

Terapias regenerativas biológicas en la osteoartritis: hemoderivados y terapia celular

Frente a los tratamientos tradicionales para la osteoartritis han surgido nuevas estrategias biológicas en la reparación del cartílago articular, con el fin de controlar los procesos inflamatorios e inducir su reparación y regeneración.

**Antonio J Villatoro Jiménez^{1,2,3},
Viviana Fernández Gensini^{1,2}
y José Becerra Ratia^{2,3,4}**

¹ImmuneStem. Instituto de Inmunología Clínica y Terapia Celular. Málaga. www.immunestem.com

²Labret. Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular. Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga

³Bionand. Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología. Parque Tecnológico de Andalucía. Málaga

⁴Ciber-bnn. Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina

La osteoartritis (OA), o enfermedad degenerativa articular, es la causa más común de dolor crónico y disfunción del aparato locomotor en nuestras mascotas. Su prevalencia alcanza hasta un 20 % de perros, con un alto impacto económico y de calidad de vida. Se trata de procesos degenerativos crónicos, irreversibles y progresivos, que conducen a cambios en todos los componentes articulares: cartílago articular, hueso subcondral, membrana sinovial, líquido sinovial y tejidos blandos periarticulares.

Debido a su naturaleza avascular y a la escasa capacidad de autorrenovación de los condrocitos, el cartílago articular presenta muy limitadas capacidades de reparación. Por ello tras su daño, la recuperación completa de su estructura, función y capacidades biomecánicas es compleja y habitualmente evoluciona hacia la degeneración, perturbando en gran medida la dinámica articular.

Los tratamientos actuales no son curativos y se basan en obtener efectos sintomáticos más que regenerativos, y son incapaces de evitar la progresión de la enfermedad. Están basados en el control del dolor e inflamación como AINE, la viscosuplementación (inyecciones de hialuronato de sodio) y una variedad de productos nutracéuticos (sulfato de con-

droitina, glucosamina, colágeno II, ácidos grasos omega-3), llegando en casos muy graves a técnicas quirúrgicas agresivas.

Cartílago articular

El cartílago articular hialino tiene una composición específica (*figura 1*) que se ve alterada con procesos degenerativos:

- Agua. Representa el 65-80 % de su composición. Está presente en mayor cantidad en las porciones superficiales del cartílago y es la responsable de su turgencia. Su contenido aumenta con el envejecimiento y en procesos degenerativos.

- Colágeno. En un porcentaje entre 10 y 20 %. Predomina el tipo II (95 %), que se corresponde a la matriz de sostén del cartílago, responsable de la resistencia a las fuerzas de tensión.

- Proteoglicanos. Suponen entre el 10 y 15 %. Son producidos por los condrocitos, y proporcionan la resistencia a las fuerzas de compresión y elasticidad.
- Condrocitos. Son escasamente el 5 %. Se trata del componente celular del cartílago y son los encargados de producir los proteoglicanos, el colágeno, las proteínas y algunas enzimas.

Es interesante recordar, que el cartílago articular carece tanto de inervación como de vasos sanguíneos y linfáticos.

El cartílago articular se puede dividir en distintas zonas (*figura 2*), dependiendo de la profundidad y orientación que adquieren las fibras de colágeno:

- Zona I o porción superficial, que abarca aproximadamente del 10 al 20 % del grosor del cartílago. Las fibras de colágeno se disponen de forma paralela a la superficie del cartílago. Los condrocitos son algo más pequeños y aplanados, y están dispuestos de forma paralela a la superficie articular.
- Zona II, media o transicional (40 - 60 %). Las fibras de colágeno tienen una disposición aleatoria. Los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en grupos.

