

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN CLÍNICA Y RADIOLÓGICA DEL EFECTO DEL IMPLANTE
INTRA-ARTICULAR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALOGÉNICAS
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN LESIONES OSTEOCONDRALES DE
EQUINOS**

por

IRIBARNEGARAY DAMIANI, María Noel

LÁZARO AROCENA, Carlos Santiago

MEGA PUENTES, Lucía Jacqueline

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria
Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:



Presidente de mesa:

Dr. Uruguaysito Benavídes



Segundo miembro (Tutor):

Dr. Javier Mirazo



Tercer miembro:

Dra. María José Estradé



Cuarto miembro (Co-tutor):

Dr. Kevin Yaneselli

Fecha:

03/12/2021

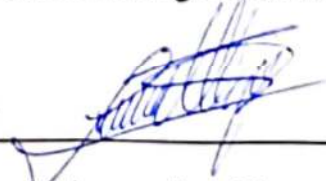
Autores:



María Noel Iribarnegaray Damiani



Carlos Santiago Lázaro Arocena



Lucía Jacqueline Mega Puentes

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos de Lucía Mega:

A nuestras familias que sin su apoyo no podríamos haber logrado llegar hasta acá, a los amigos que nos ayudaron a recorrer este camino en todo momento.

A la Facultad de Veterinaria y a nuestros tutores por todo el apoyo brindado.

Agradecimientos de María Noel Iribarnegaray:

Quiero agradecer a mi familia y amigos que me apoyaron en todo momento.

Agradecimientos de Santiago Lázaro:

Quiero agradecer a mis padres y hermano, Carlos, Sandra y Gonzalo, por darme su apoyo y confianza incondicional en todo momento. Al tata y la yaya, por ser mis segundos padres y amigos, por haberme dado todo durante tantos años, donde sea que estén, gracias. A Eli, por aguantarme, entenderme y apoyarme siempre. Sin ustedes nada hubiese sido posible.

A Lu, amiga, hermana y madre de Justi, mi ahijada hermosa, gracias por todos los momentos que compartimos juntos y que vamos a compartir con nuestras familias y amigos.

A la familia por siempre estar pendientes de cómo iba, a mis amigos del pueblo y de Facultad, que sin duda son lo mejor que me llevo de la carrera.

Por último quiero agradecer a Javier y Kevin, por confiar en nosotros y no soltarnos la mano a pesar de los momentos complicados.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
RESÚMEN.....	10
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. La Articulación.....	13
2.1.1. Estructura y función	13
2.1.2. Articulaciones sinoviales del caballo.....	14
2.1.2.1. Cartílago Articular.....	16
2.1.2.1.1. Componente Celular del Cartílago Articular.....	17
2.1.2.1.2. Principales Componentes de la Matriz Extracelular del Cartílago Articular	17
2.1.2.2. Hueso subcondral	18
2.1.2.3. Cápsula Articular y Líquido Sinovial	19
2.1.2.4. Estructuras intra-articulares.....	20
2.1.3. Región del carpo	20
2.1.3.1. Recuerdo anatómico de la articulación carpo-radial.....	20
2.1.3.2. Principales Patologías	21
2.1.3.3. Diagnóstico.....	22
2.1.3.3.1. Examen Físico.....	22
2.1.3.3.2. Anestésias diagnósticas.....	23
2.1.3.3.3. Examen radiológico.....	24
2.1.3.3.4. Ecografía	25
2.1.3.3.5. Otras técnicas de imagen.....	26
2.2. Artritis traumática.....	27
2.2.1. Definición	27
2.2.2. Síntomas y diagnóstico.....	27
2.2.3. Tratamiento.....	30

2.2.3.1.	Tratamientos médicos	30
2.2.3.2.	Abordaje Quirúrgico	31
2.2.3.3.	Terapias físicas	33
2.2.3.4.	Terapias regenerativas.....	34
2.3.	Células madre	34
2.3.1.	Células Madre Mesenquimales.....	36
2.3.1.1.	Características de las Células Madre Mesenquimales.....	36
2.3.1.2.	Mecanismos de Acción Terapéutica de las Células Madre Mesenquimales.....	38
2.3.1.3.	Propiedades inmunomoduladoras de las Células Madre Mesenquimales.....	39
2.3.1.4.	Uso terapéutico de las CMM en patologías articulares equinas.....	40
2.3.1.4.1.	Potencial de las CMM en el tratamiento de patologías articulares ..	40
3.	OBJETIVOS.....	43
3.1.	Objetivo General:.....	43
3.2.	Objetivos específicos:.....	43
4.	HIPÓTESIS.....	44
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1.	Animales.....	45
5.2.	Aislamiento de CMM-TA equinas	45
5.3.	Instrumental de cirugía y artroscópico.....	45
5.4.	Procedimiento quirúrgico para inducir la microlesión osteocondral por artroscopía.	45
5.5.	Aplicación de CMM intraarticular	47
5.6.	Evaluación clínica.....	47
5.7.	Evaluación Radiológica	48
5.8.	Evaluación de Análisis de Laboratorio.....	48
5.9.	Análisis Estadístico.....	48
5.10.	Evaluación clínica	49
5.10.1.	Parámetros y condición corporal.....	49
5.10.2.	Confort y signos asociados al dolor	49
5.10.3.	Aparato locomotor.....	51
5.11.	Evaluación paraclínica	54

5.11.1. Aparato locomotor.....	54
5.11.2. Líquido sinovial	57
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIONES	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
9. ANEXO	65

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1- Tipos de articulaciones según sus características estructurales (tipo de conexión entre extremos óseos) y grado de movilidad permitido con ejemplos en el caballo (Liebich y König, 2005b).	13
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 (Liebich y König, 2005b)...	15

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de una típica articulación sinovial (Baxter, 2014).	15
Figura 2. Esquema del cartílago articular adulto mostrando las 4 capas y el ordenamiento de los condrocitos y las fibras colágenas (Baxter, 2014).	16
Figura 3. Vista dorsal (A) y palmar (B) de carpo izquierdo normal. (Foto cortesía Br. C. Gallego).	21
Figura 4. Vista frontal de un carpo con fractura del carpo ulnar.(Fuente propia).....	23
Figura 5. Flexión del carpo para identificar una respuesta dolorosa.(Fuente propia)23	
Figura 6. Artrocentesis.(Fuente propia)	24
Figura 7. Imagen radiográfica DP (A) y LM en flexión (B).(Fuente propia).....	25
Figura 8. Imagen ecográfica transversal de una tenosinovitis séptica del extensor carpo radial, la línea punteada indica ensanchamiento del mesotendón (Atlas of equine ultrasonography, 2014).	26
Figura 9. Vista craneal de los sitios de inyección del carpo. Las agujas pueden ingresar a la articulación radiocarpiana (A y B) o intercarpiana (C y D), en posición lateral o medial al tendón extensor carpo-radial. (Baxter, 2014).	29
Figura 10. Imagen radiográfica que muestra un pequeño fragmento sobre la cara distal del hueso carpo-radial (flecha). (Baxter, 2014).	29

Figura 11. Campos quirúrgicos estériles (A) y posicionamiento del artroscopio en articulación intercarpiana (B).(Fuente propia)	32
Figura 12. Técnica de terapia manual por movilización. Una combinación de técnicas de movilización fisiológica pasiva y accesoria pasiva es aplicada en el carpo para aumentar el rango de movimiento en flexión. El carpo es flexionado, el radio es estabilizado y se aplican movimientos hacia medial (A) y lateral (B) hasta el final del rango a través del tercer metacarpiano.(Fuente propia)	33
Figura 13. “Esquema de la clasificación de las células madre por su capacidad de diferenciación. Se mencionan principales características, utilidades terapéuticas y biotecnológicas conocidas en la actualidad, existe el fenómeno de transdiferenciación in vitro de las MSCs” (Yaneselli, 2019).	35
Figura 14. Representación esquemática del potencial de diferenciación de las CMM. Además de su capacidad para diferenciarse a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, las CMM son capaces de dar lugar a células de linajes derivados de otras capas embrionarias. (Golpanian et al., 2016).	37
Figura 15. Representación esquemática de las diferentes acciones que pueden ejercer las CMM mediante la secreción paracrina de diversas moléculas. (da Silva Meirelles et al., 2006).	39
Figura 16. “Esquema de la terapia celular utilizando CMM. Las células pueden ser obtenidas de diversos tejidos, con mayor frecuencia de médula ósea o tejido adiposo, tanto del paciente o de un donante de la misma especie. Posteriormente, deben ser propagadas in vitro para aumentar su capacidad inicial y poder ser acondicionadas para la terapia celular. Otra opción, es contar con CMM en un biobanco y al momento de ser requeridas pueden propagarse rápidamente y aplicadas. Los biobancos potencialmente pueden acortar los tiempos de tratamiento para el paciente debido a que ya se realizó previamente el aislamiento y propagación inicial, permitiendo almacenar un gran número de células.”(Yaneselli, 2019).	41
Figura 17. Resultados del seguimiento clínico del discomfort. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución fisiológica. Expresados con la media \pm SEM. A: corresponde al score de observación y B: corresponde a score de palpación. Las líneas se encuentran superpuestas por su similitud.	50
Figura 18. Test de flexión forzada controlada del carpo.(Fuente propia)	51
Figura 19. Medición de circunferencia en la región del carpo.(Fuente propia)	52

Figura 20. Resultados del seguimiento clínico de la morfología. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución salina. Expresados con la media \pm SEM.	53
Figura 21. Evaluación de la temperatura local en la región del carpo.(Fuente propia)	54
Figura 22. Resultados del seguimiento clínico por temperatura. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución salina. Expresados con la media \pm SEM.	55
Figura 23. Ejemplo de radiografías; carpo derecho, incidencias DP (A) y LM (B).(Fuente propia)	56
Figura 24. Ejemplo de radiografías; carpo derecho, incidencias DLPMO (A) y DMPLO (B).(Fuente propia)	56
Figura 25. Radiografía de carpo derecho, incidencia LM en flexión.(Fuente propia)	57
Figura 26. Extracción de líquido sinovial intraoperatorio.(Fuente propia)	57

RESÚMEN

Las lesiones osteocondrales en las articulaciones de los caballos son un problema serio y común que limita su actividad atlética. Los tratamientos médico-quirúrgicos tradicionales se consideran paliativos y se ha reportado pobre e inadecuada calidad de reparación del cartílago y un estado estructural y mecánico no adecuado. En las últimas décadas se ha implementado la terapia celular mediante el uso y aplicación de células madre mesenquimales (CMM) como tratamiento de diversas patologías articulares en los equinos. El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar mediante examen clínico y paraclínico el efecto de la aplicación de células madre mesenquimales de tejido adiposo (CMM-TA) alogénicas en lesiones osteocondrales inducidas experimentalmente mediante la técnica de microfractura osteocondral por artroscopía. Se utilizaron seis caballos adultos, clínicamente sanos, a los cuales se les inyectó 1×10^6 CMM-TA alogénicas resuspendidas en 2 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9%) en la articulación intercarpiana izquierda (articulación tratada) y el mismo volumen de solución fisiológica (NaCl 0,9%) en la articulación intercarpiana derecha (articulación control), el día 15 posterior a la cirugía.

Los resultados obtenidos no demostraron alteraciones clínicas, radiográficas y macroscópicas del líquido sinovial a lo largo del estudio en ninguno de los equinos utilizados, asimismo se pudo observar que la aplicación de CMM-TA alogénicas no presentó alteraciones en los parámetros clínicos, radiográficos y de líquido sinovial en comparación a la articulación control. En conclusión, la aplicación por artrocentesis de CMM-TA fue segura y clínicamente no se evidenció signos de reacción inflamatoria local. Se necesitan futuros estudios que evalúen la eficacia con otros parámetros articulares a los monitoreados en el presente estudio como potencialmente podrían ser biomarcadores inflamatorios y regenerativos.

SUMMARY

Osteochondral lesions in equine joints are a serious problem which can limit athletic activity. Traditional medical and surgical procedures are considered palliative and a poor and inadequate quality of cartilage repair and a deficient structural and mechanical condition have been reported. Over the last few decades, cellular therapies by use and application of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have been implemented to treat various joint injuries in horses. The objective of this study was to evaluate and compare, by means of clinical and paraclinical examination, the effect of the application of allogenic Adipose tissue-derived Stem Cells (ADSCs) in experimentally induced osteochondral arthroscopic microfractures. Six mature, clinically healthy horses were used; each was injected with 1×10^6 allogeneic ADSCs resuspended in 2ml of physiological saline solution (NaCl 0,9%) in the left intercarpal joint (treated joint), and the same volume of physiological saline solution (NaCl 0,9%) in the right intercarpal joint (control joint), 15 days after the surgery.

The results did not show clinical, radiographic or macroscopic alterations of the synovial fluid throughout the study in any of the treated horses. In addition, it was observed that the application of allogenic ADSCs did not produce alterations of the clinical, radiographic or synovial liquid parameters in comparison to the control joints. In conclusion, the application by arthrocentesis of ADSCs was safe and clinically, no signs of local inflammatory reaction were evidenced. Further studies are needed to evaluate the efficacy of this procedure, taking into account other parameters than those that were monitored in the present study, which could potentially be used as inflammatory and regenerative biomarkers.

1. INTRODUCCIÓN

Las lesiones osteocondrales (cartílago articular más hueso subcondral) en las articulaciones de los caballos, son un problema serio y común que limita su actividad atlética. El cartílago no se repara y las lesiones son tratadas quirúrgicamente, pero los tratamientos actuales no tienen el éxito esperado. Tanto en humanos como en el caballo, las modalidades para tratar lesiones osteocondrales en las diferentes articulaciones dependen de procedimientos artroscópicos que eliminan cartílago y hueso, cuya reparación se realiza por medio de fibrocartílago.

El examen artroscópico del cartílago articular, hueso subcondral y demás estructuras articulares sigue siendo el método de elección para evaluar las lesiones que no se pueden detectar mediante el uso de otras modalidades de imagen y además provee información valiosa en cuanto al pronóstico de las lesiones.

Los tratamientos médico-quirúrgicos tradicionales incluyen reposos prolongados, corticoides intraarticulares, antiinflamatorios sistémicos, agentes condroprotectores intraarticulares y sistémicos, agentes antiinflamatorios tópicos y/o cirugía (artrotomía / artroscopía), curetaje articular y remoción de osteofitos.

Estos tratamientos se consideran paliativos y se ha reportado pobre e inadecuada calidad de reparación del cartílago (McIlwraith, Wrighty Nixon, 2005; Goodrich y Nixon, 2006) (fibras inelásticas, fibrosis) y un estado estructural y mecánico no adecuado. Se perpetúa la liberación de factores inflamatorios, promoviendo degradación del cartílago articular y persistencia de dolor (Frisbie, 2002).

En cuanto a los antecedentes del uso de las células madre mesenquimales (CMM), en la última década, se ha buscado una alternativa terapéutica para superar estos desafíos del proceso de reparación articular proporcionando la regeneración del tejido por la estimulación de mecanismos de reparación endógenos, implementando la terapia celular mediante el uso y aplicación de las CMM como tratamiento de diversas patologías articulares en animales (Ferris, Frisbie y McCue, 2012; Yamada, A., 2011; Black et al., 2008).

Los equinos son valiosos modelos animales para la evaluación de nuevas terapias para humanos considerando implementación y seguridad *in vivo*, dado las similitudes interespecies en estructura tendinosa (Spaas et al, 2012) así como en grosor del cartílago articular (Frisbie, Kawcak y McIlwraith, 2006). El progreso que se ha logrado en la investigación de los problemas inflamatorios articulares se debe a las investigaciones básicas de enfermedad articular en animales de laboratorio. Sin embargo, los estudios científicos realizados en articulaciones de caballo *in vitro*, han contribuido con hallazgos de vanguardia en el tratamiento de estos problemas (Litzke et al., 2004; Fuller, Ghosh y Barr, 2002).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La Articulación

2.1.1. Estructura y función

Las articulaciones son las estructuras del aparato músculo-esquelético que permiten la movilidad de un componente óseo respecto a otro, conformando así, junto con otras estructuras anatómicas, la locomoción del individuo.

Es importante valorar a la articulación como si se tratara de un órgano, ya que todos sus componentes interactúan estrechamente para cumplir con una función común y la alteración de cualquiera de ellos puede influir en la función del resto, dando lugar a una patología articular.

Para cumplir con su función de forma correcta, esta debe estar en total armonía, ya que necesita tener una gran resistencia para soportar las fuerzas producidas por el movimiento, elasticidad para absorber choques y permitir el desplazamiento sin fricción de los extremos óseos. Todo esto resulta de una alta complejidad de la misma y en contra partida a esto, estas estructuras poseen una capacidad de reparación muy baja (Barrachina, 2017). Las articulaciones se clasifican a menudo según su rango normal de movimiento. Se reconocen tres grupos: 1) Sinartrosis (articulación inmóvil), 2) Anfiartrosis (articulación con leve movimiento), 3) Diartrosis (articulación móvil).

Otra clasificación se basa en las formas especializadas del tejido conectivo que se presenta, sindesmosis (tejido conectivo fibroso), sincondrosis (tejido conectivo cartilaginoso). (Baxter, 2014).

En la Tabla 1 se encuentran resumidas las características principales de los diferentes tipos de articulaciones, atendiendo a estos criterios y ejemplificando en el caballo. (Liebich y König, 2005b)

Tipo de Articulación	Conexión	Grado de Movilidad	Ejemplos en el caballo
Fibrosa	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)
Cartilaginosa	Cartilago	Generalmente anfiartrosis	Sínfisis huesos púbicos
Sinovial	No conexión estructural entre extremos óseos: cavidad sinovial	Siempre diartrosis (amplio grado de movilidad)	Articulaciones del esqueleto apendicular (coxofemoral, húmero-radial, carpo-radial, interfalángicas, etc.)

Tabla 1- Tipos de articulaciones según sus características estructurales (tipo de conexión entre extremos óseos) y grado de movilidad permitido con ejemplos en el caballo (Liebich y König, 2005b).

Estas dos clasificaciones se relacionan por el hecho de que los huesos de las articulaciones inmóviles o poco móviles, están conectados por membranas fibrosas o

cartilagosas (sindesmosis o sincondrosis), mientras que las partes de los componentes óseos de las articulaciones móviles, están cubiertas por cartílago hialino, separadas por completo y contenidas dentro de la cavidad articular, la cual está cerrada por la membrana sinovial (articulación sinovial).

Las articulaciones sinoviales tienen dos funciones principales, dar movimiento y transferir cargas.

