grupos tratados con MSCs (Carvalho *et al.*, 2011). De los tendones tratados con MSCs derivadas de diferentes precursores celulares, el 30-80% se recuperaron 4 meses después de la infiltración intralesional (Marfe *et al.*, 2012) aunque no existen diferencias significativas entre recidiva y cantidad de células inyectadas (Godwin *et al.*, 2012). En este mismo sentido, del total de animales tratados ($n=113$), el 98,2% volvieron a la vida deportiva, 27,4% recidivaron y 5,3% tuvieron una lesión de la extremidad contralateral (Godwin *et al.*, 2012).

Por otro lado, la edad y sexo son factores específicos de riesgo para patologías musculoesqueléticas (Bertuglia *et al.*, 2014). Así los animales de mayor edad, presentan mayor riesgo de tendinopatías; pero sin embargo, no se han observado diferencias significativas en los resultados en caballos tratados con MSCs

de diferentes edades (Schnabel *et al.*, 2013). Smith (2013) y Carvalho (2011) coinciden al no detectar un efecto significativo en la tasa de recuperación asociado a la edad y el sexo (Tabla 1).

Si bien es verdad que se han obtenido mejores resultados con el uso de MSCs combinado con factores de crecimiento frente al tratamiento médico convencional, se han conseguido los mismos resultados empleando tres administraciones intralesionales cada 7 días de plasma rico en plaquetas (PRP) (Bosch *et al.*, 2010). El tratamiento con PRP se basa en los factores de crecimiento que presentan las plaquetas: PDGF, TGF-B, VEGF y IGF-1 que participan en la proliferación, migración y síntesis de colágeno. La principal ventaja del

uso de PRP es la facilidad para su obtención, ya que se obtiene por activación con CaCl_2 y centrifugación de la sangre, la reducción en el tiempo de preparación y el menor coste (Anitua *et al.*, 2005).

Por el momento no existen estudios que reflejen el número idóneo de MSCs que deben utilizarse y no se han encontrado diferencias significativas entre la tasa de recidiva y la cantidad de células inyectadas (Godwin *et al.*, 2012). Se ha demostrado que en tumores en los que se inyecta una concentración elevada de MSCs desarrollan un efecto citotóxico, liberándose agentes apoptóticos (Otsu *et al.*, 2009), por lo que sería prudente no inyectar gran cantidad de células para prevenir esta apoptosis inducida.

Tabla 1. Resultados de diferentes parámetros medidos sobre tendones tratados con MSCs frente a no tratados.

| Ítem | Resultado | Referencia |
|------------------------------------|---|--|
| Aspecto ecográfico | Sin diferencias estadísticamente significativas | Carvalho <i>et al.</i> , 2011 |
| Colágeno tipo I | Mayor porcentaje ($p < 0,05$) respecto al grupo control | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Cantidad de agua | Significativamente menor ($p < 0,05$) respecto al grupo control | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Glicosaminoglucanos | Significativamente menor ($p < 0,05$) respecto al grupo control | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Infiltrado inflamatorio | Significativamente menor ($p < 0,05$) respecto al grupo control | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Neovascularización | Mayor neovascularización respecto al grupo control | Carvalho <i>et al.</i> , 2011 y Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Rigidez | Significativamente mayor ($p < 0,05$) | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Organización fibrilar | Significativamente mayor ($p < 0,05$) | Smith <i>et al.</i> , 2013 |
| Retorno vida deportiva | 98,2% | Godwin <i>et al.</i> , 2012 |
| Recidivas | 27,4% de los caballos anteriores | Godwin <i>et al.</i> , 2012 |
| Lesión en extremidad contralateral | 5,3% de los caballos anteriores | Godwin <i>et al.</i> , 2012 |

De acuerdo con Dyson (2013), el cultivo de células mesenquimales autólogas es muy costoso y su rendimiento celular es impredecible. A su vez nos encontramos con muy pocas evidencias científicas al respecto, no sabiendo cuándo es el momento óptimo para tratar la lesión, la concentración celular y el número de infiltraciones idóneas –ya que si se inyectan grandes volúmenes intralesionales provoca una desorganización del proceso de cicatrización (Smith *et al.*, 2013). En definitiva, no existe hasta la fecha un protocolo estandarizado para la aplicación de éstas células.

En este mismo sentido, el 50% de los propietarios de caballos de competición desconocen el uso de MSCs como terapia para lesiones tendinosas, el 41% no aceptarían su uso por desconocimiento de la técnica o de los resultados (Martin *et al.*, 2014). Por ello, son necesarios más estudios estandarizados, para obtener resultados que contrasten su eficacia y conlleven una mejor aceptación de la técnica.