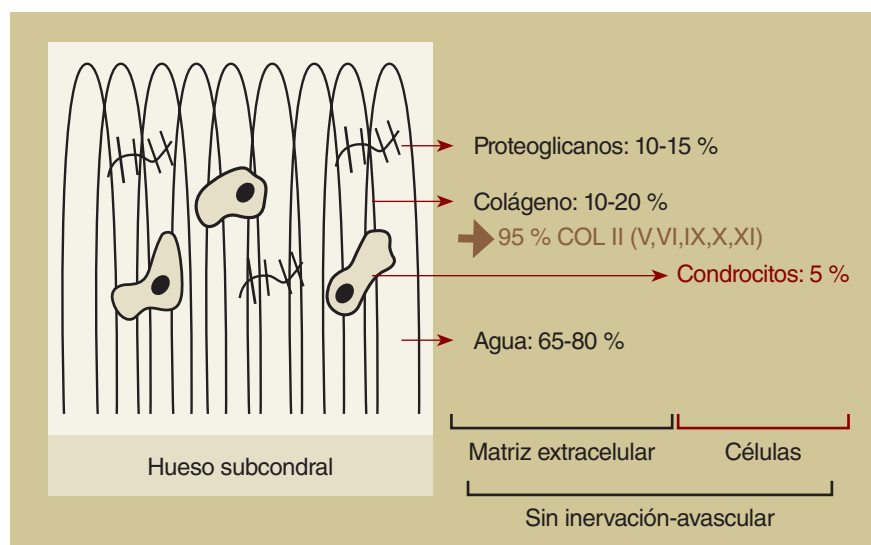


Figura 1. Composición del cartílago articular.

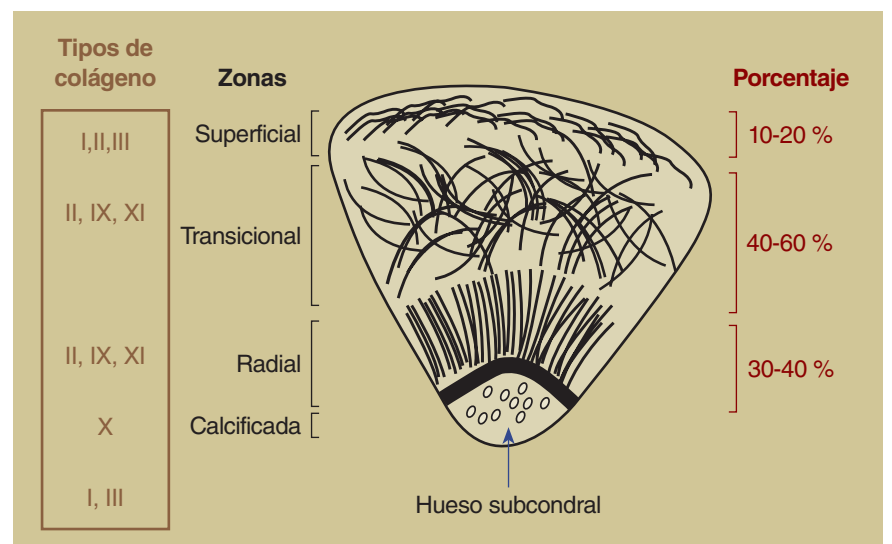


Figura 2. Zonas del cartílago articular.

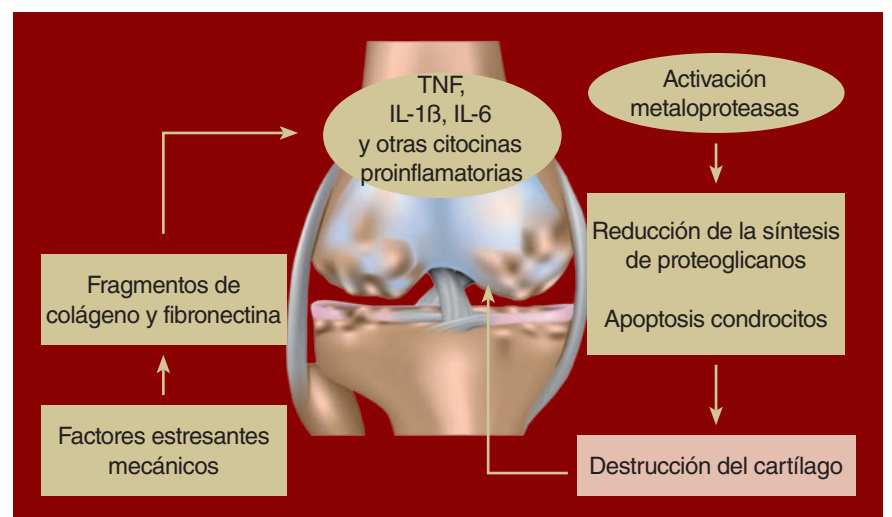


Figura 3. Fisiopatología de la osteoartritis.