Las diartrosis incluyen la mayoría de las articulaciones sinoviales de las extremidades de los equinos.

En el caso del caballo, estas articulaciones son las que van a producir más patologías locomotoras (Caron, 2011; Liebich y König, 2005b; Van Weeren, 2016a).

Al ser las de mayor interés, se describirá en detalle su anatomía y fisiología.

2.1.2. Articulaciones sinoviales del caballo

Las principales articulaciones del aparato esquelético distal en los caballos son del tipo diartrosis, permiten un mayor grado de movilidad necesario para la locomoción. Dentro de estas articulaciones se pueden diferenciarse distintos tipos según las superficies articulares que las conformen, las estructuras periarticulares que le den sujeción y los tipos de movimientos que permitan (Barrachina, 2017).

Las articulaciones sinoviales están conformadas por huesos que en su superficie articular están recubiertos por cartílago hialino, y son mantenidos por la cápsula articular y las estructuras ligamentosas y tendinosas circundantes; entre dichas superficies articulares encontramos la cavidad articular que está conteniendo el líquido sinovial.

La cápsula articular está compuesta por dos partes, el estrato fibroso, localizado en la porción externa, que es una continuación del periostio o pericondrio y la membrana sinovial, la cual tapiza la cavidad sinovial en aquellos lugares donde el cartílago articular no está presente.

La porción fibrosa de la cápsula articular está compuesta por tejido conectivo fibroso denso, que proporciona estabilidad mecánica a la articulación. Los ligamentos colaterales están asociados con la cápsula articular y los ligamentos intraarticulares tienen normalmente una membrana sinovial que los cubre. Histológicamente la porción fibrosa de la cápsula y los ligamentos están compuestos por fibras colágenas (Tipo 1, predominantemente). Los nervios sensitivos se encuentran en la membrana sinovial, estrato subíntimo y ligamentos colaterales.

La estabilidad de la articulación está dada por la configuración ósea, los ligamentos y el soporte capsular, con la unidad músculo-tendinosa controlando a la misma. Además, hay una presión hidrostática negativa dentro de la cavidad sinovial de la articulación que también ayuda a mantener la estabilidad (Baxter, 2014).

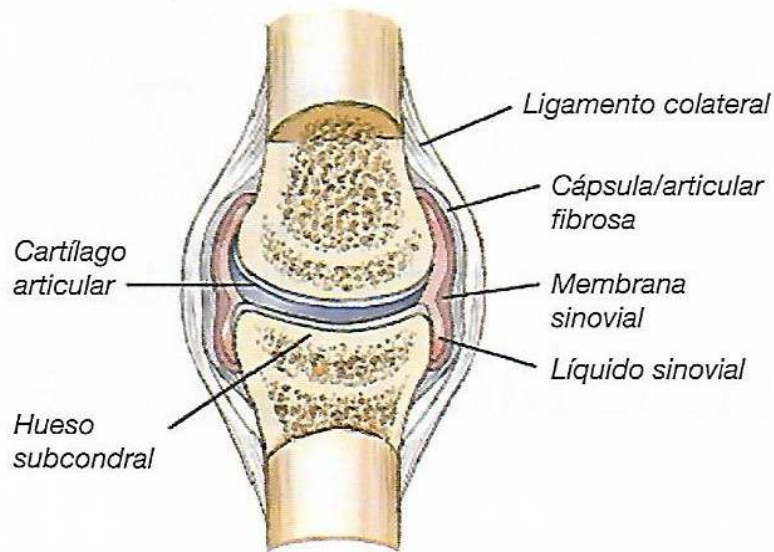


Figura 1. Esquema de una típica articulación sinovial (Baxter, 2014).

Las características y movilidad permitida de cada articulación van a influir en la forma en que se presenten y desarrollen ciertas patologías, como la osteoartritis (Kawcak, 2016).

En la Tabla 2 se presenta un resumen de las características de cada tipo de articulación sinovial (Liebich y König, 2005b).

Género	Superficies articulares	Medio de unión principal	Movimientos	Ejemplos en el caballo
Enartrosis	Cabeza-cavidad	Cápsula fibrosa	Todos	Coxo-femoral
Condíleas	Cóndilo-cavidad glenoidea	Ligamentos periarticulares	Todos menos rotación	Húmero-radial
Silla de montar	Cóncava-convexa	Cápsula fibrosa	Todos menos rotación	Interfalangiana proximal
Troclear o gínglimo	Tróclea-cresta	Ligamentos periarticulares	Flexión y extensión	Tibio-tarsal
Trocoide	Cilindro óseo que da vueltas sobre un eje	Ligamento transversal	Rotación	Atlanto-axial (C1-C2)
Artrodia	Caras planas o casi planas	Ligamentos periarticulares	Deslizamiento	Carpometacarpiana

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 (Liebich y König, 2005b).

2.1.2.1. 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 (MEC), ésta es el componente mayoritario del cartílago y sus elementos principales son agua (70-80%), colágeno y proteoglicanos (PGS). Del peso seco del cartílago, 50% corresponde a colágeno y 35% a los PGS aproximadamente, el resto lo componen diversas glicoproteínas, minerales y otros componentes minoritarios. El componente celular del cartílago es pequeño, conforma del 1% al 12% del volumen del tejido, dependiendo de la zona del mismo (McIlwraith, 2011; Van Weeren, 2016a).

En su aspecto macroscópico normal parece lechoso y opaco en las regiones más gruesas, pero se muestra translúcido y brillante en las regiones más delgadas. Sin embargo, la superficie no es lisa, por microscopía electrónica de barrido se ha mostrado la presencia de ondulaciones y depresiones irregulares.

El cartílago articular del caballo es en general de tipo hialino, pero también está presente el fibrocartílago en las articulaciones sinoviales, como en la unión del cartílago articular, la membrana sinovial, el periostio (zona de transición) y el menisco (Baxter, 2014).

Desde el punto de vista histológico ha sido dividido en cuatro estratos y los condrocitos tienen diferente aspecto dentro de cada uno de ellos.

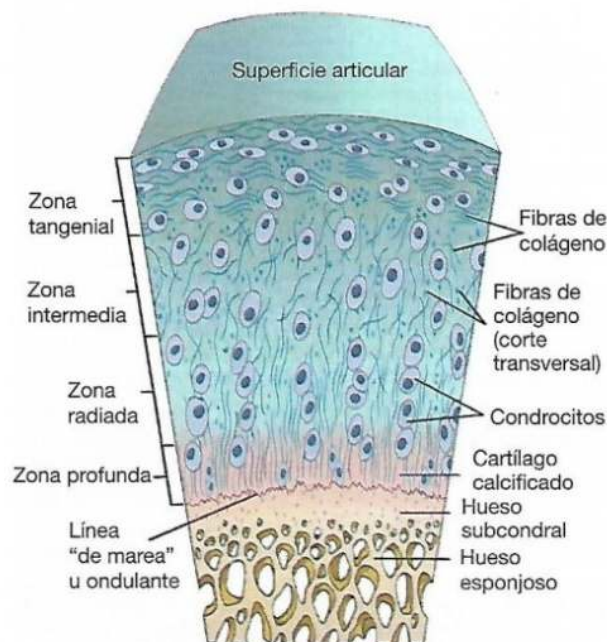


Figura 2. Esquema del cartílago articular adulto mostrando las 4 capas y el ordenamiento de los condrocitos y las fibras colágenas (Baxter, 2014).

La zona superficial consta principalmente de colágeno tipo II, en forma de fibras densamente agrupadas en orientación tangencial, con un contenido de PGS relativamente bajo pero alto en agua y condrocitos aplanados.

En la zona intermedia o de transición, los condrocitos tienen una morfología más redondeada y grande, en la matriz extracelular hay más abundancia de PGS, menos colágeno (con fibras orientadas al azar) y agua.

La zona profunda o estrato radiado en su matriz extracelular tiene menor contenido de agua y de colágeno, con una mayor concentración de PGS, los condrocitos están dispuestos en forma de columnas.

Finalmente, el estrato de cartílago calcificado está compuesto por cartílago mineralizado y condrocitos en diferentes grados de degeneración; es una interfaz entre las tres capas anteriores (que conforman la parte hialina del cartílago) y 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).

2.1.2.1.1. Componente Celular del Cartílago Articular

El tipo celular predominante en el cartílago articular son los condrocitos, pero al igual que en muchos tejidos también existe una población de células progenitoras, aunque su número es pequeño (McCarthy, Bara, Brakspear y Singhrao, 2012).

Pese a la baja presencia de condrocitos, su papel es imprescindible ya que son los encargados de sintetizar los componentes de la matriz extracelular del cartílago. Los condrocitos se encuentran separados entre ellos, rodeados por matriz extracelular. Al conjunto condrocito–matriz extracelular se lo conoce como condrón, constituyendo la unidad estructural, funcional y metabólica del cartílago hialino (Van Weeren, 2016a).

2.1.2.1.2. Principales Componentes de la Matriz Extracelular del Cartílago Articular

Las moléculas de colágeno tipo II son las más abundantes (90 – 95%) en la matriz extracelular del cartílago articular. Este forma uniones entre varias moléculas para dar lugar a filamentos de gran importancia para las propiedades mecánicas del cartílago. Se pueden encontrar otros tipos de colágeno, aunque no se conoce su papel con exactitud. Por ejemplo, colágeno tipo IX, XI y X que son abundantes en animales jóvenes, donde actúan como co-polímeros del colágeno tipo II o regulando la mineralización de la matriz extracelular.

El colágeno tipo III funciona como co-polímero y podría tener un papel en la respuesta al daño del cartílago articular (Van Weeren, 2016a; Baxter, 2014).

Los PGS constituyen otro componente sólido de la matriz extracelular. Constan de proteínas centrales y cadenas laterales de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG's).

Existe una gran variedad de PGS dependiendo de la proteína central y de los GAG's. El PGS más abundante en el cartílago articular es el agregano, caracterizado por sus cadenas de GAG's del tipo condritín sulfato (CS) (Van Weeren, 2016a; Baxter, 2014). Las cargas de las cadenas laterales de GAG's se repelen unas a otras y atraen una cobertura de hidratación. Estas proporcionan al cartílago articular una rigidez fisicoquímica y también afectan a la permeabilidad cartilaginosa (Baxter, 2014).

La longitud de la proteína central y de los GAG's tienden a disminuir a lo largo de la vida, viéndose afectadas las propiedades mecánicas del cartílago en individuos en edad avanzada (Lee, Han, Roughley, Grodzinsky y Ortiz, 2013).

También están presentes en menor medida en la MEC otros PGS ricos en leucina (SLRP's) (Schaeter y Iozzo, 2008).

El agregano se une al ácido hialurónico (HA) dando lugar a una conformación similar a las cadenas de GAG's con las proteínas centrales de PGS, formando agregados de PGS-HA que se intercalan con fibras de colágeno de la MEC (Heinegard, 2009).

El HA es también un GAG de tipo no sulfatado, es uno de los principales componentes de la MEC del cartílago articular y también es abundante en el líquido sinovial que baña la articulación (Van Weeren, 2016a).

A su vez existen otros componentes en la MEC, que se encuentran en menor proporción, pero tienen igual importancia, como por ejemplo las matrilinas que junto con los SLRP's dan coherencia estructural a la MEC, o las proteínas oligoméricas de la matriz, encargadas de agrupar moléculas de colágeno para facilitar el ensamblaje de la matriz (Caron, 2011; Van Weeren 2016a).

2.1.2.2. Hueso subcondral

Este consiste de una capa delgada de hueso compacto adyacente a la zona calcificada del cartílago, situado entre el cartílago articular y el hueso trabecular. Forma una parte integral de la estructura articular, dando soporte estructural al cartílago articular y aporta cierta rigidez al conjunto de la estructura articular.

El hueso se adapta a las cargas mecánicas que es sometido mediante un proceso de remodelación, lo que se traduce en un mayor espesor del mismo en aquellas zonas que soportan más carga. Distintos factores pueden influir sobre este patrón de carga, como por ejemplo el ejercicio (Kawcak, McIlwraith, Norrدين, Park y Steyn, 2000; Baxter, 2014). Pese a la relativa rigidez del hueso subcondral, este es más alterable que el hueso cortical, juega un importante rol biomecánico en la atenuación de fuerzas generadas por la locomoción y la actividad atlética. Por esto los cambios en la rigidez de esta estructura tendrán repercusiones en la carga mecánica que debe soportar el cartílago articular, lo que conduce a la teoría de que la esclerosis del hueso subcondral puede ser un factor iniciador de la osteoartritis, más que un efecto secundario de esta patología. Aunque se sigue considerando al cartílago articular como el tejido de origen de la osteoartritis, el proceso degenerativo y reactivo en éste y el hueso subcondral están estrechamente relacionados e influyen uno en el otro desde las etapas más tempranas de esta patología (Buckwalter y Brown, 2004; Barrachina, 2017).

El hueso subcondral a diferencia del cartílago articular tiene una vascularización e inervación más rica, lo que permite una respuesta completa de este tejido a los estímulos fisiológicos y patológicos. Su inervación 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).

2.1.2.3. Cápsula Articular y Líquido Sinovial

La cápsula articular de la mayoría de las articulaciones está formada por dos capas, la externa, que es una capa fibrosa relativamente rígida y su función principal es dar estabilidad a la articulación, contiene terminaciones nerviosas propioceptivas y nociceptivas, por lo tanto es el órgano sensitivo de la articulación. La capa interna de la cápsula articular se la conoce como membrana sinovial y consta de otras dos capas; íntima en contacto directo con el interior de la cavidad sinovial y la subíntima situada entre la íntima y la capa fibrosa. La subíntima está ricamente vascularizada e inervada, mientras que la 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.

Las células que constituyen la membrana íntima, son los sinoviocitos, poseen gran actividad excretora y se dividen en tres categorías principales, sinoviocitos tipo A que son macrófagos con función fagocítica; sinoviocitos tipo B que son células fibroblásticas encargadas de producir proteínas y otras moléculas como HA y GAG's, y secretarlas al líquido sinovial, produciéndole gran viscosidad; y los sinoviocitos tipo C que son una transición entre los A y B, son muy similares y pueden transformarse en un tipo o en el otro. Todos los otros sinoviocitos producen variedad de citoquinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, indispensables para el mantenimiento de la homeostasis de la articulación (Colahan, 1998; Van Weeren, 2016a). El líquido sinovial se describe como un ultrafiltrado plasmático al que las células sinoviales especializadas le agregan ácido hialurónico que le confiere su viscosidad característica, junto a su color amarillo claro.

Posee funciones de lubricar y de disminuir la fricción entre extremos óseos de la articulación, importante para que esta cumpla su función normal; también cumple un papel importante en el apoyo nutricional y la regulación metabólica del cartílago articular, sobre todo en animales adultos donde es avascular. El rápido e ilimitado intercambio de componentes entre la sangre y el líquido sinovial permite un eficiente aporte de nutrientes y retirada de productos de desechos (Colahan, 1998; Caron, 2011; Van Weeren, 2016a). El componente celular del líquido sinovial normal es muy bajo, no sobrepasa las 500 células/ μ l, y consiste principalmente en linfocitos y otras células mononucleares, mayoritariamente monocitos y macrófagos, y menos de un 10% de neutrófilos (Mahaffey, 2002). La concentración de proteínas en el líquido sinovial es de aproximadamente un 25 – 35% de la concentración plasmática de proteínas del mismo animal. Su valor normal documentado para caballos es $1.81 \pm$

0.26 g/dl, en general se considera normal 2 g/dl. La proteína presente en niveles más altos es la albumina (Baxter, 2014).

2.1.2.4. Estructuras intra-articulares

Algunas articulaciones cuentan con estructuras intra-articulares como ligamentos o meniscos, con el objetivo de proporcionar estabilidad mecánica extra o bien mejorar la geometría articular cuando la superficie de la misma ha de soportar una carga mayor, evitando así presiones excesivas en ciertas áreas. Una lesión en alguna de estas estructuras puede traer importantes consecuencias en la estabilidad articular y como resultado provocar una patología articular severa. Estas estructuras al ser inervadas causan dolor cuando se dañan. Al parecer no desempeñan un papel importante en la homeostasis de la articulación ya sea en situaciones fisiológicas o patológicas, su principal función es mecánica (Barrachina, 2017).

2.1.3. Región del carpo

Dado que esta es la articulación de elección para el estudio in vivo realizado en la presente tesis, se revisarán los principales aspectos relacionados con la misma.

2.1.3.1. Recuerdo anatómico de la articulación carpo-radial

El carpo del caballo consta de tres articulaciones formadas por las dos filas de huesos carpales, el extremo distal del radio y el extremo proximal de los metacarpianos.

La articulación más proximal del carpo es la radio-carpiana, formada por el extremo distal del radio y la fila proximal de huesos carpales (carpo radial, intermedio, carpo cubital y accesorio); esta articulación puede ser flexionada 90°. Siguiendo en orden distal, se encuentra la articulación intercarpiana, formada por ambas filas de huesos carpales, la fila proximal y la fila distal (carpal II, III y IV); esta articulación puede ser flexionada 45°. Finalmente, la articulación más distal es la carpo-metacarpiana, formada por la fila distal del carpo y el extremo proximal de los huesos metacarpianos (MC II, III y IV); esta articulación no permite el movimiento de flexión. En el caballo el cúbito no participa en esta articulación ya que se fusiona con el radio. La articulación radio-carpiana se considera aislada de las otras articulaciones, mientras que las articulaciones intercarpiana y carpo-metacarpiana, se comunican.

La fila proximal de la articulación radio-carpiana, está formada por cuatro huesos carpales, siendo de medial a lateral, carpo-radial (escafoides), intermedio (semilunar) y el carpo cubital (piramidal), a caudal de este se encuentra el hueso accesorio (pisiforme). El hueso accesorio articula con la porción distal del radio en su parte proximal y con el hueso carpo cubital en su cara dorsal, y conforma el borde lateral del canal carpiano por el cual corren 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 es un componente importante para el soporte de esta estructura. Esta es densa en su parte dorsal, donde se inserta el retináculo extensor. Los tendones extensores carpo-radial, digital común, digital lateral, discurren respectivamente de forma dorsal, dorso-lateral y lateral al carpo.

En la cara dorsal del extremo distal del radio presenta unos surcos por donde deslizan los tendones extensores carpo-radial y digital común.

En la articulación radio-carpiana, en flexión, se pueden palpar dos depresiones, una dorso-lateral y otra dorso-medial, correspondientes a recesos articulares, por las que puede hacerse el abordaje a las mismas (Liebich y Köing, 2005a; Roso, 2011; Baxter, 2014).