Existe una dificultad manifiesta a la hora de realizar este tipo de estudios *in vivo*, ya que se requiere un elevado número de caballos con lesiones, inducidas o por causas naturales, para poder obtener unos datos concluyentes. Dado que con el empleo de la ecografía no se pueden observar diferencias entre grupos control y grupos tratados (Carvalho *et al.*, 2011), se necesitan tomar muestras del tejido para poder contrastar la evolución de la lesión, lo que en muchas ocasiones conlleva el sacrificio del animal. Actualmente, se ha visto que hay gran similitud entre las tendinopatías humanas y equinas, así como en su proceso de resolución (Jiang *et al.*, 2014). Existen métodos *in vitro* en los que se ha conseguido la diferenciación de tenocitos a partir de células mesenquimales (Yang *et al.*, 2013 y Jiang *et al.*, 2014) por lo que puede ser el futuro en la investigación del empleo de células madre en el tratamiento de lesiones tendinosas en el caballo de deporte.

CONCLUSIÓN

El empleo de MSCs en el tratamiento de tendinitis equinas ha demostrado mejores resultados que los obtenidos con tratamiento médico, pero no se han conseguido mejores resultados que los derivados del tratamiento con PRP. Dado que este último tratamiento muestra unos resultados similares a MSCs (suplementadas con factores de crecimiento) y su menor coste, puede ser el tratamiento de elección.

Por otra parte, es necesario ampliar los estudios que permitan estandarizar un protocolo y revelen más información para poder utilizarlo en la clínica diaria del caballo de competición. Tal vez esto se consiga con la reciente obtención de tendones *in vitro*, evitando así los inconvenientes que acarrea un estudio *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- ANITUA E, ANDÍA I, SÁNCHEZ M, AZOFRA J, del MAR-ZALDUENDO M, de la FUENTE M, NURDEN P, NURDEN AT. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cell culture. *J. Orthop. Res* 23:281-6.
- BECERRA P, VALDÉS MA, DUDHIA J, FISKE-JACKSON AR, NEVES F, HARTMAN NG, SMITH RK. 2013. Distribution of injected technetium (99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *J. Orthop. Res.* 31: 1096-102.
- BERTUGLIA A, BULLONE M, ROSSOTTO F, GASPARINI M. 2014. Epidemiology of musculoskeletal injuries in a population of harness standardbred racehorses in training. *BMC Vet. Res.* 10:11.
- BOSCH G, VAN SCHIE HTM, DE GROOT MW, CADBY JA, VAN DE LEST CHA, BARNEVELD A, VAN WEEREN PR. 2010. Effects of Platelet-Rich Plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor

- tendons: a placebo-controlled experimental study. *J. Orthop. Res.* 28: 211-217.
- CARVALHO A, GARCIA-ALVES AL, GOMES-OLIVEIRA PG, CISNEROS-ÁLVAREZ LE, AMORIM RL, HUSSNI CA, DEFFUNE E. 2011. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines. *J. Equine Vet. Sci.* 31: 26-34.
- CLEGG PD. 2012. Musculoskeletal disease and injury, now and in the future. Part 2: Tendon and ligament injuries. *Equine Vet. J.* 44: 371-375.
- CREVIER-DENOIX N, COLLOBERT C, POURCELOT P, DENOIX JM, SANAA M. 1997. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Vet J Suppl*: 23-26.
- CREVIER-DENOIX N, COLLOBERT C, SANAA M, BERNARD N, JOLY C, POURCELOT P, GEIGER D, BORTOLUSSI C, BOUSSEAU B, DENOIX JM. 1998. Mechanical correlations derived from segmental histologic study of the equine superficial digital flexor tendon, from foal to adult. *Am. J. Vet. Res.* 59: 969-77.
- DAKIN SG, DUDHIA J, SMITH RKW. 2014. Resolving an inflammatory concept: the importance of inflammation and resolution in tendinopathy. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 158: 121-127.
- DAVIES HM, MERRITT JS, THOMASON JJ. 2009. Biomecánica del pie equino. En FLOYDAE & MANSMANN R *Podiatría equina*, 1ª Edición. Ed.: Intermédica, Buenos Aires (Argentina).
- DOR Y, MELTON DA. 2004. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* 3 (9): 1104 – 1106.
- DYSON SJ. 2004. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36 (5): 415-419.
- DYSON SJ. 2013. Are mesenchymal progenitor cells set to revolutionise management of musculoskeletal injuries in the horse? *Vet. J.* 197: 533-534.
- GLASS ZA, SCHIELE NR, KUO CK. 2014. Informing tendon tissue engineering with embryonic development. *J. Biomech.* 47: 1964-8.
- GODWIN EE, YOUNG NJ, DUDHIA J, BEAMISH IC, SMITH RKW. 2012. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 44: 25-32.
- JIANG D, XU B, YANG M, ZHAO Z, ZHANG Y, LI Z. 2014. Efficacy of tendon stem cells in fibroblast-derived matrix for tendon tissue engineering. *Cytotherapy* 16: 662-673.
- LANGE-CONSIGLIO A, TASSAN STEFANO, CORRADETTI B, MEUCCI A, PEREGO R, BIZZARO D, CREMONESI F. 2013. Investigating the efficacy of amnion-derived compared with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in equine tendon and ligament injuries. *Cytotherapy* 15: 1011-1020.
- MARFE G, ROTTA G, DE MARTINO L, TAFANI M, FIORITO F, DI STEFANO C, POLETTINI M, RANALLI M, RUSSO MA, GAMBACURTA A. 2012. A new clinical approach: Use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sciences* 90: 825-830.
- MARTIN E, NIELSEN S, QUINN JC. 2014. Willingness of a convenience sample of horse owners to use stem cell therapy for the treatment of equine tendon injury and factors that influence this decision. *J. Equine Vet. Sci.* 34 (7): 889-896.
- MERCATI F, PASCUCCI L, CURINA G, SCOCCO P, TARDELLA F, DALL'AGLIO C, MARINI C, CECCARELLI P. 2014. Evaluation of storage conditions on equine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Vet. J.* 200: 339-42.
- MOSHAVERINIA A, XU X, CHEN C, ANSARI S, ZADEH HH, SNEAD ML, SHI S.