- Zona III, profunda o porción radial (30 %). Las fibras de colágeno tienen una disposición perpendicular a la superficie y es la porción donde el entrelazado de colágeno es más compacto. Los condrocitos son elípticos, forman columnas y se orientan perpendicularmente a la superficie.
- Zona IV o lámina calcificada. Se corresponde a la zona donde el cartílago se fusiona a la cortical articular ósea. Aquí los condrocitos están más dispersos e irregulares.

Fisiopatología de la OA

Se considera que en la OA la inflamación juega, entre otros, un papel fundamental en el desarrollo de la misma, confirmando la hipótesis de que la sinovitis y el sistema inmunitario podrían ser agentes activos en su desarrollo y progresión.

Actualmente se admite que la fisiopatología de la OA es un proceso de base inmunológica, polarizado por una sobreproducción de citocinas proinflamatorias (TNF, interleucina-1 β , entre otras), proteasas (MMP-9 y 13), y otros mediadores catabólicos (óxido nítrico) a partir de los condrocitos y células sinoviales, que desencadenan la progresiva

degradación del cartílago articular, la remodelación del hueso subcondral y la inflamación sinovial (*figura 3*).

En condiciones fisiológicas, los condrocitos articulares mantienen un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Sin embargo, en estadios degenerativos una desviación en este equilibrio conduce a la pérdida progresiva de tejido cartilaginoso.

El desarrollo y mantenimiento de la estructura y de las características mecánicas del cartílago están vinculados directamente a los efectos de la carga mecánica sobre la biología de las células y la matriz extracelular del cartílago. Fuerzas mecánicas, tales como la carga y el movimiento son un requisito para el desarrollo, la renovación y el mantenimiento de la morfología e integridad funcional del cartílago articular.

Los cambios histológicos típicos de la OA en el cartílago, se caracterizan por un incremento en la proporción de agua, descenso en el contenido de la matriz extracelular y número de condrocitos, principalmente en las zonas superficial y media. Esta hipocelularidad es debida a un incremento en la apoptosis (muerte celular programada) de los condrocitos (*figura 4*). ►

► Terapias regenerativas biológicas

En pocos años, han surgido nuevas estrategias biológicas en la reparación del cartílago articular, cuyo fin además de controlar los procesos inflamatorios, es el de inducir su reparación/regeneración. Destacaremos en esta revisión el uso de algunos hemoderivados y terapia con diferentes tipos celulares (*figura 5*).

Moléculas bioactivas procedentes de hemoderivados

Son principalmente dos los hemoderivados más empleados en ortopedia veterinaria como fuente de biomoléculas: suero autólogo condicionado y plasma rico en plaquetas.

Suero autólogo condicionado (ACS)

El suero autólogo condicionado se obtiene incubando sangre entera con perlas de vidrio borosilicato, que estimula la liberación de proteínas antiinflamatorias por parte de los leucocitos, principalmente la IL-1ra. La IL-1 es una citocina que desempeña un papel muy importante en el desarrollo de la OA y degeneración del cartílago por su potente acción inflamatoria. Por lo tanto, su antagonista (IL-1ra) que es producida por los macrófagos activados en los procesos de reparación del cartílago, inhibiría los efectos perjudiciales de la IL-1 y proporcionaría efectos positivos sobre la patología articular. La IL-1ra compite con la IL-1 por los receptores celulares situados en la superficie del cartílago, concretamente en los condrocitos, lo que produce una inhibición en la producción de metaloproteasas y prostaglandinas, principales causantes del daño sobre la superficie del cartílago y pérdida de colágeno tipo II de su matriz.