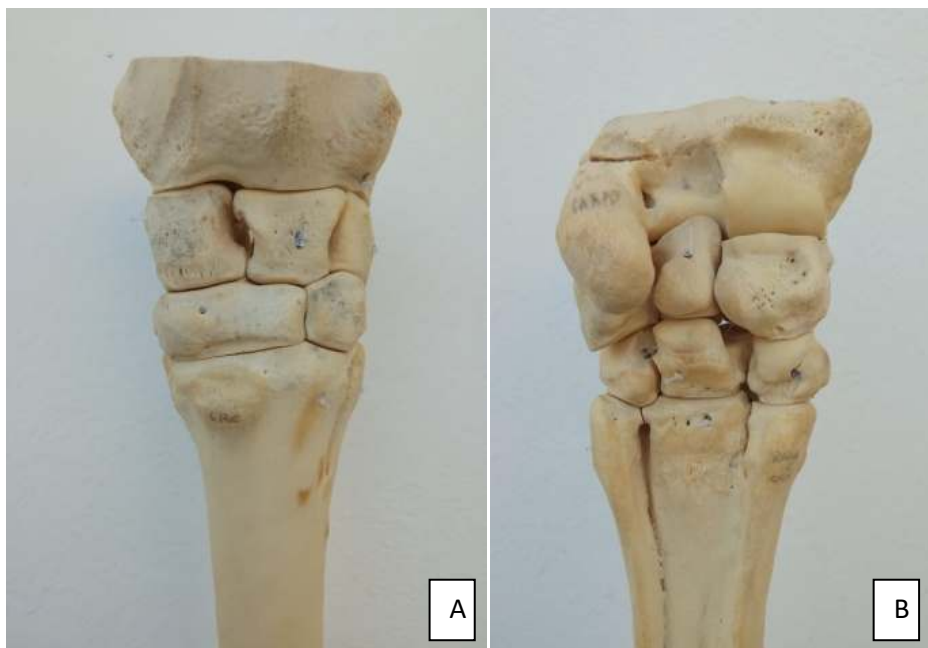


Figura 3. Vista dorsal (A) y palmar (B) de carpo izquierdo normal. (Foto cortesía Br. C. Gallego).

2.1.3.2. Principales Patologías

La osteoartritis es a nivel del carpo la patología más común, sobre todo en caballos deportivos. El estrés repetido que sufren los huesos carpales produce una esclerosis del hueso subcondral, por lo que el cartílago que lo recubre se encuentra con un soporte demasiado rígido y también se lesiona, comenzando de esta forma el proceso de osteoartritis, pudiendo fragmentarse el área afectada, generando un fragmento osteocondral.

Estos fragmentos no deben confundirse con osteocondrosis, ya que es rara su presencia en la articulación radio-carpiana.

Se pueden encontrar fragmentos osteocondrales en esta articulación sin que medie este proceso, sino a consecuencia de un traumatismo único y agudo (de la misma haremos referencia más adelante ya que es la patología hacia la cual hemos orientado esta tesis).

Otras patologías de relativa frecuencia en esta región (pero a las que no se hará referencia en este trabajo) incluyen la artritis séptica, la enfermedad degenerativa articular, otros tipos de fracturas articulares y diversas afecciones de tejidos blandos asociados. Asimismo, afecciones de los ligamentos intercarpales o tendones adyacentes también pueden repercutir en la articulación radio-carpiana.

2.1.3.3. Diagnóstico

2.1.3.3.1. Examen Físico

La claudicación carpiana es extremadamente común en los caballos PSC de todas las edades, y en especial en los jóvenes. El carpo es una articulación compleja, susceptible de sufrir una multitud de lesiones asociadas con el entrenamiento y las carreras. El estrés está involucrado en la mayoría de las lesiones óseas, cartilaginosas y de tejidos blandos del carpo. Las afecciones comunes incluyen sinovitis y/o capsulitis, desgaste y erosión del cartílago, y lesiones óseas relacionadas con estrés del tercer carpiano. También pueden ocurrir numerosas fracturas en pequeños fragmentos de las articulaciones radio-carpiana e intercarpiana (Baxter, 2014).

Un caballo con patología de la articulación radio-carpiana puede presentar diferentes grados de claudicación, efusión sinovial, inflamación de tejidos blandos periarticulares o flexión del carpo cuando está en estación. Cuando se aprecia una inflamación severa o se conoce una historia previa de trauma en esta región, el diagnóstico de la claudicación es sencillo de orientar. 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, se rehúsa al salto, tropezar o bajada del rendimiento deportivo en general. El aumento de la temperatura local en la superficie dorsal del carpo es un indicador bastante fiable de la presencia de un problema en la región. La efusión sinovial es también considerada indicativa, pero puede haber lesión sin efusión. El grado de flexión está normalmente disminuido en caballos con osteoartritis 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. El test de flexión del carpo es específico, y cuando es positivo, el origen de la claudicación se localiza con muy alta probabilidad en la región del carpo, aunque no necesariamente en la articulación, sin embargo una respuesta negativa no excluye al carpo como estructura lesionada (Ross, 2011; Kawcak y Barrett, 2016).



Figura 4. Vista frontal de un carpo con fractura del carpo ulnar. (Fuente propia)



Figura 5. Flexión del carpo para identificar una respuesta dolorosa. (Fuente propia)

2.1.3.3.2. Anestésias diagnósticas

El uso de anestesia intrasinovial desempeña un papel importante en el diagnóstico de la claudicación en equinos. En la mayoría de los casos, es más específico y eficiente anestesiarse la estructura sinovial en particular (cápsula articular) que se piensa es la causa de la claudicación, que realizar la anestesia local perineural.

Esto es especialmente válido en caballos que tienden a tener problemas articulares o cuando los hallazgos clínicos sugieren un compromiso de una estructura sinovial (Baxter, 2014).

El resultado puede arrojar falsos negativos por ejemplo cuando hay afección del hueso subcondral, o falsos positivos en caso de afección en la inserción del ligamento suspensor del nudo, que puede verse desensibilizada (Barrachina, 2017).

Al realizar la punción para administrar el anestésico, se puede aprovechar para obtener una muestra de líquido sinovial, para análisis de laboratorio y valoración macroscópica.



Figura 6. Arthrocentesis. (Fuente propia)

2.1.3.3.3. Examen radiológico

El estudio radiológico puede ser una herramienta diagnóstica muy útil para la región del carpo, aunque debe tenerse en cuenta ciertas limitaciones, ya que debido a la configuración anatómica del mismo y a 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 osteólisis y de afección subcondral de los huesos carpales (Ross, 2011).

Los exámenes radiográficos son de ayuda para evaluar el tipo y la extensión de la enfermedad articular. Las manifestaciones radiográficas de la enfermedad articular son evidentes en tejidos blandos y estructuras óseas, y pueden desarrollarse antes o después de la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad (Baxter, 2014).

Los cambios radiográficos en tejidos blandos incluyen engrosamiento de tejidos blandos periarticulares, distensión de cápsula articular y mineralización. En los bordes articulares se va a desarrollar formación de osteofitos periarticulares y lisis ósea. Los cambios óseos subcondrales incluyen esclerosis, lisis y fragmentación. Otros hallazgos son el aumento o disminución del espesor del espacio articular; los entesofitos periarticulares asociados por lo general con el daño de la cápsula articular o avulsión de ligamento o tendones desde su inserción ósea.

Las anomalías de alineamiento pueden consistir en subluxación o luxación de una articulación, o simplemente puede ser el resultado de un anormal grado de flexión o extensión de una articulación en reposo (Baxter, 2014).

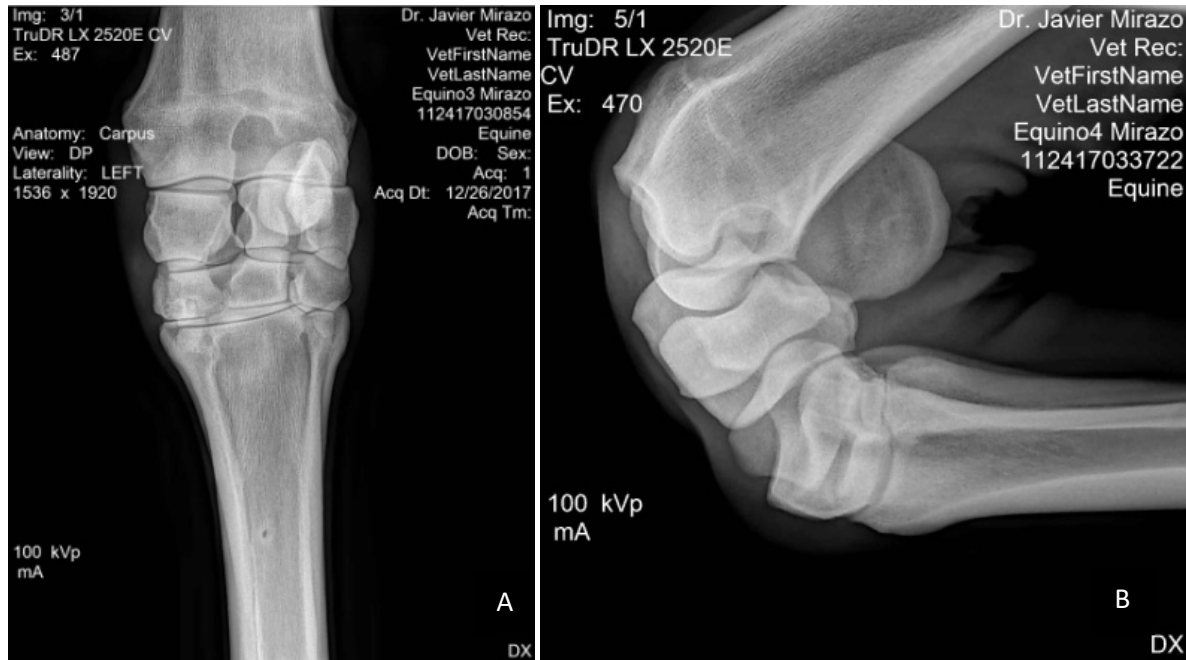


Figura 7. Imagen radiográfica DP (A) y LM en flexión (B). (Fuente propia)

2.1.3.3.4. Ecografía

La ecografía ha permitido un avance significativo en el diagnóstico y el manejo de varias lesiones musculoesqueléticas en los caballos deportivos (Baxter, 2014).

Por ejemplo, permite evaluar 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-carpiana. Además, permite valorar el grado de efusión sinovial, el estado de la cápsula articular y los bordes articulares en caso de alteraciones de la articulación radio-carpiana (Ross, 2011).



Figura 8. Imagen ecográfica transversal de una tenosinovitis séptica del extensor carpo radial, la línea punteada indica ensanchamiento del mesotendón (Atlas of equine ultrasonography, 2014).

2.1.3.3.5. Otras técnicas de imagen

Aunque la radiografía ha sido descrita con más detalle por haber sido la técnica utilizada *in vivo* en esta tesis de grado, existen otras técnicas de imagen, aparte de la radiografía y la ecografía, que pueden ser utilizadas en caso de patologías en la región del carpo.

La artroscopía, además de utilizarse para realizar intervenciones quirúrgicas terapéuticas, posterior al descubrimiento radiográfico de un fragmento óseo, el cual se desea extraer, es también una técnica diagnóstica que permite la visualización directa del cartílago. La resonancia magnética es capaz de detectar pequeñas lesiones en el cartílago y hueso subcondral que son inapreciables con otras técnicas como la radiografía. Además, permite valorar tejidos blandos de difícil acceso como ligamentos intercarpales.

La tomografía computarizada resulta útil para determinar la extensión de una lesión y guiar mejor el tratamiento, como en caso de fracturas (Barrachina, 2017). Tanto la resonancia magnética como la tomografía computarizada, son técnicas que no están presentes en nuestro país, pero sí en la región, como por ejemplo Argentina y Brasil.

2.2. Artritis traumática

2.2.1. Definición

El término “artritis traumática” incluye una cantidad de estados patológicos y clínicos que se desarrollan después de episodios únicos (trauma agudo) o repetitivos (trauma crónico) de traumas y pueden incluir uno o todos los siguientes signos:

- 1- Sinovitis (inflamación de la membrana sinovial).
- 2- Capsulitis (inflamación de la cápsula fibrosa articular).
- 3- Desgarros (lesión de ligamentos específicos asociados con la articulación).
- 4- Fracturas intraarticulares.
- 5- Desgarro meniscal (articulación femorotibial).

Cualquiera de las situaciones antes mencionadas puede progresar a una Osteoartritis (Baxter, 2014).

Las artritis traumáticas pueden clasificarse en tres grupos:

Tipo 1: sinovitis y capsulitis traumática sin alteración del cartílago articular o disrupción (rotura brusca) de las principales estructuras de soporte. Esto incluye sinovitis aguda y la mayoría de los esfuerzos.

Tipo 2: trauma disruptivo con lesión del cartílago articular o rotura completa de las principales estructuras de soporte. Este grupo incluye esfuerzos graves, desgarros meniscales y fracturas intraarticulares.

Tipo 3: osteoartrosis postraumática, incluye trauma disruptivo como presencia de lesión residual. Los pacientes pueden tener deformación, movimiento limitado o inestabilidad de la articulación.

2.2.2. Síntomas y diagnóstico

Aunque la mayoría de los animales con fracturas intraarticulares del carpo muestran signos clínicos de inicio agudo, el daño es progresivo en el tiempo, al menos en los caballos de carrera, y ocurre en sitios constantes, en la cara dorsal de la articulación. La lesión es el resultado final de un proceso crónico que produce el daño en el hueso subcondral relacionado con estrés. Puede producirse la fractura aguda y la fragmentación del carpo, pero éstas suelen presentarse en localizaciones inusuales, en especial en la cara palmar de las articulaciones. En esta tesis de grado lo que se buscó fue inducir una microlesión intraarticular traumática aguda, en la cara dorsal del carpo, específicamente en la región distal del hueso carpo-radial, mediante un proceso quirúrgico inducido por artroscopía.

Tres tipos de fracturas pueden ocurrir dentro de las articulaciones del carpo del caballo: fractura osteocondral (realizada en este estudio), fractura laminar y fractura conminuta. En fracturas osteocondrales, con frecuencia son vistos múltiples fragmentos pequeños, que muchas veces pueden ser bilaterales. La porción distal del hueso radial del carpo es el sitio más común para estas fracturas, seguido por la parte

proximal del hueso intermedio del carpo. Es común observar fragmentos en la parte distal del hueso radial del carpo en ambas articulaciones carpianas medias y en la parte proximal del hueso intermedio del carpo en ambas articulaciones antebrachiocarpianas en el mismo caballo (Baxter, 2014).

El desarrollo de la fragmentación de las articulaciones del caballo tiene dos orígenes principales, lesiones traumáticas (agudas o crónicas) y osteocondritis disecante.

En los caballos con fracturas en el carpo, puede aparecer un grado variable de claudicación, efusión sinovial, tumefacción de los tejidos blandos y flexión del carpo durante la estación. Si el daño osteocondral es completo e ingresa a la articulación, es común que se desarrolle una sinovitis, la que genera signos clínicos de efusión sinovial y dolor articular. Sin embargo, cuando solo se produce daño en el hueso subcondral, la sinovitis que conduce a la efusión articular puede no ser apreciada, y el caballo puede o no dar una respuesta positiva a la flexión carpiana. Los caballos con pequeños fragmentos osteocondrales en el carpo suelen tener una sutil claudicación con una leve cantidad de efusión y tumefacción de los tejidos blandos.

La característica común es la abducción de los miembros anteriores, intentando minimizar la flexión del carpo. En consecuencia, esto disminuye la altura del arco de vuelo del pie.

Los caballos con daño osteocondral suelen mostrar una respuesta positiva a la flexión y con algunas fracturas evidencian intenso dolor aún con flexión pasiva.

En los estadios más crónicos de fracturas osteocondrales, puede haber limitaciones físicas en el carpo, con dolor o sin él.

La anamnesis, los signos clínicos descriptivos, un correcto y completo examen físico, nos orientan al diagnóstico. La presencia de fragmentación se confirma por medio de radiografías, las cuales serían ideales realizarlas antes que la analgesia intrasínovial, ya que con la pérdida del dolor el caballo ya no protegerá el miembro, y posiblemente sufra un daño mayor. Si se presenta una claudicación sutil o las radiografías no son concluyentes, si es necesario realizar la analgesia intraarticular para confirmar el sitio de origen del dolor. Para ello se inyectan aproximadamente 10mL de anestésico local (lidocaína 2% o mepivacaina 2%), en la articulación radiocarpiana o intercarpiana, esta se puede realizar con un abordaje dorsal (se lleva a cabo con el carpo flexionado) o palmar (se realiza con el miembro en apoyo).

Debido a que la articulación intercarpiana se comunica con la carpo-metacarpiana, los anestésicos inyectados desensibilizan ambas articulaciones.

Los puntos de inyección de la articulación radio carpiana e intercarpiana se localizan en depresiones palpables hacia lateral y medial del tendón extensor carpo-radial, sobre la cara dorsal de cada articulación. Se realiza con aguja calibre 20 y 25 mm a mitad de camino entre el extremo distal del radio y la fila proximal de huesos del carpo (articulación radio-carpiana) o entre fila proximal y distal de los huesos del carpo (articulación intercarpiana).

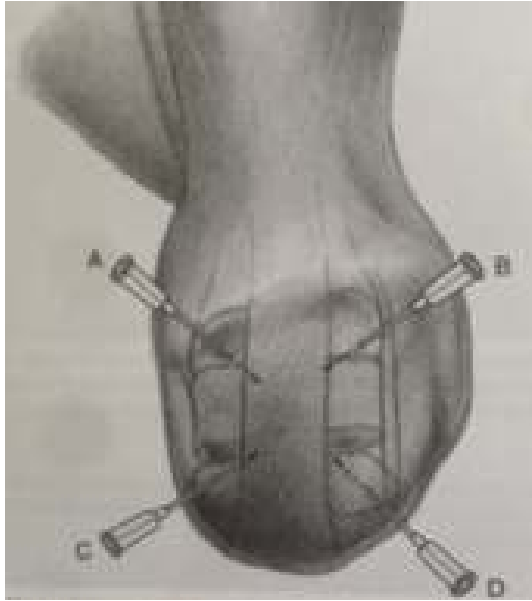


Figura 9. Vista craneal de los sitios de inyección del carpo. Las agujas pueden ingresar a la articulación radiocarpiana (A y B) o intercarpiana (C y D), en posición lateral o medial al tendón extensor carpo-radial. (Baxter, 2014).