2014. Application of stem cells derived from the periodontal ligament or gingival tissue sources for tendon tissue regeneration. *Biomaterials* 35: 2642-2650.
- OTSU K, DAS S, HOUSER SD, QUADRI SK, BHATTACHARYA S, BHATTACHARYA J. 2009. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113: 4197-205
- RADCLIFFE CH, FLAMINIO MJ, FORTIER LA. 2010. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.* 19 (2): 269-82.
- RANERA B, LUAHYAI J, ROMERO A, VÁZQUEZ FJ, REMACHA AR, BERNAL ML, ZARAGOZA P, RODELLAR C, MARTÍN-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.
- REED SA, LEAHY ER. 2013. Stem cell therapy in equine tendon injury. *J Anim Sci* 91: 59-65.
- RENZI S, RICCÒ S, DOTTI S, SESSO L, GROLLI S, CORNALI M, CARLIN S, PATRUNO M, CINOTTI S, FERRARI M. 2013. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95: 272-277.
- ROSS MW, DYSON SJ. 2011. Diagnosis and management of lameness in the horse. Elsevier Saunders, Missouri (USA).
- SANDOVAL J. 1998. Tratado de Anatomía Veterinaria, Tomo II: Aparato Locomotor. Imprenta Sorles, León (Spain).
- SCHNABEL LV, LYNCH ME, VAN DER MEULEN MCH, YEAGER AE, KORNA-TOWSKI MA, NIXON AJ. 2009. Mesenchymal stem cells and Insulin-like Growth Factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J. Orthop. Res.* 27: 1392-1398.
- SCHNABEL LV, FORTIER LA, MCILWRAITH C, NOBERT K. 2013. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Vet. J.* 197: 570-577.
- SCHWARZ C, LEICHT U, ROTHE C, DROSSE I, LUIBL V, RÖCKEN M, SCHIEKER M. 2012. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res. Vet. Sci.* 93: 457-462.
- SEO L, TSUZUKI N, HANEDA S, YAMADA K, FURUOKA H, TABATA Y, SASAKI N. 2013. Comparison of allogenic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res. Vet. Sci.* 95: 693-698.
- SHELL K, RAABE O, DIP ING CF, DIP ING AO, CHRIST HI, WENISCH S, ARNHOLD S. 2013. Comparison of equine adipose tissue derived stem cell behaviour and differentiation potential under the influence of 3% and 21% oxygen tension. *Equine Vet. Sci.* 33: 74-82.
- SHRIER I, MATHESON GO, KOHL HW. 1996. Achilles tendonitis: are corticosteroid injections useful or harmful? *Clin. J. Sport Med.* 206:15-23.
- SMITH RK, KORDA M, BLUNN GW. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* 35 (1): 583-584.
- SMITH RWK. 2010. Pathophysiology of tendon injury. In: ROSS MW & DYSON SJ, Diagnosis and management of lameness in the horse. 2nd ed. St Louis: Saunders.
- SMITH RWK, WERLING NJ, DAKIN SG, ALAM R, GOODSHIP AE, DUDHIA J.

2013. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *J. PLoS One* Vol. 8 Issue 9.
- SUTTER WW. 2007. Autologous Cell-based therapy for tendón and ligament injuries. *Clin. Tech. Equine Pract.* 6: 198-208.
- VIDAL MA, KILROY GE, JOHNSON JR. 2006. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet. Surg.* 35: 601-610.
- VIRCHENKO O, SKOGLUND B, ASPENBERG P. 2004. Parecoxib impairs early tendon repair but improves later remodeling. *Am. J. Sports Med.* 32: 1743-1747.
- YANG G, ROTHRAUFF BB, LIN H, GOTTARDI R, ALEXANDER PG, TUAN RS. 2013. Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon derived extracellular matrix. *Biomaterials* 34: 9295-9306.