Existen diferentes técnicas de preparación comercializadas para aplicaciones en Veterinaria (IRAP I, IRAP II, entre las más conocidas). Como en otros hemoderivados, existe una gran variabilidad individual en las concentraciones de factores de crecimiento y citocinas en ACS, influidas también de manera significativa por el sistema de preparación. En un reciente estudio en la especie canina, se demostró que no existían diferencias significativas en las concentraciones de IL-10, TNF- α , IGF-1, FGF-2 y TGF- β 1 entre ACS, plasma y suero. La concentración de IL-1ra en el ACS sí fue significativamente mayor que en el plasma, pero el conjunto de las concentraciones de citocinas proinflamatorias se mantuvieron bajas en el ACS canino (Hugings *et al.*, 2015; Sawyere *et al.*, 2016).

El ACS ha sido empleado fundamentalmente en medicina deportiva equina, con mejores resultados en las fases iniciales de OA. Sin embargo, a pesar de las mejoras clínicas, los estudios *in vitro* no han demostrado efectos condroprotectores, y es probable que la disminución de la inflamación sea principalmente la responsable de la reducción de la cojera y degradación del cartílago (Bogers, 2018).

En general, las respuestas descritas al tratamiento con ACS son variables, necesita de múltiples dosis en un corto espacio de tiempo (administraciones semanales) y con mejores resultados en patologías articulares inflamatorias leves y en su fase de inicio. Se han documentado algunos casos en los que se han producido reacciones adversas tras su aplicación, tales como irritación, calor y sensibilidad en el punto de inyección, posiblemente debido a una incorrecta preparación y presencia de células sanguíneas.

Plasma rico en plaquetas (PRP)

Bajo el término genérico de PRP se incluyen una variedad de productos derivados de la propia sangre del paciente obtenidos por centrifugación, que da lugar a una fracción de plasma con una concentración de plaquetas más alta que la de la sangre circulante. Las plaquetas se pueden activar artificialmente y liberar su contenido alojado en los gránulos alfa, que son ricos en una gran cantidad de proteínas y factores de crecimiento (EGF, PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, HGF, NGF, PF-4, entre otros), involucrados en multitud de procesos de reparación tisular.

En la especie canina, el uso de plasma rico en plaquetas en OA produce reducción de la sinovitis a través de mecanismos antiinflamatorios y analgésicos.

Como ya hemos comentado en otros artículos, su denominación varía en virtud de su preparación, composición, y especialmente la concentración de plaquetas y presencia o ausencia de leucocitos: plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento (PRPGF), concentrado de plaquetas (PC), plasma rico en plaquetas y en leucocitos (LR-PRP), plasma rico en plaquetas y pobre en leucocitos (LP-PRP), entre otros.

Actualmente, existen en Veterinaria diferentes sistemas de preparación, lo que hace que sea difícil comparar sus resultados científicos en términos de eficacia y seguridad (Carr *et al.*, 2015).