Para el diagnóstico radiográfico, se requiere realizar varias incidencias (incluyendo la antero-posterior (AP), latero-medial (LM), dorsolateral-palmaromedial oblicua (DLPMO), dorsomedial-palmarolateral oblicua (DMPLO) y lateromedial flexionada (LMFlex)), para lograr una completa caracterización de las articulaciones carpianas, y en especial en aquellos casos con fragmentos pequeños. Las imágenes deben ser evaluadas en búsqueda de daño osteocondral (ejemplo, lisis de hueso subcondral), así como también cambios osteoartroticos (como por ejemplo, osteofitos, entesofitos y estrechamiento del espacio articular), ambos miembros deben ser evaluados radiográficamente porque más del 50% de todos los caballos con fragmentos osteocondrales tienen lesiones en ambos carpos (Baxter, 2014).



Figura 10. Imagen radiográfica que muestra un pequeño fragmento sobre la cara distal del hueso carpo-radial (flecha). (Baxter, 2014).

Otras lesiones importantes incluyen fracturas más grandes, fracturas laminares y conminutas. Las fracturas laminares suelen comprometer todo el carpo, aunque son más comunes en el tercer carpiano, pueden afectar también los huesos intermedio del carpo y carpo-radial. Las fracturas conminutas del carpo, se producen ocasionalmente, la mayoría de las veces comprometen el tercer carpiano, también pueden afectar los huesos carpo-radial, intermedio y cuarto-carpiano.

Los caballos que sufren esta fractura suelen ser inestables a nivel axial, requieren estabilización de emergencia y por lo general cirugía para alcanzar la normalidad como reproductores.

Además de la fragmentación y la fractura del carpo, es común encontrar lisis del hueso subcondral que produce dolor.

2.2.3. Tratamiento

Cuando se diagnostica una patología articular, el objetivo clínico ideal debería ser no solo frenar la progresión de la lesión, sino además reparar los daños producidos.

Desafortunadamente los tratamientos convencionales solo pueden aspirar a intentar enlentecer el progreso de la lesión y así demorar que se produzcan cambios degenerativos en la articulación.

El tratamiento de las patologías articulares es complejo debido a que las estructuras que normalmente resultan afectadas, la membrana sinovial, el cartílago articular o el hueso subcondral, poseen una vascularización deficiente.

Alguno de los tratamientos articulares más utilizados en la clínica equina hasta la actualidad son básicamente, el uso de corticoides intraarticulares, ácido hialurónico, glucosaminoglicanos polisulfatados, lavados articulares y tratamiento quirúrgico como la artroscopía. Debido a sus resultados limitados, se plantea la necesidad de disponer de tratamientos que busquen la reparación de los defectos que se pueden producir y de este modo regenerarse las alteraciones provocadas por los procesos patológicos. Estos tratamientos se engloban dentro de la medicina regenerativa.

La elección del tratamiento va a depender de los hallazgos físicos, el tipo de lesión y su localización, otros factores que se deben tener en cuenta es la edad, el sexo y la función que se pretende del animal.

2.2.3.1. Tratamientos médicos

El tratamiento conservador para caballos con fracturas en astillas no desplazadas, consta de varias etapas para lograr el éxito del mismo. Se debe iniciar con reposo en box durante 6 a 12 semanas, a partir de la sexta semana, se pueden realizar caminatas de tiro a diario. Posterior a este período y dependiendo de su evolución, a partir del tercer o cuarto mes, se puede comenzar con ejercicio libre. En lo que respecta al entrenamiento propiamente dicho se podría iniciar a partir del 6 u 8 mes de producida la lesión, periodo que puede ser suficiente para permitir la cicatrización

adecuada de la fractura. Estos tiempos pueden variar dependiendo del tipo y tamaño de la lesión.

Los AINES, como la fenilbutazona o flunixin de meglumine, pueden ser utilizados en un primer momento para disminuir el proceso inflamatorio agudo. La aplicación intrasinovial de corticoides (triamcinolona, flumetazona entre otros) también es utilizada, aunque esta maniobra retrasa el proceso de cicatrización y enmascara los signos inflamatorios, con mayor frecuencia se utilizan los corticoides intraarticulares, para lograr un regreso más rápido a la actividad deportiva del caballo.

Las inyecciones intrasinoviales o intravenosas de ácido hialurónico y las intramusculares de glucosaminoglicanos polisulfatados, pueden ser beneficiosas para disminuir la sinovitis, la destrucción progresiva del cartílago y la formación de osteofitos. También se han utilizado tratamientos auxiliares como revulsivos tópicos y herrajes correctivos, pudiendo ser beneficiosos.

Otra técnica utilizada como tratamiento para determinadas patologías articulares, es el lavado articular, el mismo es utilizado por ejemplo en artritis sépticas o para eliminar desechos cartilaginosos. Este se puede realizar con el paciente en estación o bajo efectos de anestesia general. Se rasura y se prepara asépticamente la articulación, posteriormente se introducen dos agujas calibre 12 a 14 G en la zona. Por una de ellas colocamos suero fisiológico y por la otra, sale el mismo con los desechos que se encontraban en la respectiva articulación. Una vez efectuado el lavado, se pueden administrar alguno de los fármacos antes mencionados, como por ejemplo ácido hialurónico. Los resultados clínicos en caso de sinovitis aguda, son realmente gratificantes.

2.2.3.2. Abordaje Quirúrgico

La artroscopía se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico y el tratamiento de las alteraciones ortopédicas de varios espacios sinoviales en el equino. Esta técnica posee varias ventajas; es mínimamente invasiva, brinda información detallada sobre las estructuras intrasinoviales accesibles, permite el tratamiento directo de diversas lesiones en estas estructuras, y la eliminación concurrente de enzimas inflamatorias degradantes mediante el lavado. Pero también tiene sus desventajas; como la necesidad de realizarlo bajo anestesia general, el costo del equipamiento requerido y por último la dificultad de la técnica.

La cirugía artroscópica siempre debe realizarse bajo condiciones asépticas rigurosas. Es esencial contar con un equipo de buena calidad y que el cirujano tenga un buen conocimiento anatómico, de la técnica y la coordinación necesaria para llevarla a cabo (Walmsley, 2004).

Una vez que el caballo se encuentre bajo anestesia general, la mayoría de los cirujanos prefieren que al animal se lo coloque en decúbito dorsal, para facilitar el acceso tanto por la puerta artroscópica medial como lateral de ambos carpos, sin movilizar al caballo y para disminuir la hemorragia intraquirúrgica. Después de colocar

los campos estériles, se flexiona la articulación en 70°, de forma tal que las articulaciones radiocarpianas e intercarpianas puedan identificarse.

La localización del portal por el cual debe ingresar el artroscopio, se realiza sobre el punto opuesto a la ubicación de la lesión.

En el carpo las incisiones cutáneas se realizan dorsalmente, en la depresión entre el tendón extensor carpo-radial y el tendón extensor digital común lateralmente, y medial al tendón extensor carpo-radial, entre la fila distal y medial de los huesos carpianos (Stashak, 2004; Walmsley, 2004).

Una vez efectuadas las incisiones cutáneas en sus respectivas localizaciones se procede a distenderse la articulación con suero fisiológico, para posteriormente incidir la capsula articular e ingresar con el artroscopio.

Con el artroscopio ya en la luz articular se debe realizar una exploración completa para identificar las lesiones esperadas y las no esperadas. Luego de localizadas las lesiones son evaluadas con el fin de realizar el procedimiento que corresponda, dependiendo de dicha lesión. Siempre en lo posible el hueso anormal y el cartílago desgastado se extraen hasta encontrar hueso normal y se lava las articulaciones con un gran volumen de solución fisiológica estéril para eliminar los desechos. En general la membrana sinovial no se retira a no ser que exista un proceso infeccioso o se presente una gran irritación focal.

Posterior a esto, se realiza una exploración final para corroborar que todo haya salido bien. Luego se sutura la piel incidida con uno o dos puntos simples (con material no absorbible, monofilamento) y se realiza un vendaje que se debe mantener hasta que se quiten los puntos (10 días aproximadamente).

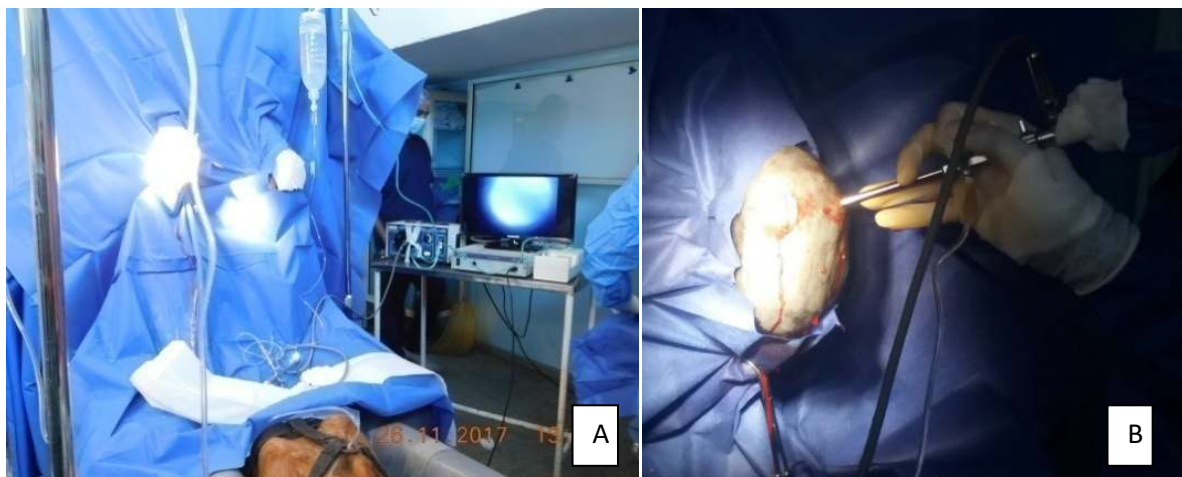


Figura 11. Campos quirúrgicos estériles (A) y posicionamiento del artroscopio en articulación intercarpiana (B). (Fuente propia)

2.2.3.3. Terapias físicas

La rehabilitación y la fisioterapia, son modalidades que cada vez se extienden más en la clínica equina ya que tienen un papel importante en el mejoramiento del rendimiento, la prevención de lesiones o el restablecimiento de la función completa durante la recuperación de una lesión (Baxter, 2014). 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 crioterapia, termoterapia, ondas de choque extra corporales, laser de bajo nivel, ultrasonido terapéutico, las distintas modalidades de hidroterapia o el uso de dispositivos y ejercicios para mejorar la propiocepción.

Estos métodos parecen tener un potencial beneficioso para los pacientes, aunque todavía se sabe poco sobre que método es el más adecuado para cada situación en particular, por lo que para su uso apropiado se requiere identificar previamente el problema y los objetivos de la rehabilitación; cada caso particular, la fase de la patología en que se encuentra y los objetivos a lograr durante la misma, requiere un protocolo de rehabilitación concreto (Porter, 2005;Haussler y King, 2016;Kaneps 2016;Barrachina., 2017).

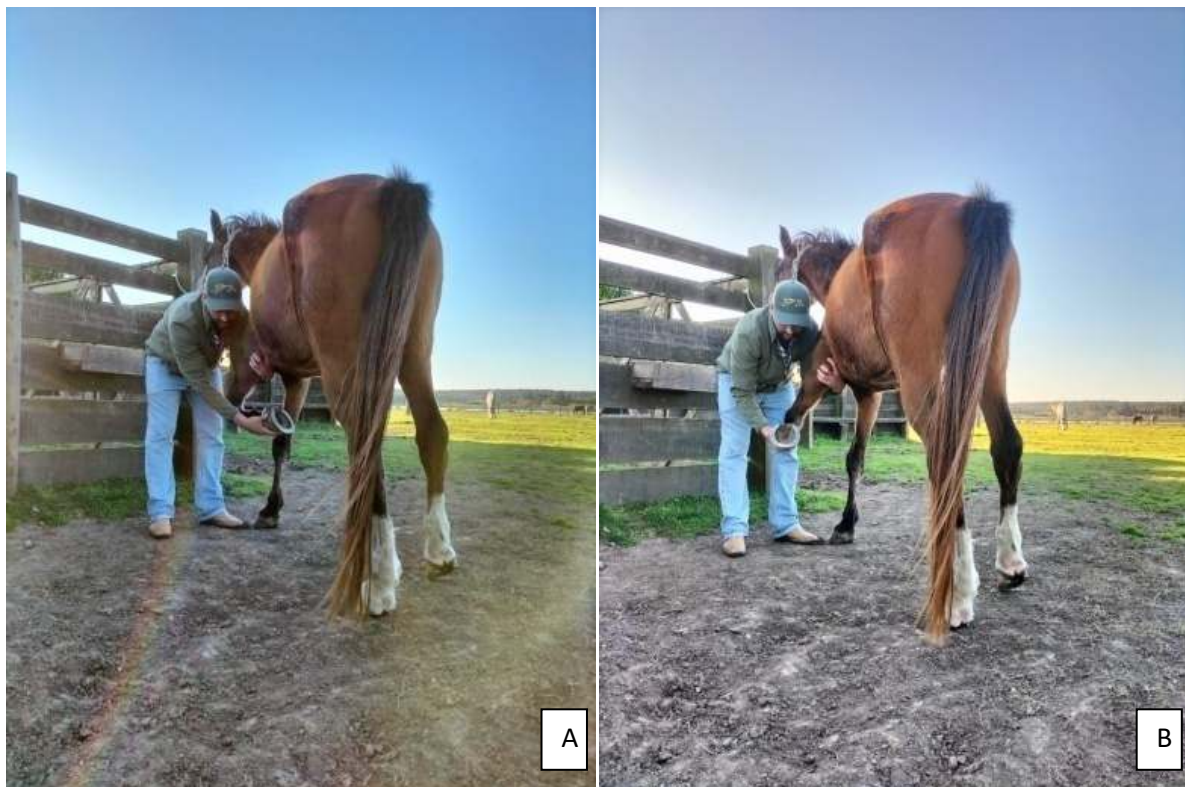


Figura 12. Técnica de terapia manual por movilización. Una combinación de técnicas de movilización fisiológica pasiva y accesoria pasiva es aplicada en el carpo para aumentar el rango de movimiento en flexión. El carpo es flexionado, el radio es estabilizado y se aplican movimientos hacia media (A) y lateral (B) hasta el final del rango a través del tercer metacarpiano. (Fuente propia)

2.2.3.4. Terapias regenerativas

La base de estos tratamientos es aprovechar los procesos de regeneración que se producen de manera fisiológica en el organismo, mediante la activación y potenciación de una gran variedad de moléculas endógenas que intervienen en los mismos, intentando restaurar la función del tejido dañado. Lo que se plantea con estas estrategias para el tratamiento de este tipo de lesiones, es utilizar células y factores que ayuden a la regeneración de la matriz extracelular que conforman el tejido dañado para que lo haga de la forma más parecida al original.

Los preparados “autólogos” que pueden aportar factores de crecimiento al tejido lesionado son el uso de células madre mesenquimales (CMM) y plasma rico en plaquetas (PRP) (Hernández, 2017). El PRP es un preparado hematológico que se obtiene por centrifugación de la sangre extraída con anticoagulantes del mismo paciente (Carmona y López, 2011). El producto final de dicho proceso contiene células madre, mediadores anabólicos y otras proteínas mitogénicas que atraen otros componentes participantes de la reparación articular (Robinson y Sprayberry 2012; Reynals, Cortez y Rosatti, 2019). Las plaquetas son una fuente de factores de crecimiento y otras proteínas que estimulan la reparación tisular, reducen la inflamación, inducen quimiotaxis en células mesenquimales, causan proliferación y diferenciación celular, y favorecen la neovascularización (Sandoval, López y Carmona, 2013; Reynals et al., 2019).

2.3. Células madre

Las células madre son aquellas células indiferenciadas, presentes en distintos tejidos y durante distintas fases del desarrollo, con capacidad auto renovadora y de diferenciarse a otros tipos celulares.

Las células madre presentan dos tipos de divisiones, simétrica y asimétrica. En la división simétrica se dividen para dar dos células hijas que conservan las mismas propiedades de células madre; mientras que la división asimétrica da lugar a células progenitoras en un estado más diferenciado que las células madre iniciales, proporcionando la capacidad de diferenciación de las células madre (Whitworth y Banks, 2014).

Las clasificaciones más conocidas son las que se refieren a su potencial de diferenciación y a su origen (Bongso y Eng, 2011).

Según su potencial de diferenciación podemos clasificar a las células madre en:

- Totipotentes: tienen potencial para dar lugar a tejidos embrionarios y en cualquiera de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y los anexos embrionarios.
- Pluripotentes: pueden diferenciarse a tipos celulares de cualquiera de las tres capas embrionarias.

- Multipotentes: son capaces de diferenciarse a distintos tipos de células especializadas presente en un tejido u órgano habitualmente de la misma línea celular de ascendencia embrionaria.
- Unipotentes: solo son capaces de diferenciarse al tipo celular del tejido donde residen.

Otras formas de clasificar a las células madre es teniendo en cuenta el origen de donde proceden:

- Células Madre Embrionarias: son las células encontradas en las primeras fases del embrión y son pluripotentes.
- Células Madre Adultas: están en tejidos y órganos de los individuos adultos y son multipotentes.