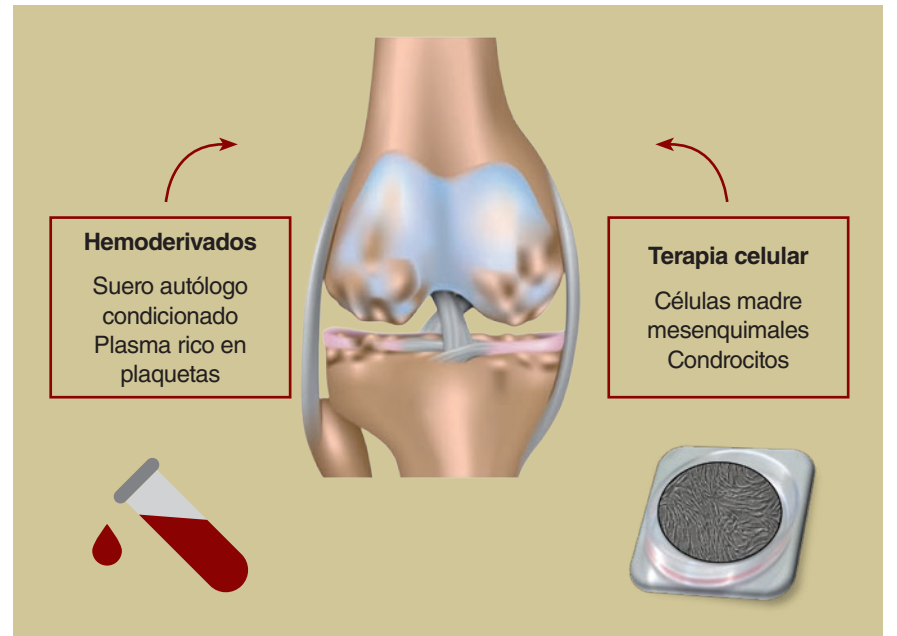


Figura 5. Terapias regenerativas biológicas en la OA.

Desde un punto de vista terapéutico, la calidad y actividad biológica está directamente relacionada con la composición celular (plaquetas, leucocitos y hematíes), que condiciona las concentraciones de los factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias:

- La concentración de plaquetas se correlaciona positivamente con todos los factores de crecimiento. Por tanto, para hablar de PRP este debe de tener entre 4 a 7 veces más concentración de plaquetas que la sangre circulante.
- Los componentes no plaquetarios de la sangre, en particular los glóbulos rojos y

Por lo tanto, dependiendo de la aplicación clínica, la modificación del método de preparación del PRP debe ser considerado en función de su capacidad para concentrar plaquetas y leucocitos, esenciales para lograr mejores resultados terapéuticos (*figura 5*).

En Veterinaria, desgraciadamente, no es infrecuente la inadecuada e incorrecta preparación y utilización de estos productos, que conlleva muchas veces problemas de inflamaciones graves, infecciones y con ello el empeoramiento del propio cuadro clínico.

Terapia celular

Actualmente son dos los tipos celulares más empleados en la reparación/regeneración articular: los condrocitos adultos y las células madre mesenquimales.

Condrocitos

La implantación de condrocitos autólogos (ACI) se basa en el injerto de células previamente aisladas con propiedades condrogénicas dentro del defecto del cartílago rodeados de tejido sano. Brittberg y colaboradores, fueron los primeros en publicar los resultados clínicos en humanos con esta técnica en 1994.

La técnica requiere tres fases:

- Biopsia de cartílago sano mediante artroscopia.
- Aislamiento y expansión *in vitro* de los condrocitos en cultivo monocapa.
- La implantación quirúrgica de condrocitos cultivados.

Los condrocitos son implantados sobre distintos biomateriales que sirven de soporte, como son un colgajo de periostio (ACI) o membrana de colágeno tipo I y II (MACI). A día de hoy existen en humana diferentes productos autorizados basándose en esta estrategia (*figura 6*).

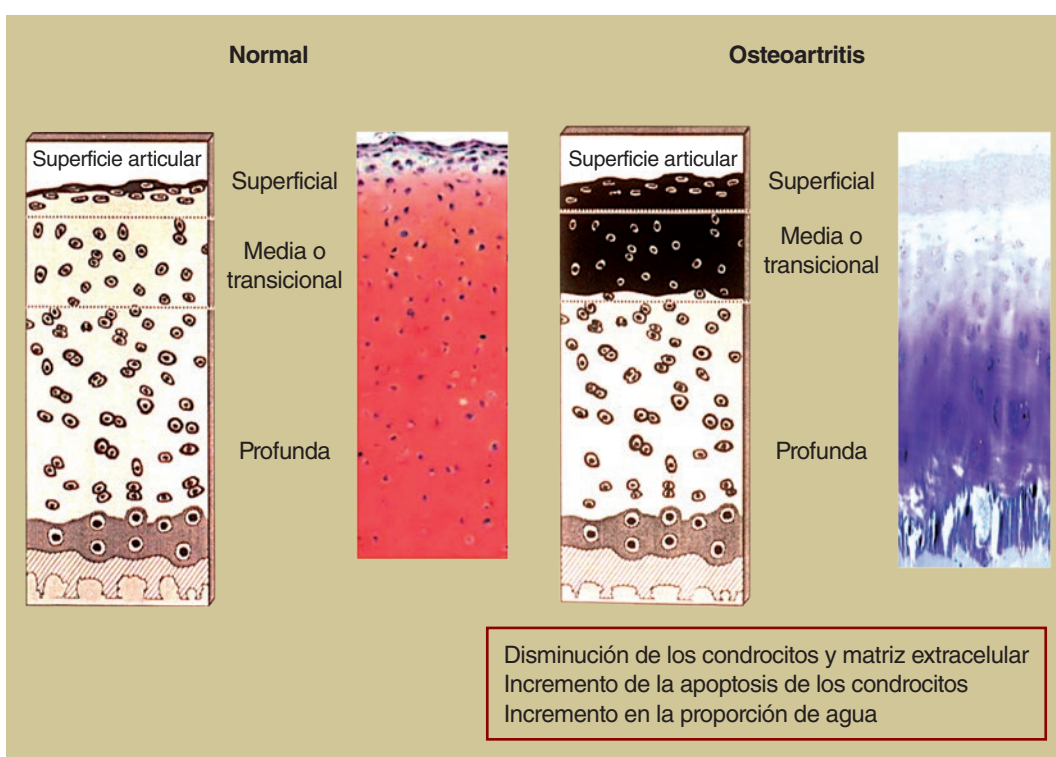


Figura 4. Histología del cartílago articular normal y osteoartrosis.

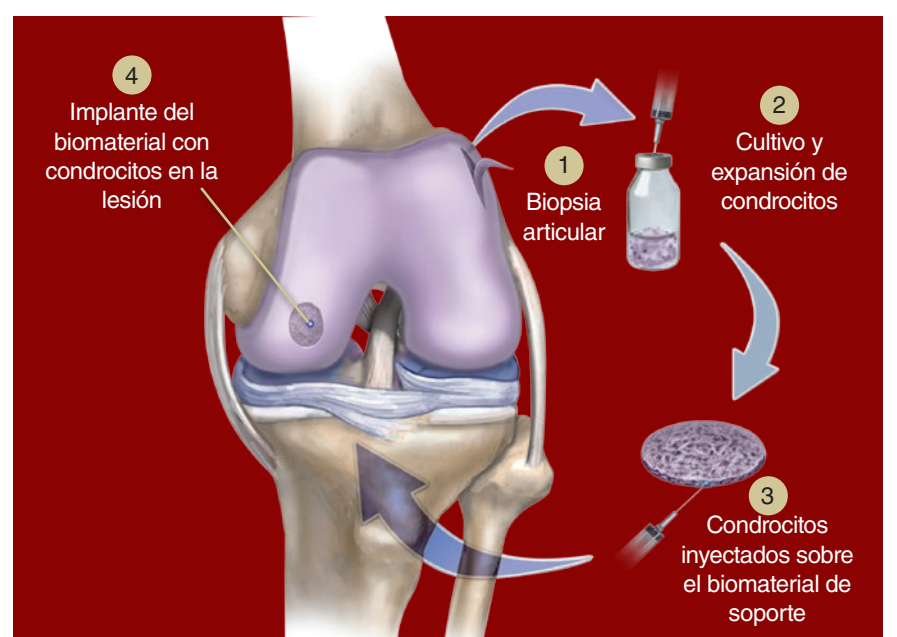


Figura 6. Trasplante autólogo de condrocitos.