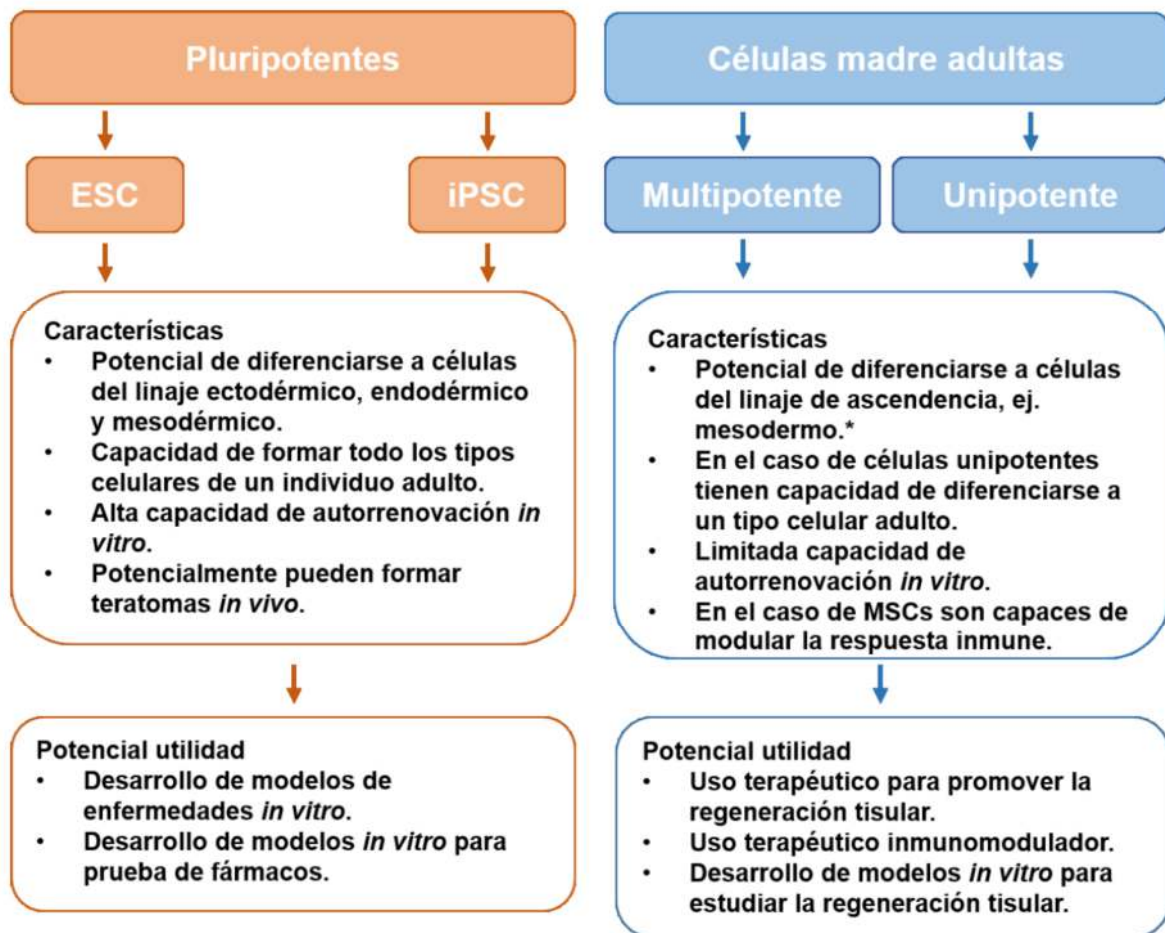


Figura 13. “Esquema de la clasificación de las células madre por su capacidad de diferenciación. Se mencionan principales características, utilidades terapéuticas y biotecnológicas conocidas en la actualidad, existe el fenómeno de trans diferenciación *in vitro* de las MSCs” (Yaneselli, 2019).

2.3.1. Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMM) conocidas en la literatura internacional como *mesenchymal stromal/stemcells* (MSCs) son células madre adultas que derivan de la capa embrionaria del mesodermo, por lo que van a ser capaces de diferenciarse a células que conforman los tejidos derivados de esa misma capa, como son hueso, cartílago, músculo, estroma medular, tendones, ligamentos, tejido adiposo y otros tejidos conectivos. La capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse a estos tejidos, ya que también se ha desarrollado capacidad de diferenciación a células de otras capas, como por ejemplo tejido neurogénico, células pancreáticas o células hepáticas. (Karnieli, 2007).

Las CMM pueden encontrarse en una gran variedad de tejidos del individuo, como médula ósea, tejido adiposo, músculo, periostio, sangre periférica, corazón, pulmón, riñón, cerebro, timo, páncreas, piel, tejido dentales, tendón, membrana sinovial y líquido sinovial (De Sousa, Casado, Moura, Duarte y Aguiar, 2014), entre otros. De hecho, por su gran capacidad de migración, se considera que las células madre mesenquimales están presentes en prácticamente todo el organismo, encontrándose en nichos perivasculares, listas para salir al torrente sanguíneo y desplazarse a donde sea necesario (Da Silva Meirelles, Chagastelles y Nardi, 2006). Además, también pueden encontrarse en algunos tejidos neonatales y asociadas al nacimiento, como sangre, cordón umbilical, líquido amniótico o la placenta (Barrachina, 2017).

Actualmente las CMM que se estudian con mayor frecuencia, por su fácil acceso, son las derivadas de médula ósea y tejido adiposo, de las cuales profundizaremos, ya que son las de interés en la presente tesis. También hay un creciente interés en las CMM derivadas de tejido neonatales por su obtención no invasiva, su mayor potencia de proliferación y su baja inmunogenicidad (De Schauwer et al., 2014; Li, Xia, Gao, Chen y Xu, 2015c).

2.3.1.1. Características de las Células Madre Mesenquimales

Con el fin de estandarizar el estudio de las CMM, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT) propuso los requisitos que las células deben cumplir (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 de CD 105 (endoglina), CD 73 (SH2 y SH3), CD 90 (Thy-1).
 - Negativos: debe ser menos de un 2 % de células positivas para CD 45 (marcador de leucocitos y células endoteliales), CD 34 (marcador hematopoyético), CD 14 o CD 11b y CD 79 α o CD 19 o HLA-DR (MHC-II).
- 3- Multipotencia: capacidad de diferenciarse a osteoblasto, adipocito y condrocito.

Estos criterios se definieron estrictamente para la especie humana, pero para los animales como criterio de referencia se menciona a la prueba de multipotencialidad *in vitro* conocida como el ensayo de tridiferenciación *in vitro*. Debido que la multipotencia

es el criterio de referencia, vamos a desarrollar esta capacidad de las CMM para diferenciarse a linajes celulares mesenquimales cuando son sometidas a estímulos apropiados. Además de los tipos celulares mencionados anteriormente (osteoblastos, condroblasto, y adipocitos), las CMM han demostrado capacidad para diferenciarse a tenocitos (Gomiero et al., 2016), miocitos de músculo esquelético (Gang et al., 2004) y otras células del mesodermo visceral (Kim y Cho, 2013).

Algunos estudios *in vitro* han mostrado que además son capaces de dar lugar a hepatocitos (Aurich et al., 2009; Sawitza, Kordes, Götze, Herebian y Häussinger, 2015), cardiomiocitos (Toma, Pittenger, Cahill, Byrne y Kessler, 2002), o neuronas (Cruz Villagran, Amelse, Neilsen, Dunlap y Dhar, 2014; Song et al., 2019). Por ello, su potencial de diferenciación ha promovido el estudio de su aplicación en distintas patologías, como las de aparato locomotor, bajo la premisa de que las CMM se diferenciaron a células del tejido afectado y se integraran al mismo. De esta forma son capaces de regenerar la lesión con un tejido de características muy similares a las del origen, y no a un tejido cicatricial, pobre en propiedades biomecánicas (Barrachina, 2017).

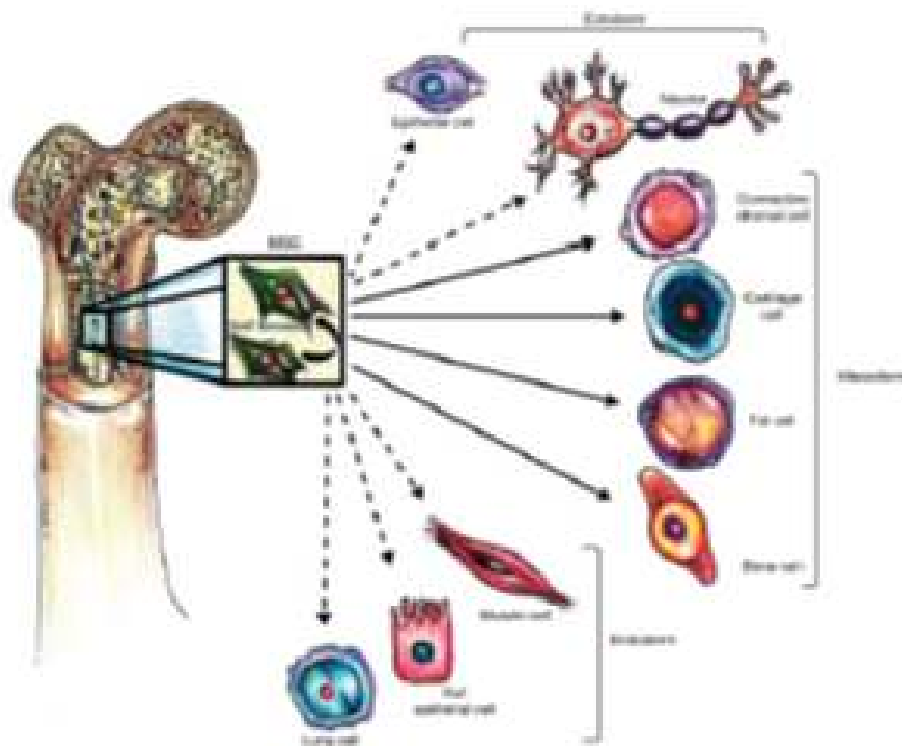


Figura 14. Representación esquemática del potencial de diferenciación de las CMM. Además de su capacidad para diferenciarse a los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, las CMM son capaces de dar lugar a células de linajes derivados de otras capas embrionarias. (Golpanian et al., 2016).

2.3.1.2. Mecanismos de Acción Terapéutica de las Células Madre Mesenquimales

Se ha comprobado que solo un bajo porcentaje de estas células son capaces de integrarse a un tejido y diferenciarse, lo cual no bastaría para justificar los efectos beneficiosos observados (Prockop, 2007). Las propiedades responsables de los efectos beneficiosos son, el potencial de diferenciación y sus mecanismos paracrinós, que se basa en la secreción por parte de las CMM de diversas moléculas con funciones reguladoras.

En primer lugar, las CMM tiene la capacidad 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. Las CMM migran hacia los lugares de inflamación y se unen en las células endoteliales activas, para pasar del torrente sanguíneo o al tejido dañado. Estas también pueden unirse a componentes de la matriz extracelular, expresados por los tejidos dañados, lo que se considera clave en la migración y anidamiento en el tejido de las CMM (Ruster et al., 2006; Ponte et al., 2007). Pese a que la capacidad de diferenciación de las CMM está bien documentada *in vitro* y sugiere un potencial terapéutico de estas células, es complicado evaluar esta capacidad *in vivo*. 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, Reinke y Volk, 2015). En casos articulares, las CMM son capaces de integrarse en tejidos como meniscos o la membrana sinovial pero no al cartílago (Murphy, Fink, Hunziker y Barry, 2003), otros estudios en modelos equinos mostraron presencia de CMM en cartílago, hasta 6 meses después de su administración (Mokbel et al., 2011). Resumiendo, la administración intralesional, concretamente en tejidos del sistema músculo esquelético, permite una retención de las CMM en la lesión y una supervivencia más prolongada mientras que la administración sistémica aporta solo un porcentaje bajo de CMM en la lesión y va asociado a una vida media corta de las células.

En segundo lugar, las CMM 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 derivarse en tróficos, anti-fibróticos, de quimio-atracción e inmunomoduladores. El efecto trófico esta dado porque secretan moléculas capaces de limitar la apoptosis de otros tipos celulares sometidos a diferentes condiciones de daño, lo que se traduce terapéuticamente en un efecto anti-apoptótico, reduciendo la muerte celular en el tejido dañado. Estos factores aumentan en situaciones de hipoxia como la que tendría lugar al inicio del daño tisular. Esto sugiere que las CMM podrían actuar limitando el daño en la fase inicial de la lesión (Rehman et al., 2004). A su vez en situaciones de daño tisular, las CMM son capaces de reclutar y mantener a precursores de las células del tejido dañado. También tienen

acción pro-angiogénica, capaz de restablecer el flujo sanguíneo al tejido dañado, fundamental para su recuperación. 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, Baber y Caplan, 2009).

Por otra parte, tiene un efecto antifibrótico (anti-cicatrizal) cuyos mecanismos moleculares de este proceso, no se conocen totalmente. Esta propiedad explica los mejores resultados que se obtienen al administrar de forma temprana CMM, antes que la fibrosis del tejido sea excesiva (Da Silva Meirelles et al., 2009). Esto es de suma importancia, ya que el sistema locomotor, en su proceso de reparación tras una lesión conduce a la formación de tejido de cicatrización con características inferiores al de origen.

Para finalizar, existe una gran variedad de moléculas quimio-atrayentes que son secretadas por las CMM, las células dianas de estas moléculas van a ser atraídas al lugar de la lesión para ejercer sus correspondientes funciones (Da Silva Meirelles et al., 2009).

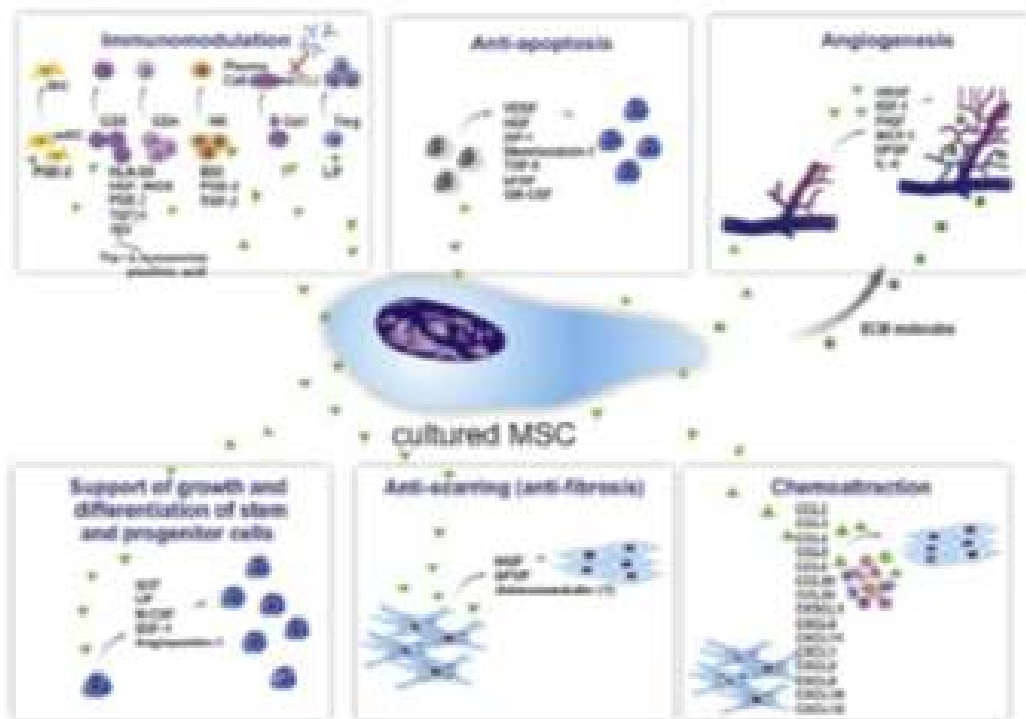


Figura 15. Representación esquemática de las diferentes acciones que pueden ejercer las CMM mediante la secreción paracrina de diversas moléculas. (da Silva Meirelles et al., 2006).

2.3.1.3. Propiedades inmunomoduladoras de las Células Madre Mesenquimales

Una característica que ha adquirido gran relevancia en la actualidad es la relación de estas células con el sistema inmune, dada por su potente capacidad

inmunomoduladora sobre las células del mismo, demostrado por la inhibición de la proliferación de los Linfocitos T activos y la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los mismos (Aggarwal y Pittenger, 2005). Además, son capaces de inhibir la producción de anticuerpos por parte de los Linfocitos B y su proliferación (Corcione, 2006), así como la maduración, activación y presentación antigénica por parte de las células dendríticas. Las CMM son capaces de inhibir la activación de las células *natural killer* y de modular las funciones de los macrófagos. Estos efectos son ejercidos principalmente por mecanismos paracrinos, pero también es fundamental el contacto célula-célula. En un principio éstos se observaron *in vitro*, en la actualidad también se observan *in vivo* dado el número creciente de estos estudios experimentales. Todo esto le confiere a las CMM un gran potencial para el tratamiento de patologías en las que el sistema inmune y la inflamación tienen un papel central (Barrachina, 2017).

Por ejemplo, en casos de OA, donde se presenta un complejo ambiente de desequilibrio anaeróbico y catabólico en el que la inflamación tiene un papel central, las propiedades reguladoras y antiinflamatorias de las CMM conforman una potencial herramienta terapéutica (Barry y Murphy, 2013), lo que además explicaría los efectos beneficiosos observados en el cartílago lesionado pese a la baja capacidad que parecen tener las CMM para implantarse en el mismo (Murphy, 2003).

2.3.1.4. Uso terapéutico de las CMM en patologías articulares equinas

2.3.1.4.1. Potencial de las CMM en el tratamiento de patologías articulares

Vistas las propiedades de las CMM y en qué mecanismos se basa su potencial terapéutico, estas constituyen una herramienta con gran futuro para el tratamiento de las patologías articulares en el equino, presentando gran interés para la medicina regenerativa de uso veterinario. En la actualidad se considera que el potencial terapéutico de las CMM reside principalmente en sus propiedades paracrinas y de contacto intracelular que permite disminuir el daño, modular la regeneración tisular; es decir a las células madre progenitoras del tejido lesionado y al sistema inmune, pero se describe en varios casos un efecto transitorio (Yaneselli, 2019). Se debe seguir investigando para lograr comprender en su totalidad la acción terapéutica de estas células y así poder optimizar sus distintas variables; el origen, dosis a utilizar, modo, momento y número de administración.

Además del potencial antiinflamatorio y de la estimulación de la regeneración endógena del cartílago, cabe recordar que las CMM podrían diferenciarse *in vivo* y reemplazar de forma directa el cartílago dañado, aunque este mecanismo podría conllevar a una reducción de su potencial inmunosupresor y un posible aumento en su inmunogenicidad (Lohan et al., 2014).



Figura 16. “Esquema de la terapia celular utilizando CMM. Las células pueden ser obtenidas de diversos tejidos, con mayor frecuencia de médula ósea o tejido adiposo, tanto del paciente o de un donante de la misma especie. Posteriormente, deben ser propagadas *in vitro* para aumentar su capacidad inicial y poder ser acondicionadas para la terapia celular. Otra opción, es contar con CMM en un biobanco y al momento de ser requeridas pueden propagarse rápidamente y aplicadas. Los biobancos potencialmente pueden acortar los tiempos de tratamiento para el paciente debido a que ya se realizó previamente el aislamiento y propagación inicial, permitiendo almacenar un gran número de células.” (Yaneselli, 2019).