► Sus indicaciones son específicamente el tratamiento de defectos locales del cartílago articular y lesiones subcondrales. Como criterio de exclusión a esta técnica está la existencia de un cuadro generalizado de OA. En estos casos, este proceso degenerativo afecta a la homeostasis articular, alterando el microambiente y propiciando que los condrocitos implantados puedan sufrir desdiferenciación o apoptosis indeseadas, y por lo tanto, socavando su eficacia.

Las principales fuentes de MSC en el perro y gato son el tejido adiposo y médula ósea, principalmente por la abundancia de estos tejidos y su facilidad de extracción.

Sin embargo, estas terapias han demostrado algunos inconvenientes:

- Los condrocitos pierden expresión de sus principales marcadores durante su expansión *in vitro*, y este proceso de desdiferenciación conduce a la formación de un fibrocartílago biomecánicamente inferior al cartílago hialino original.
- Otra limitación está relacionada con el uso del biomaterial de soporte para retener el trasplante celular dentro de defecto articular, que a veces conduce a hipertrofia, calcificación incontrolada o formación de adherencias.
- Al tratarse de células diferenciadas, su capacidad de regeneración está enormemente limitada al compararla con el potencial que pueden representar otros tipos celulares como las MSC.

Además, según la especie, el comportamiento *in vitro* de la expansión de los condrocitos es diferente, en aspectos como el grado de desdiferenciación y la estabilidad de su fenotipo de condrocito que puede afectar al mantenimiento de su compromiso condrogénico y potencial de rediferenciación. Se ha descrito, que el fenotipo de condrocito de oveja se mantiene mejor que el de condrocitos humanos, que a su vez se desdiferencian en menor grado que los condrocitos de perro. Por consiguiente,

después de la expansión, los condrocitos de oveja reforman espontáneamente el cartílago de tipo hialino; los condrocitos humanos se rediferencian solo bajo estimulación con inductores condrogénicos mientras que, después de algunos pasajes, los condrocitos de perro pierden cualquier capacidad de rediferenciarse independientemente de la presencia de inductores. Por lo tanto, las condiciones que permiten la formación de cartílago en una especie no son necesariamente trasladables a otras especies (Giannoni *et al.*, 2005).

A pesar de que la especie canina ha sido modelo experimental para el desarrollo de estas técnicas, prácticamente no existen estudios referidos a su eficacia en los procesos degenerativos articulares padecidos de manera natural (Breinan *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha publicado la eficacia del trasplante autólogo de condrocitos en procesos degenerativos del disco intervertebral en la especie canina. Los condrocitos de disco autólogos se expandieron en cultivo y se devolvieron al disco mediante un procedimiento mínimamente invasivo después de 12 semanas. Los condrocitos de disco trasplantados, produjeron una matriz extracelular que mostraba una composición similar al tejido del disco intervertebral normal (Ganey *et al.*, 2003).

Sin embargo, sí existen algunos resultados clínicos interesantes en el tratamiento de lesiones subcondrales en la especie equina con esta técnica (Ortved *et al.*, 2012).

Células madre mesenquimales (MSC)

Como ya hemos indicado en otros artículos, las MSC desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y reparación de los tejidos en los cuales se localizan. Concretamente, las MSC han sido descritas en diversas estructuras anatómicas de la articulación: membrana sinovial, líquido sinovial, almohadilla de grasa infrapatelar, cartílago articular, ligamentos y menisco. Proporcionan un depósito de células reparadoras que se activan en respuesta al crecimiento, remodelación y reparación. Además, actúan como centinelas del sistema inmunitario para reducir

la inflamación o la modulación de la activación de células T (figura 7).

Hay que recordar también que las principales fuentes de MSC en el perro y gato son el tejido adiposo y la médula ósea, principalmente por la abundancia de estos tejidos y su facilidad de extracción. Aunque ambos tipos son muy similares en sus caracteres fenotípicos, de diferenciación multipotencial y capacidad inmunomoduladora, presentan diferencias notables en su perfil secretor, lo cual es un aspecto importante de cara a la selección del tipo celular más idóneo para la terapia.