En la actualidad existe un gran número de estudios sobre los efectos de las CMM administradas de forma intraarticular como tratamiento de distintas patologías articulares en equinos (Frisbie y Smith, 2009; Tyrnenopoulou et al., 2015; Gugjoo et al., 2019; Mohammed et al., 2018). La mayoría de ellos se centran en el uso de CMM autólogas, mientras que otros comenzaron a explorar el efecto de las CMM alogénicas (como es el caso de esta tesis de grado) como estrategia terapéutica por sus ventajas (Ferris, 2009; Broeckx et al., 2014; Mohammed et al., 2018; Gugjoo et al., 2019). Hasta la fecha también se ha estudiado el uso repetido de las CMM, ya que hay autores que reportaron que la administración de varias dosis de CMM puede aumentar sus efectos beneficiosos (Hatsushika et al., 2014). El uso repetido de CMM alogénicas combinadas de varios donantes, en articulaciones equinas sanas han demostrado ser seguras en términos de respuestas clínicas (Ardanaz et al., 2016). Otros estudios también en articulaciones sanas de caballos han mostrado una ligera reacción inflamatoria local tras la inyección intraarticular de CMM (Whitworth y Banks, 2014), tanto autólogas como alogénicas. Es por esto que se debe considerar la inmunogenicidad de las CMM y la posibilidad de que induzcan memoria inmunológica.

Nuestro estudio se basó en CMM alogénicas derivadas de tejido adiposo, las cuales junto a las CMM derivadas de médula ósea son utilizadas para tratamientos de lesiones osteoarticulares (Frisbie y Smith, 2009), mientras que las CMM derivadas de médula ósea también son utilizadas para tratar tendinopatías (Smith, 2006). El uso de las CMM alogénicas en patologías articulares equinas es ilimitado, y parece que su administración intraarticular es segura en términos de efectos adversos. Otro hallazgo

importante sobre su aplicación intraarticular es que promueven la regeneración de la matriz cartilaginosa y disminuyen el progreso degenerativo debido a su poder inmunosupresor y a su capacidad de diferenciación (Broeckx et al., 2014). Frisbiey Smith, 2009, realizó un estudio en el cual, por medio de artroscopía realizó microfracturas osteocondrales y posteriormente las trató con CMM. Los resultados indicaron mejoras en los niveles de prostaglandina E₂ en el líquido sinovial en respuesta al tratamiento con CMM de médula ósea, mientras que aquellas tratadas con CMM de tejido adiposo demostraron una respuesta negativa debido al aumento de TNF α en el líquido sinovial. La implantación de CMM de médula ósea junto con la técnica de microfractura por artroscopía genera una respuesta beneficiosa tanto clínica como histológica. Aunque la microfractura puede hacer que las células madre estén disponibles, su número puede ser insuficiente para causar la regeneración deseada en dicha lesión (Fortier et al., 2010).

Por estos motivos se llegó a la conclusión que su combinación es la que produce resultados más alentadores. Efectos benéficos han sido observados en el tratamiento de estas patologías, sobre todo a corto plazo, pero esto no logra mantenerse de forma prolongada, lo que quizás podría mejorarse empleando dosis repetidas de CMM. En casos de osteoartritis en distintas articulaciones, se reveló que la combinación de CMM alogénicas indiferenciadas o diferenciadas a condrocitos, y el PRP mejoraba el resultado clínico tanto a corto plazo (6 semanas) como a largo plazo (12 meses) (Broeckx et al., 2014b), juntos mejoran la funcionalidad y el sostén de la articulación dañada, de 6 semanas a 6 meses (Fortier et al., 2010). El uso de las CMM diferenciadas a condrocitos logró un mayor porcentaje de animales que recuperaban su actividad previa (Barrachina, 2017).

Resumiendo, la administración única o repetida de CMM autólogas o alogénicas en articulaciones equinas sanas, han demostrado ser seguras, pero en ocasiones puede inducir una respuesta inflamatoria local transitoria de ligera a moderada. Los efectos benéficos se observan sobre todo a corto plazo, pero la combinación de CMM alogénicas indiferenciadas o diferenciadas a condrocitos, junto con PRP, mejoran los resultados clínicos tanto a corto como largo plazo. La seguridad de las CMM alogénicas es una gran ventaja para su uso terapéutico, pero vale la pena remarcar que la inmunogenicidad de las CMM alogénicas es un punto clave a estudiar para lograr terapias alogénicas seguras y efectivas, ya que éstas pueden generar cierta respuesta inmune no deseada por parte del paciente. El desarrollo de estrategias para reducir la inmunogenicidad, como el estudio de compatibilidad entre donante y receptor o la manipulación genética de CMM, necesitan seguir siendo investigadas (Lohan et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Estudiar el efecto de aplicación intraarticular de CMM-TA alogénicas mediante examen clínico y paraclínico en lesiones osteocondrales inducidas quirúrgicamente en equinos.

3.2. Objetivos específicos:

1. Realizar la técnica de microfractura osteocondral intraarticular mediante artroscopía como modelo de técnica para ensayos experimentales en equinos.
2. Evaluar periódicamente la evolución clínica y paraclínica de los animales con microfractura osteocondral intraarticular inducida.
3. Evaluar periódicamente la evolución clínica y paraclínica de los animales que recibieron intraarticular CMM-TA alogénicas con la lesión inducida.
4. Comparar el efecto sobre la articulación que recibe la aplicación de las CMM-TA alogénicas y la de control.

4. HIPÓTESIS

La utilización de una terapia celular mediante la aplicación de CMM alogénicas en lesiones osteocondrales, tendrá un efecto terapéutico a nivel articular promoviendo la regeneración articular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Hospital de la Facultad de Veterinaria (Área de Asistencia de Equinos y Quirófano de Grandes Animales), y en los Laboratorios de cultivos celulares de la Unidad de Inmunología e Inmunoterapia y Análisis Clínicos, llevándose a cabo mediante un equipo de trabajo que constaba de un cirujano veterinario, un anestesta veterinario y un grupo de estudiantes avanzados. Los procedimientos y técnicas que se utilizaron en este proyecto contaron con la autorización de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) - N°exp. CEUAFVET-PI27 EXP 111130001661-13.

5.1. Animales

Se utilizaron 6 caballos adultos clínicamente sanos, de raza mestiza, de entre 3 a 10 años de edad y 290-350 kg de peso, quienes tuvieron un período de adaptación y fueron evaluados clínica y radiológicamente previos al inicio del estudio. Se evaluaron los parámetros vitales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, estado de hidratación, sensorio y examen de claudicación) y parámetros de laboratorio (hemograma, leucograma y perfil bioquímico) para incluir los animales en el estudio.

5.2. Aislamiento de CMM-TA equinas

Para el aislamiento de CMM-TA equinas la grasa se tomó *post mortem* de muestras de frigorífico y se utilizó un protocolo estándar de cultivo celular y caracterización descrito en la siguiente publicación del grupo de trabajo Yaneselli, 2018.

5.3. Instrumental de cirugía y artroscópico

En el procedimiento quirúrgico fue utilizado instrumental básico de cirugía y equipo de artroscopía estándar tamaño 5,5 mm, compuesto por óptica de visión foroblicua panorámica gran angular (Wolf) 30°, 4 mm de diámetro, 18 cm de longitud, esterilizable, con conductor de luz de fibra óptica incorporado; vaina de artroscopio high-flow, con cierre rápido de óptica, 5,5 mm de diámetro, 13,5 cm de longitud, dos llaves, giratoria, para utilizar con una óptica (Wolf) de 30° y bomba de fluidos para irrigar.

Para provocar la microlesión osteocondral de 8 mm de longitud y 2 mm de profundidad se utilizó un osteotomo plano, con filo bilateral, de 4 mm de ancho, 19 cm de longitud y martillo de metal de Cottle de 18 cm de longitud.

La incisión realizada fue cerrada con sutura monofilamento no absorbible.

5.4. Procedimiento quirúrgico para inducir la microlesión osteocondral por artroscopía.

El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo el día 0 (T-0), por única vez, a todos los animales, en el Quirófano de Grandes Animales del Hospital de la Facultad de

Veterinaria, mediante un equipo de trabajo que constaba de un cirujano veterinario, un anestesista veterinario y un grupo de estudiantes avanzados.

Se realizó evaluación pre-quirúrgica tomando los siguientes parámetros clínicos: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura rectal y peso.

Preparación pre-quirúrgica del paciente:

- Colocación de catéter 14G, en vena yugular izquierda.
- Administración de antibióticos de amplio espectro, gentamicina (6,6 mg/kg, I/V), penicilina-estreptomicina (22000 UI/kg, I/M) y antiinflamatorios no esteroideos, fenilbutazona (2,2 mg/kg, I/V).
- Tricotomía en la región del carpo de ambos miembros anteriores.
- Ingreso a box de derribo para llevar a cabo la preanestesia con xilazina (1,1mg/kg, I/V) y el derribo farmacológico con diazepam (0,05 mg/kg, I/V), ketamina (2,2 mg/kg, I/V) y butorfanol (0,02 mg/kg, I/V).
- Posteriormente, se llevó a cabo la intubación endotraqueal del equino para el mantenimiento de la anestesia general con isoflurano, e ingreso a quirófano, siendo posicionado en decúbito dorsal.
- Por último, se realizó el posicionamiento de la articulación en un ángulo de 70° y la asepsia de la región a intervenir con iodopovidona 10%, alcohol 70%.

A continuación, se practicó la artroscopía mediante la técnica de triangulación en la articulación intercarpiana de ambos miembros anteriores, en la región distal del hueso carpo-radial; realizando una microlesión de 8mm de longitud según lo descrito por McIlwraith (1998). La técnica de triangulación consiste en la introducción de uno o más instrumentos quirúrgicos a través de portales separados al utilizado por el artroscopio y dirigiéndolos hacia el campo visual del mismo. A diferencia de otras articulaciones las incisiones en la piel de estos portales se realizan previo a la distensión de la articulación, para evitar dañar las vainas tendinosas. La incisión de piel para el portal lateral se ubica en medio del tendón extensor carpo-radial y del tendón extensor digital común, para el portal medial se realiza aproximadamente 10 mm medial al tendón extensor carpo-radial para evitar su vaina tendinosa, ambos tienen entre 6-10 mm de longitud, son realizadas con hoja de bisturí n° 11 y siempre deben penetrar tejidos periarticulares y la cápsula articular. Posterior a esto se realizó la distensión de la articulación empleando un volumen de 20 mL. de solución fisiológica (NaCl 0,9%).

A continuación, se realizó la incisión de la cápsula articular mediante una incisión con bisturí, para que luego sea introducida la vaina con el trocar como a través de la cápsula fibrosa de la articulación, con presión manual y movimientos suaves de torsión. La vaina debe seguir la trayectoria perpendicular del portal creado. Tras esto, se retiró el trocar y se introdujo a través de la vaina, la iluminación al artroscopio. Se procedió a recuperar la distensión intraarticular por medio de la bomba de fluidos, ya que se había perdido la presión con las maniobras anteriores. Luego se localizó la cara distal del hueso carporadial, donde se procedió a realizar la microlesión

osteocondral. Posterior a esto se realizó la sutura de las incisiones cutáneas realizadas.

Al finalizar la cirugía se realizó un vendaje ligero desde proximal del carpo hasta mitad de caña, colocando una gasa embebida en solución antiséptica (iodopovidona 10%) sobre la incisión quirúrgica, luego algodón y venda Vetrap® por encima de la misma, se mantuvo al animal en reposo durante 4 a 5 horas en box del Hospital de Facultad de Veterinaria, con monitoreo regular de parámetros vitales, para controlar la evolución post-quirúrgica. A posteriori se los colocó en corrales de 7x7 metros aproximadamente o atados a estaca en el predio de Facultad con movilidad limitada.

A todos los equinos luego de la cirugía se les administró como tratamiento tradicional (TT) antiinflamatorios no esteroideos (Fenilbutazona, 2,2 mg/kg I/V cada 24 horas) y antibióticos de amplio espectro (Gentamicina, 6,6 mg/kg I/V cada 24 horas y Penicilina-Estreptomicina, 22000 UI I/M cada 12 horas), durante una semana.

5.5. Aplicación de CMM intraarticular

Al día 15 post-quirúrgico (T-15) en el Hospital de la Facultad de Veterinaria, por única vez se inyectaron en la articulación intercarpiana izquierda 1×10^6 CMM-TA alogénicas resuspendidas en 2 mL. de solución fisiológica (NaCl 0,9%), con el animal en estación, bajo sedación realizada con xilazina (1,1mg/kg, I/V), y el miembro en semiflexión, realizándole la asepsia correspondiente en la región del carpo con iodopovidona 10% y alcohol 70%, previo a la inyección. En la articulación intercarpiana derecha para ser utilizada como miembro control en el mismo animal, se inyectó solución fisiológica (NaCl 0,9%), el mismo volumen total que en el miembro izquierdo. Posterior a la aplicación se colocó un vendaje ligero con gasas con antiséptico y Vetrap® por encima de las mismas, involucrando la articulación del carpo y se mantuvo al animal en reposo en box durante 4 a 5 horas.

5.6. Evaluación clínica

Se realizaron evaluaciones clínicas quincenalmente los días (T-15), (T-30), (T-45), (T-60), (T-75), (T-90), evaluando frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, sensorio, respuesta de dolor a la palpación, temperatura local y circunferencia articular, marcha al paso y al trote, buscando indicios de claudicación. A los resultados obtenidos se les asignó un score específico para cada categoría, tomados como ejemplo y modificados de Van Loon et al., 2010, para scores clínicos referenciados al dolor, de American Association of Equine Practitioners (AAEP) para claudicación y Mokbel et al., 2011, para scores paraclínicos referenciados al aparato locomotor. Estos fueron realizados para reflejar cambios no deseados con respecto a valores normales, siendo el valor "0" el nulo o el deseado y aumentando el valor con respecto a la gravedad del parámetro evaluado.

A continuación, detallamos los scores clínicos utilizados:

Scores Clínicos: (Parámetros y estado corporal) 0-3 (Ver Anexo 1.1)

Scores Clínicos: (Dolor) 0-3 (Van Loon et al., 2010) (Ver Anexo 1.2)

Scores Clínicos: (Específico de Aparato Locomotor) 0-5 (Ver Anexo 1.3)

5.7. Evaluación Radiológica

Las evaluaciones se realizaron quincenalmente los días (T-15), (T-30), (T-45), (T-60), (T-75), (T-90). El estudio radiológico consistió en 6 incidencias incluyendo la antero-posterior (AP), latero-medial (LM), dorsolateral-palmaromedial oblicua (DLPMO), dorsomedial-palmarolateral oblicua (DMPLO) y Lateromedial flexionada (LMFlex). Una vez evaluada la presencia o no de alteraciones radiológicas, se les asignó un score utilizando el mismo criterio que para los scores clínicos, como se detalla a continuación:

Score Paraclínicos: (Aparato Locomotor) 0-4 (Ver Anexo 2.1)

Dentro del score paraclínico de Ap. Locomotor también fue incluida la evaluación de la temperatura local de la articulación en cuestión.

5.8. Evaluación de Análisis de Laboratorio

Las evaluaciones se realizaron quincenalmente los días (T-15), (T-30), (T-45), (T-60), (T-75), (T-90). Consistió en el estudio de sangre venosa (vena yugular) (eritrocitos, hematocrito, leucocitos y linfocitos), y el estudio del líquido sinovial (aspecto, color, viscosidad, proteínas y presencia de leucocitos). Se le asignó un score específico a cada evaluación, utilizando el mismo criterio que para los scores clínicos, como se detalla a continuación:

Scores Paraclínicos Laboratorio: (Líquido sinovial) 0-3. (Ver Anexo 2.2)

5.9. Análisis Estadístico

Se realizó la estadística descriptiva de los datos y posteriormente la prueba de normalidad Lillieforsy de homocedasticidad de Levene como criterio para la utilización de prueba paramétrico o no paramétrico para el posterior análisis. Se comparó la articulación que recibió el tratamiento con células con la articulación control que fue la contralateral sobre las variables de evaluación clínicas y paraclínicas en diferentes semanas hasta la 12. Para el análisis se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Sidak. Los resultados en media \pm error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM) y se consideraron diferencias significativas un $p < 0,05$. El programa informático utilizado para realizar el análisis fue GraphPad y Past.

RESULTADOS

5.10. Evaluación clínica

5.10.1. Parámetros y condición corporal

En lo que respecta a los parámetros clínicos que fueron evaluados desde la llegada de los equinos a la Facultad de Veterinaria y durante toda la fase de estudio, como lo fue la FC, FR, temperatura rectal, coloración de membranas mucosas, tiempo de llenado capilar y la condición corporal de cada animal, se observaron variaciones en la FC y FR entre los distintos animales, a su vez éstas fueron constantes en cada equino durante todo el período de estudio. La FC tuvo valores por encima de los normales (24-44 latidos/minuto) en dos de los seis equinos. Con respecto a la FR, cinco de los seis equinos presentaron valores por encima de los parámetros normales (8-13 respiraciones/minuto).

5.10.2. Confort y signos asociados al dolor

En lo que respecta al comportamiento de los equinos frente a la presencia del observador, se notó que cinco de los seis tuvieron una respuesta exagerada a los estímulos auditivos durante el primer mes de ingresados al predio de Facultad, corrigiéndose posteriormente dicho comportamiento, mientras que el equino N° 6 simplemente prestaba atención al público (Figura 17 A).

Al realizar la palpación en la zona de dolor (región del carpo), tres de los seis caballos tuvieron una leve reacción a la misma en ambos miembros durante la primera semana posterior a la cirugía, mientras que los tres caballos restantes presentaron dicha reacción, también en ambos miembros, luego de la inyección de las CMM-TA en la articulación intercarpiana del miembro izquierdo y de solución fisiológico en el miembro derecho, revirtiéndose a la semana (Figura 17 B).

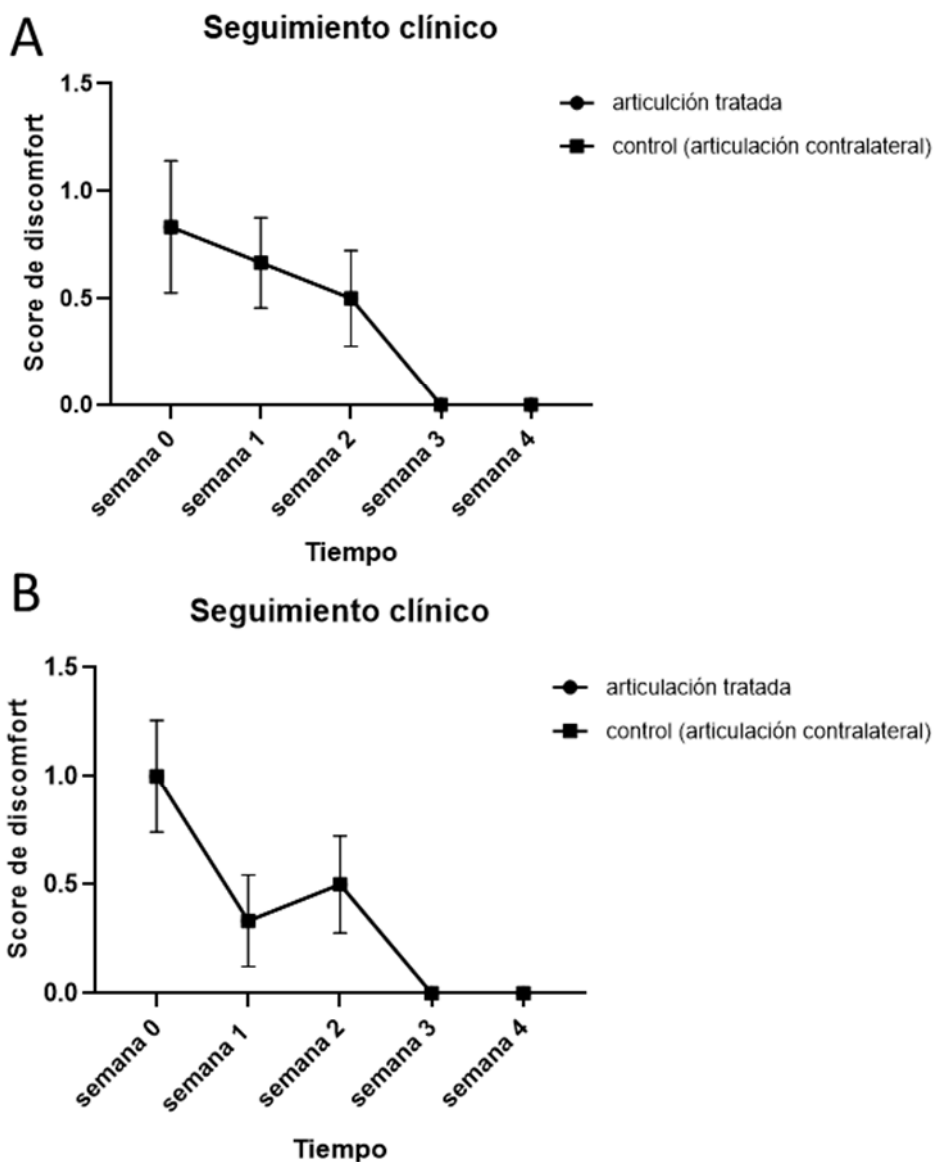


Figura 17. Resultados del seguimiento clínico del discomfort. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución fisiológica. Expresados con la media \pm SEM. A: corresponde al score de observación y B: corresponde a score de palpación. Las líneas se encuentran superpuestas por su similitud.

Al observar la postura de todos los animales para evaluar distribución de peso y confort de los mismos, se observó que el equino N° 1 durante las dos semanas posteriores a la cirugía alternó el apoyo en los miembros, con leves tremores musculares, revirtiendo esto pasada las dos semanas.

Cuando se evaluó la actitud, cinco de los seis equinos se mostraron alerta, vivaces, con movimientos ocasionales de cabeza y no se negaban a moverse luego de realizada la cirugía, compatible esto con un estado normal de sensorio y comportamiento, mientras que uno de ellos, el equino N° 1, expresó facies anormales,

con dilatación de pupilas e inquietud, los mismos se fueron revirtiendo de forma paulatina hasta alcanzar un estado de normalidad a la segunda semana post cirugía.

El apetito no tuvo alteraciones durante ninguna fase del estudio y tampoco se presentó signo alguno de sudoración excesiva en ninguno de los seis caballos.

Otro comportamiento que se evaluó asociado a incomodidad o dolor, fue el manoteo al suelo, el cual solo se presentó de forma ocasional (1-2 veces/5 minutos) con ambos miembros por parte del equino N° 1 durante la primera semana post cirugía, demostrando cierta incomodidad durante ese período.

5.10.3. Aparato locomotor

A los 15 días post cirugía, se evaluó la marcha al paso y al trote en línea recta, no detectando claudicación en ninguno de los seis caballos, también se les realizó prueba de flexión forzada controlada en ambos carpos con posterior trote en línea recta, dando todos negativos. Con respecto a la medición de la circunferencia en la región del carpo, tomada paralelo al suelo, a nivel de la articulación intercarpiana en ambos miembros posterior a la cirugía en búsqueda de distensión articular, se observó un aumento leve en dos de los seis caballos, moderado en tres de ellos y solo en el equino N° 8 se vio un aumento. En tres de los seis caballos la articulación control fue la que mostró mayor aumento; en el equino N° 1, se presentó mayor aumento en la articulación tratada; mientras que en los restantes no hubo variación entre los miembros.



Figura 18. Test de flexión forzada controlada del carpo. (Fuente propia)



Figura 19. Medición de circunferencia en la región del carpo. (Fuente propia)

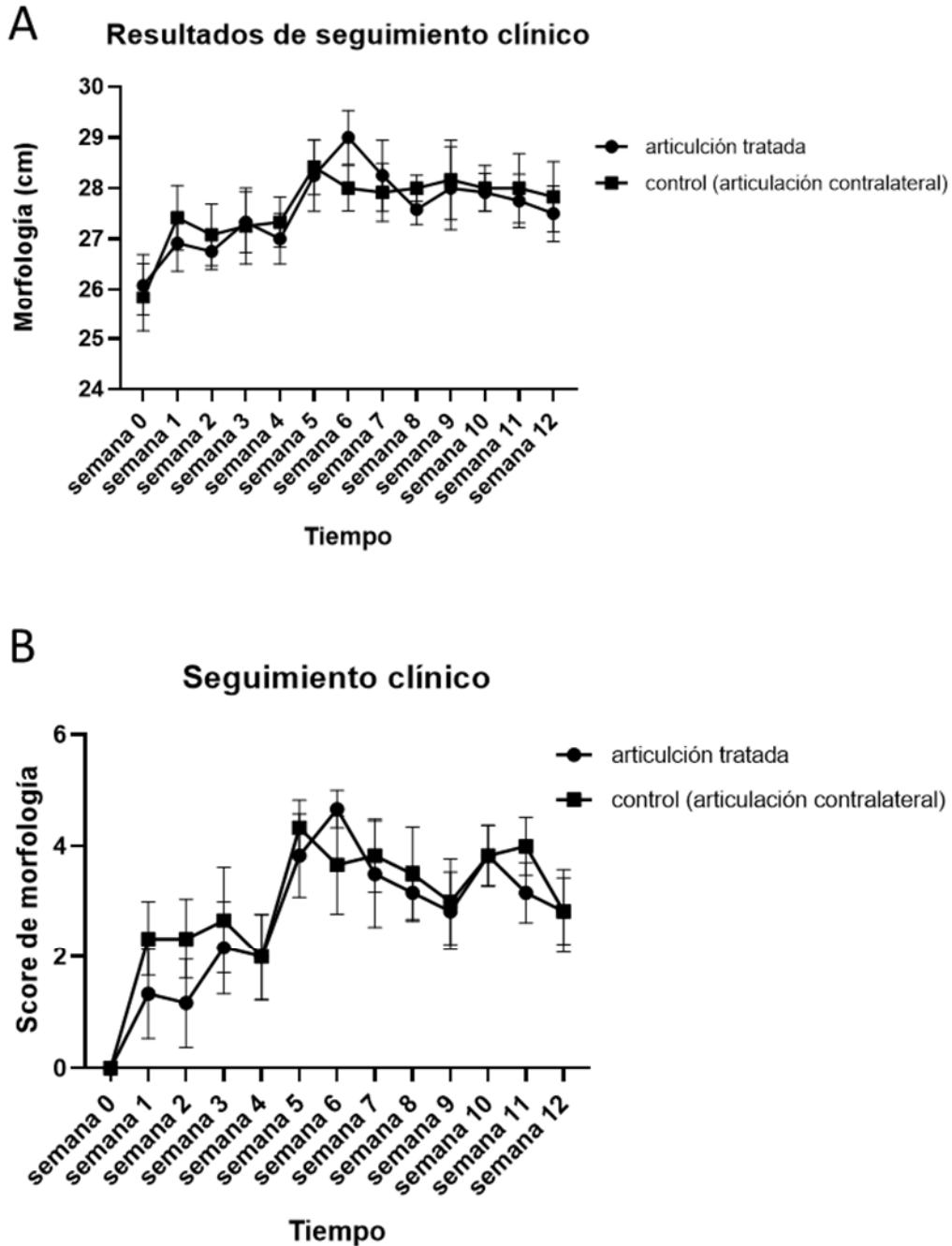


Figura 20. Resultados del seguimiento clínico de la morfología. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución salina. Expresados con la media \pm SEM.

Se obtuvo una media de $27,6 \pm 0,2$ cm vs $27,6 \pm 0,2$ cm para la articulación tratada y control (contralateral) (Figura 20 A), asimismo, no se encontraron diferencias significativas en el tratamiento a excepción de la semana 6 ($p=0,03$). Cuando se evaluó a través del score encontramos una media de $2,6 \pm 0,2$ vs $2,9 \pm 0,2$ para la articulación tratada y control (Figura 20 B), sin obtener diferencias significativas entre ambos.

5.11. Evaluación paraclínica

5.11.1. Aparato locomotor

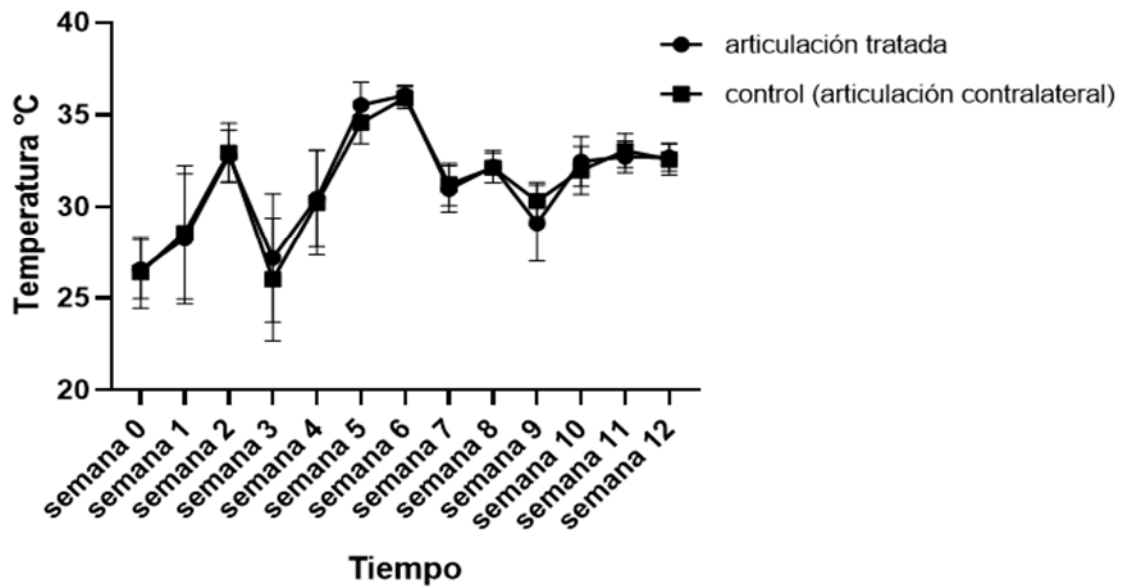
Lo que respecta a la evaluación de la temperatura local en la región del carpo, en todas las mediciones se obtuvo un aumento promedio de 4°C, en ambos miembros.

Éste aumento solo sería significativo en caso de manifestarse simultáneamente a otros signos (como inflamación, dolor o claudicación), no siendo éste el caso. Vale la pena mencionar que es una medición muy cuestionable, ya que la misma puede variar por muchos factores, sean del animal por movimiento o ambientales al estar expuesto a altas temperatura, es por este motivo que para ser tomado como significativo debe ir de la mano con signos clínicos.



Figura 21. Evaluación de la temperatura local en la región del carpo. (Fuente propia)

A Resultados de seguimiento clínico



B Seguimiento clínico

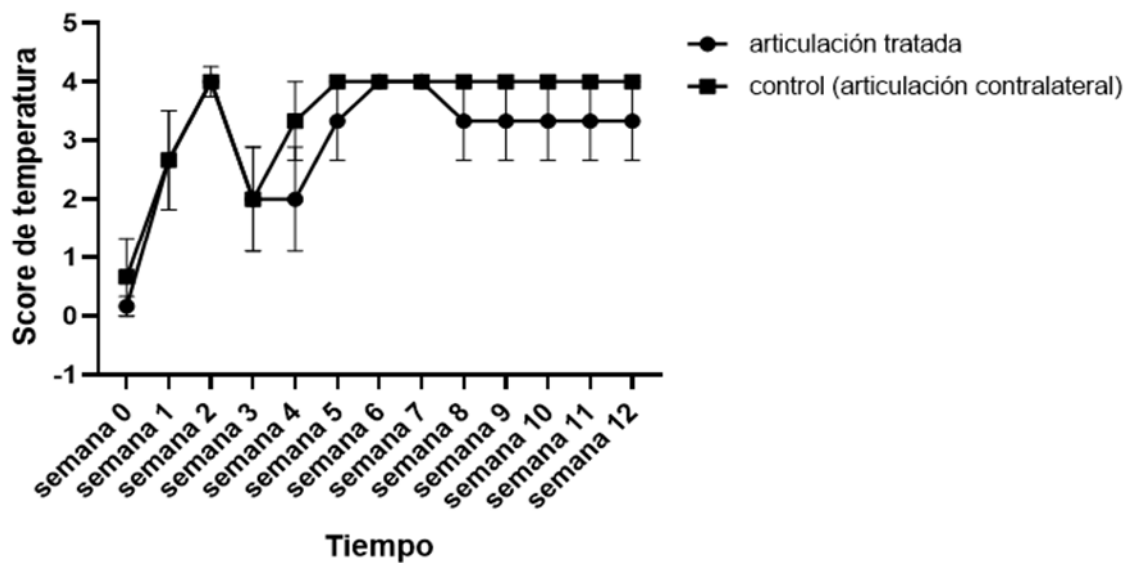


Figura 22. Resultados del seguimiento clínico por temperatura. En la semana 0 recibieron la lesión articular inducida y la semana 2 recibieron por artrocentesis las CMM-TA o el control con solución salina. Expresados con la media \pm SEM.

Se obtuvo una media de $31,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$ vs $31,2 \pm 0,6^\circ\text{C}$ para la articulación tratada y control (Figura 22 A), asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Cuando se evaluó a través del score encontramos una media de $3 \pm 0,2$ vs $3,4 \pm 0,1$ para la articulación tratada y control (Figura 22 B), sin encontrar diferencias significativas en la comparación.

En los exámenes radiográficos, no se detectaron alteraciones radiológicas en ninguno de los seis equinos utilizados para el estudio.



Figura 23. Ejemplo de radiografías; carpo derecho, incidencias DP (A) y LM (B). (Fuente propia)



Figura 24. Ejemplo de radiografías; carpo derecho, incidencias DLPMO (A) y DMPLO (B). (Fuente propia)



Figura 25. Radiografía de carpo derecho, incidencia LM en flexión.
(Fuente propia)

5.11.2. Líquido sinovial

Al evaluar el líquido sinovial de forma macroscópica, no se observaron diferencias significativas en aspecto, color y viscosidad en las articulaciones tratadas y control. En lo que respecta a los resultados obtenidos, su aspecto fue de una turbidez moderada, color amarillo claro y una viscosidad normal (1-2 cm) en la mayoría de los equinos, siendo éstos compatibles con un estado normal a nivel articular.



Figura 26. Extracción de líquido sinovial intraoperatorio. (Fuente propia)

Los análisis de celularidad y proteínas de fase aguda del líquido sinovial, no fueron incluidos en la presente tesis debido a que se estudiaron en conjunto y serán divulgados en otra tesis de grado.

6. DISCUSIÓN

Las lesiones osteocondrales en las articulaciones de los caballos, son uno de los desórdenes más importante y de difícil solución en el equino atleta, debido a que los tratamientos actuales no tienen el éxito esperado, limitando de esta forma su capacidad atlética. Por este motivo es que se ha buscado una alternativa terapéutica en base a CMM para lograr la regeneración osteocondral a nivel articular y así poder superar estos desafíos (Spaaset al., 2012; Broeckx et al., 2014; Tyrnenopoulou et al., 2015).

Trabajos sobre el uso de CMM en patologías articulares en equinos han demostrado clínicamente una reducción en el grado de claudicación (Black et al., 2008; Spaaset al., 2012; Gugjoo et al., 2019; Magri, 2019) y el porcentaje de animales que retornaron a la actividad (trabajo o deporte) post cirugía artroscópica y administración de CMM fue de un 60 % (Hegewald et al., 2004) en comparación a un 6 % en lesiones solo tratadas por artroscopía (Cohen et al., 2009), cifras que evidencian resultados positivos y estimula la investigación en el área. Otros estudios posteriores llegaron a la misma conclusión, que la utilización de cirugía artroscópica combinada con la inoculación de CMM resulta en una mejor reparación de las lesiones (Tyrnenopoulou et al., 2015; Gugjoo et al., 2019).

Cuando evaluamos parámetros clínicos como FC, FR y TR, podemos decir que no se observaron cambios significativos en los mismos durante todo el período de estudio, cabe mencionar que estos parámetros variaron entre los distintos animales, pero siempre dentro los rangos fisiológicos, estas variaciones pueden ser atribuidas a factores individuales, medio ambientales o del propio operador encargado de tomarlos. Además, es importante mencionar que no se vieron efectos adversos al evaluar estos parámetros cuando se aplicaron CMM intraarticular al igual que en otros trabajos (Broeckx et al., 2014; Broeckx et al., 2017)

Broeckx et al., 2014, realizaron un estudio en el cual evaluaron el efecto de las CMM alogénicas como tratamiento para la EDA en equinos, a la semana post inoculación intraarticular de las CMM, realizaron un monitoreo diario durante una semana para observar la aparición de posibles efectos adversos como sudoración excesiva, cambio de postura (indicando distribución de peso y confort), variaciones en FC, FR y TR o alguna reacción de hipersensibilidad, registrando los mismos resultados obtenidos en la presente tesis, todos los pacientes tratados se sintieron cómodos durante todo el período de seguimiento y sin efectos adversos.

Asimismo, Broeckx et al., 2017, realizaron otro estudio clínico en donde evaluaron una única inyección articular de CMM condrogénicas inducidas en combinación con plasma alogénico equino y un control placebo en la articulación contralateral, que consistió en solución salina estéril al 0,9%, en equinos experimentalmente sanos. Siendo evaluados diariamente durante todo el período de estudio para FC, FR, TR, TLLC, coloración de membranas mucosas y consumo de alimento, al igual que en nuestra investigación los resultados no presentaron diferencias significativas.

También fueron sometidos a una evaluación diaria de las articulaciones y de claudicación, las primeras dos semanas post-inyección, seguido de una evaluación semanal el resto del estudio, obteniendo resultados sin diferencias significativas para la respuesta al test de flexión forzada, claudicación (Puntuación AAEP), circunferencia articular, dolor a la palpación presión y temperatura local, concordando en su mayoría con nuestros resultados ya que ningún caballo presentó claudicación durante el período de estudio, la misma se evaluó al paso y trote en línea recta y por medio de prueba de flexión forzada de la articulación del carpo (Ver figura N° 18), resultados que también publicó Ardanaz, 2012; tampoco tuvimos diferencia significativas respecto a la palpación presión en la zona de dolor al igual que lo descrito por Broeckx et al., 2017.

Donde si observamos diferencias fue al evaluar la circunferencia articular con cinta métrica (Ver figura 19), obteniendo como resultado mayor distensión articular en los carpos control durante todo el período de estudio a excepción de la sexta semana, donde se observó mayor distensión en la articulación tratada (Ver figura 20), coincidiendo ésta con los resultados de Ardanaz, 2012; que describen una mayor distensión en las articulaciones tratadas con CMM, a su vez agrega que la reacción inflamatoria que se produce es transitoria y se normaliza a los 10 días sin necesidad de tratamiento alguno, siendo en la mayoría de los animales difícilmente detectable a nivel clínico

De los resultados obtenidos respecto a la medición de temperatura en la región de carpo (Ver figura 21), se observó un aumento promedio de 4°C en ambas articulaciones (Ver figura 22), dicho aumento puede estar relacionado a la temperatura ambiental ya que el estudio fue realizado en primavera- verano y al no encontrarse asociado a un proceso inflamatorio, doloroso o claudicante, dicho aumento es insignificante, Ardanaz, 2012; publicó en su estudio una diferencia media entre la articulación tratada y control menor a 1°C.

Otros parámetros observados como la actitud del equino en presencia del observador, manoteos al suelo como demostración de incomodidad, no fueron encontrados en una extensa revisión bibliográfica, en nuestro estudio obtuvimos en cinco de los seis equinos una respuesta exagerada a los estímulos auditivos durante el primer mes de seguimiento, asociado al período de adaptación a su nuevo ambiente, los operadores y al público en general que se encontraba en Facultad, ya que éstos caballos eran de distintos orígenes, temperamentos y trato con personas, posterior a dicho período se notó un cambio sustancial, siendo los mismos muy dóciles. Con respecto a la evaluación de manoteos al suelo, indicador de incomodidad o dolor, solo uno de los caballos los presentó por el período de una semana post cirugía, revirtiéndose posteriormente; los caballos fueron tratados con AINES y antibióticos de amplio espectro durante una semana buscando evitar la presencia de dolor y desarrollo de una infección postoperatoria, y cuyo resultado fue obtenido exitosamente y comparable en el descrito por Tyrnenopoulou et al., 2015.

Estudios similares y previos al nuestro, en los que trataron con CMM lesiones articulares experimentalmente no mostraron diferencias clínicas entre los grupos tratados y controles (Frisbiey Smith, 2009; McIlwraith, 2011) pero otros estudios en patologías articulares de origen natural mostraron un mejor resultado clínico (Broeckx et al., 2014; Ferris et al., 2014a). Barrachina, 2017, concluyó que la diferencia en el progreso clínico entre los grupos tratados y control son leves, pero la evolución de los parámetros clínicos sugiere una normalización más rápida en los grupos tratados con CMM. Los efectos beneficiosos se observan principalmente a corto plazo entre los seis y ocho meses (Wilke, Nydam y Nixon, 2007; Frisbiey Smith, 2009; Barrachina, 2017). Cabe mencionar que no todos los casos muestran un mismo nivel de mejora (Broeckx et al., 2019; Gugjoo et al., 2019), y que la claudicación no siempre tiene una correlación directa con la gravedad de la lesión (Ferris et al., 2014).

En los exámenes radiográficos realizados post cirugía y post tratamiento con CMM, no observamos alteraciones radiológicas en ninguno de los seis caballos, probablemente a causa de que la microlesión no tuvo la profundidad suficiente como para generar un daño evidente radiográficamente (Ver figuras N° 23 A-B, 24 A-B y 25). Frisbie y Smith, 2009; en su modelo experimental de OA inducida tratada con CMM, no encontró cambios radiológicos significativos que indiquen una mejora de la lesión, resultado que concuerda con lo publicado posteriormente por Spaas et al., 2012 en un estudio realizado en padrillos con EDA adquirida.

Con respecto a la inducción de la lesión osteocondral, se detalla en la literatura diferentes modelos además del realizado en la presente tesis, en la cual se quiso replicar las condiciones de una fractura intraarticular. El trabajo realizado por Elmesiry, Seleim y Cullis-Hill, 2014; relata un modelo de inducción química, donde la lesión es provocada por medio de la inyección intraarticular con monoiodoacetato de sodio en un grupo y partículas de cartílago alógeno en otro; así como también Barrachina, 2017; induce la lesión por medio de la aplicación intraarticular de Anfotericina-B. En ambos estudios se destacaron cambios clínicos y paraclínicos evidentes, pero no severos con respecto a claudicación, circunferencia articular y análisis radiológicos en la primer semana post-inyección, resultados que están en correspondencia con cambios degenerativos moderados a nivel articular, pero que discrepan con nuestros resultados ya que no observamos alteraciones de ningún tipo.

Por último, al evaluar macroscópicamente el líquido sinovial, no se observaron cambios en color, turbidez ni viscosidad, indicando esto que no se produjo una reacción adversa a causa de la microlesión osteocondral inducida quirúrgicamente en la articulación intercarpiana capaz de generar cambios de los mismos; asimismo no hay bibliografía que documente posibles cambios a nivel macroscópico.

7. CONCLUSIONES

No fue posible evidenciar signos clínicos, radiológicos y macroscópicos del líquido sinovial a causa de la lesión osteocondral inducida artroscópicamente en los animales. Asimismo, se pudo observar que la aplicación de CMM-TA alogénicas no presentó alteraciones en los parámetros clínicos, radiológicos y de líquido sinovial en comparación a la articulación control. Por ello, podemos asegurar que la aplicación por artrocentesis es segura y clínicamente no se evidenció signos de reacción inflamatoria local.

1. Clínicamente los equinos no tuvieron alteraciones ni dolores significativos a nivel locomotor asociado a la cirugía o al tratamiento con CMM-TA.
2. Durante el transcurso del estudio no se observaron alteraciones radiográficas.

Como perspectivas se debería continuar con investigaciones sobre estudios colaterales como la histopatología para lograr un mejor diagnóstico y así poder evaluar con mayor eficiencia el efecto terapéutico de las CMM-TA. Asimismo, si se documentaron cambios a nivel microscópico del líquido sinovial en el presente trabajo, pero estos serán publicados en otra tesis de grado, lo que nos indicaría potencialmente que existió una reacción a nivel articular post cirugía.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardanaz Laguardia, N. (2012). *Análisis del efecto intraarticular de células madre mesenquimales autólogas y alogénicas en caballos* (Tesis Maestría). Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Ardanaz, N., Vázquez, F.J., Romero, A., Remacha, A.R., Barrachina, L., Sanz, A., y 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.
- Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., y Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, 57-65.
- Barrachina Porcar, L. (2017). *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* (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Gugjoo MB, Amarpal, Makhdoomi DM, Sharma GT. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *J. Equine Vet Sci.* 2019 Jan; 72:16-27. Doi: 10.1016/j.jevs.2018.10.007. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30929778.
- Baxter, G.M. (2014). *Adams & Stashak: Claudicaciones en Equinos* (6ª ed.). Buenos Aires: Inter – Médica.
- Broeckx, S., Suls, M., Beerts, C., Vandenberghe, A., Seys, B., Wuertz-Kozak, K., Spaas, J.H. (2014). Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(6), 497-503.
- Broeckx, S.Y., Spaas, J.H., Chiers, K., Duchateau, L., Van Hecke, L., Van Pille, F. (2018). Equine allogeneic chondrogenic induced mesenchymal stem cells: a GCP target animal safety and biodistribution study. *Research in Veterinary Science*, 117, 246-254.
- Colbath, A.C., Frisbie, D.D., Dow, S.W., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., y Goodrich, L.R. (2017). Equine models for the investigation of mesenchymal stem cell therapies in orthopaedic disease. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 25(1), 41-49.
- Elmesiry, A., Seleim, M., y Cullis-Hills, D. (2014). Iodoacetate and allogeneous cartilage particles as models for arthritis induction in equine. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2, 142-150.

- Frisbie, D., Kawcak, C., y McIlwraith, C. W. (2006). Evaluation of Bone Marrow Derived Stem Cells and Adipose Derived Stromal Vascular Fraction for Treatment of Osteoarthritis Using an Equine Experimental Model. *En AAEP Annual Convention*. San Antonio: AAEP.
- Frisbie, D.D., y Smith, R.K.W. (2010). Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopedics. *Equine Veterinary Journal*, 42(1), 86-89.
- Frisbie, D. (2012). The use of intraarticular stem cells in horses. *En ACVS Veterinary Symposium, National Harbour, Maryland*.
- Goodrich, L.R. y Nixon, A.J. (2006). Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Veterinary Journal*, 171(1), 51-69.
- Gugjoo, M.B., Amarpal, Fazili, M.U.R., Gayas, M.A., Ahmad, R.A., y Dhama, K. (2019). Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine—a review. *Veterinary Quarterly*, 39(1), 95-120.
- Johnson, S., y Frisbie, D. (2016). Cartilage therapy and repair in equine athletes. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 26, 155-165.
- Kidd, J., Lu, K., y Frazer, M. (2014). *Atlas of Equine Ultrasonography*. Oxford: Wiley.
- Liebich, H.G., König, H.E., (2005a). *Articulaciones del miembro torácico en Anatomía de los animales domésticos: aparato locomotor* (2ª Edición). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Liebich, H.G., König, H.E., 2005b. *Artrología en Anatomía de los animales domésticos: aparato locomotor* (2ª Edición). Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.
- Magri, C., Schramme, M., Febre, M., Cauvin, E., Labadie, F., Saulnier, N., Maddens, S. (2019). Comparison of efficacy and safety of single versus repeated intra-articular injection of allogeneic neonatal mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis of the metacarpophalangeal/metatarsophalangeal joint in horses: a clinical pilot study. *PLoS One*, 14(8), e0221317.
- McIlwraith, C.W., Wright, I., y Nixon, A., (2005). *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse* (3ª Ed.). Londres: Mosby.
- McIlwraith C. W, Frisbie D. D, Kawcak C. E, Van Weeren R. (2015). *Joint disease in the horse* (2ª Ed). St. Louis, EE. UU: Editorial Elsevier.
- Nixon, A. (2011). Tendon and ligament injury an update on regenerative treatments including stem cells, growth factors, PRP and other biologics. *Proceedings of the Bain Fallon Memorial Lectures*, 33, 22-28.
- Ross M.W. and Dyson S.J. (2010). *Diagnosis and management of lameness in the horse* (2ª Ed). St. Louis, EE.UU.: Editorial Saunders.

- Stashak, T.S. (2004). *Adams Claudicaciones en Equinos* (5ª ed.). Buenos Aires: Inter – Médica.
- Spaas, J. H., Oosterlinck, M., Broeckx, S., Dumoulin, M., Saunders, J., Van Soom, A., Van de Walle. G.R. (2012). Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a case report. *VlaamsDiergeneeskundigTijdschrift* 81, 11-15.
- Tyrnenopoulou, P., Karayannopoulou, M., Angelopoulou, S., Pyrros, A., Mparous, E., Koliakos, G., y Diakakis, N. (2015). Successful management of an equine carpal chip fracture by intra-articularly injected adipose-derived stromal vascular fraction after arthroscopic removal. *IranianJournalofVeterinaryResearch*, 17(1), 59-61.
- Van Weeren, P.R., 2016a. General Anatomy and Physiology of Joints en Joint disease in thehorse (2ª Edición) Mcllwraith C. W, Frisbie D. D, Kawkak C. E, Van Weeren R. EditorialElsevier, St. Louis, EE.UU.
- Van Weeren, P.R., 2016b. Septic arthritis en Joint disease in the horse (2ª Edición) Mcllwraith C. W, Frisbie D. D, Kawkak C. E, Van Weeren R. Editorial Elsevier, St. Louis, EE.UU.
- Whitworth, D.J.y Banks, T.A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: prescient or premature? *Veterinary Journal*, 202, 416–424.
- Yaneselli González, K.M. (2019). *Estudio de las características de proliferación, multipotencialidad e inmunológicas de las células madre mesenquimales de especies domésticas* (Tesis Doctorado en Salud Animal). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Zayed, M., Adair, S., Ursini, T., Schumacher, J., Misk, N., y Dhar, M. (2018). Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Research in VeterinaryScience* 118, 317-323.

9. ANEXO

1. Scores Clínicos:

1.1 Scores Clínicos: (Parámetros y estado corporal) 0-3

Parámetro Frecuencia cardíaca:

- 0: 24-44 latidos/minuto.
- 1: 45-52 latidos/minuto.
- 2: 53-60 latidos/minuto.
- 3: > 60 latidos/minuto.

Parámetro Frecuencia Respiratoria:

- 0: 8-13 respiraciones/minuto.
- 1: 14-16 respiraciones/minuto.
- 2: 17-18 respiraciones/minuto.
- 3: > 19 respiraciones/minuto.

Parámetro Temperatura rectal:

- 0: 36,9°C-38,5°C.
- 1: 38,6°C-39,0°C.
- 2: 39,1°C-39,5°C.
- 3: 39,6°C-40,0°C

Parámetro de membranas mucosas:

- 0: Rosa brillante y húmedas.
- 1: Rosa pálida y algo húmedas.
- 2: Rosa pálida y secas.
- 3: Congestivas.

Parámetro tiempo de llenado capilar:

- 0: 0-2 segundos.
- 1: 1-3 segundos.
- 2: 2-4 segundos.
- 3: 3-5 o más segundos.

Parámetro condición corporal (AAEP):

- 0: 5.
- 1: 4 o 6.
- 2: 3 o 7.
- 3: 1-2 u 8-9.

1.2 Scores Clínicos: (Dolor) 0-3 (Van Loon et al., 2010)

Comp., respuesta al observador:

0: Presta atención al público.

1: Respuesta exagerada a estímulos auditivos.

2: Respuesta excesiva a agresiva a estímulos auditivos.

3: Estupor, postración, no respuesta a estímulos auditivos.

Comp., respuesta a la palpación de la zona dolorosa:

0: Sin reacción a la palpación.

1: Leve reacción a la palpación.

2: Resistencia a la palpación.

3: Violenta reacción a la palpación.

Comp., postura (distribución de peso y confort):

0: De pie tranquilo, normal al caminar.

1: Alternancia de apoyo de miembros, leves temores musculares.

2: Sustracción de apoyo, distribución anormal de peso del cuerpo.

3: Postura antiálgica marcada y/o decúbito.

Comp., actitud (rechazo a moverse, inquietud, ansiedad):

0: Alerta, cabeza y orejas bajas, no se niega a moverse.

1: Alerta y vivaz, movimientos ocasionales de cabeza, no se niega a moverse.

2: Expresión facial anormal, inquietud, pupilas dilatadas.

3: Expresión facial anormal, excitado, movimientos corporales continuos.

Comp., apetito:

0: Come pasto y fardo sin inconvenientes.

1: Muestra poco interés en el pasto, solo come fardo y ración.

2: Muestra poco interés en el fardo y ración.

3: No muestra interés en comer.

Comp., sudoración:

0: Sin signos de sudoración.

1: Húmedo al tacto.

2: Mojado al tacto, marcas de sudor aparentes sobre el cuerpo.

3: Sudor excesivo, marcas líquidas discurriendo sobre el cuerpo.

Comp., manoteo al suelo:

0: De pie tranquilo, sin manotear al suelo.

1: Manoteo ocasional (1-2 veces/5 minutos).

2: Manoteo frecuente (3-4 veces/5 minutos).

3: Manoteo excesivo (>5 veces/5 minutos).

1.3 Scores Clínicos: (Específico de Aparato Locomotor) 0-5

Claudicación (AAEP):

0: Sin claudicación perceptible bajo ninguna circunstancia.

1: Difícil de observar y no consistentemente aparente en circunstancias especiales.

2: Difícil de ver al paso y trote pero si consistentemente aparente en circunstancias especiales.

3: Consistentemente aparente al trote en todas las circunstancias.

4: Consistentemente aparente al paso en todas las circunstancias.

5: Mínima carga de peso en movimiento o reposo, o completa incapacidad de moverse.

Test de flexión, 0-3:

0: Sin claudicación.

1: Leve.

2: Moderada.

3: Grave.

Morfológica (circunferencia articular):

0: Sin cambios.

1: + 0,5 cm.

2: + 1,0 cm.

3: + 1,5 cm.

4: + 2,0 cm.

5: + 2,5 cm.

2. Scores Paraclínicos

2.1 Score Paraclínicos: (Aparato Locomotor) 0-4

Temperatura local, 0-4:

0: Sin cambios.

1: + 1,0°C.

2: + 2,0°C.

3: + 3,0°C.

4: > +4,0°C.

Radiológicos (Mokbel et al., 2011) 0-4:

0: Normal.

1: Sin cambios en hueso/cartílago; mínima distención/efusión articular.

2: Mínimos cambios en hueso; osteofitos < 1 mm, sin evidencia de pérdida de cartílago.

3: Moderados cambios en hueso; osteofitos 1-2 mm, con lisis ósea o pérdida de cartílago.

4: Severos cambios en hueso; osteofitos > 2 mm, con o sin lisis ósea o pérdida de cartílago.

2.2 Scores Paraclínicos Laboratorio: (Líquido sinovial) 0-3

Físico aspecto:

0: Normal.

1: Transparente.

2: Turbidez moderada.

3: Turbidez completa.

Físico color:

0: Normal.

1: Amarillo claro.

2: Amarillo oscuro.

3: Amarillo rojizo.

Físico viscosidad:

0: Normal.

1: Moderada disminución.

2: Importante disminución.

3: Grave disminución.