Son muy numerosos los estudios que han demostrado la eficacia clínica y seguridad de la administración intraarticular de MSC en el tratamiento de OA, tanto en especies domésticas como en el ser humano (Harman *et al.*, 2016; Lee e Wang, 2017).

Su mecanismo de acción es fundamentalmente paracrino por un efecto inmunomodulador/antiinflamatorio más que por la diferenciación en otros linajes celulares. Dicha actividad se realiza a través de la liberación de numerosas moléculas bioactivas, entre las que se encuentran diferentes factores solubles (citocinas, factores de crecimiento, etc.) y vesículas extracelulares (exosomas y microvesículas), todo ello englobado bajo el concepto de secretoma (Kapur e Katz, 2013; Villatoro *et al.*, 2017; Villatoro *et al.*, 2018) (figura 8).

Las MSC liberan citocinas para iniciar la reparación del cartílago, que es seguido por proliferación condrogénica junto con secreción de matriz extracelular y liberación de factores de crecimiento (destacando TGF- β , FGF e IGF-1, entre otros), con importante capacidad en la reparación/regeneración del cartílago (figura 9).

El tratamiento con MSC en la OA canina, permite una mejoría clínica y funcional de al menos un año de duración en el 95 % de los animales implantados, con una disminución o eliminación de la toma de AINE, y sin ningún tipo de complicación.

A nivel celular, el mecanismo de acción de la terapia con MSC en la OA se realiza a través de vías de señalización de la β -catenina, la proteína morfogénica ósea (BMP) 2 y proteína cinasa activada por mitógenos, capaces de inducir la síntesis de cartílago hialino que expresa colágeno II y disminución de los diferentes mediadores proinflamatorios y metaloproteasas.

Como se comentó anteriormente, la condrogénesis es el resultado de un delicado y equilibrado proceso en el que intervienen determinados factores para la formación de cartílago de calidad. Durante la etapa temprana de la condrogénesis, las MSC residentes expresan factores de transcripción como Sox9, Nanog y Oct 3 y 4. A medida que las células se diferencian en condrocitos, estos comienzan a producir una matriz extracelular rica en colágeno tipo II, proteínas y agreganos, así como la expresión del factor transcriptor Runx1.

Frente a diferentes condiciones antes mencionadas, los condrocitos pueden comenzar un proceso de hipertrofia no deseada. A medida que esta avanza, los condrocitos continúan agrandándose, diferenciándose y generando una matriz mineralizada, aumentando la producción de colágeno de tipo X, metaloproteasas y expresando Runx2, deteriorando así la función del tejido de reparación.

Por tanto, toda estrategia que aumente la expresión de Sox9 y Runx1 puede ayudar a bloquear la hipertrofia no deseada, promoviendo la reparación del cartílago articular dañado.

Por nuestra experiencia, un aspecto condicionante de la respuesta terapéutica en procesos degenerativos articulares es la

existencia de un ambiente articular adecuado relacionado con la intensidad de su cuadro inflamatorio.

Dado que las MSC actúan como una "terapia inteligente", una excesiva cantidad de mediadores inflamatorios en la articulación puede favorecer su actividad proosteogénica en vez de la procondrogénica (por la falta de expresión de Sox9) por parte de las MSC, lo cual aumenta el riesgo de desarrollar osteofitos y calcificaciones ectópicas, situación contraria al efecto reparador esperado. Por lo tanto, una adecuada evaluación y control de la inflamación articular, así como la selección del momento terapéutico de aplicación antes de la terapia es importante en estos casos para una regeneración eficiente del cartílago.

Recientes estudios clínicos en el tratamiento de la OA de rodilla en el ser humano y otros modelos preclínicos, han demostrado que el número de células implantadas es un hándicap importante, del cual depende en gran parte la mejoría clínica y funcional, así como la disminución/reparación del daño articular evaluado por resonancia magnética (RMI) (Lamo-Espinosa *et al.*, 2016).

Resultados positivos por imagen en la reparación/regeneración del cartílago articular posterior a la terapia con MSC y disminución de las citocinas proinflamatorias también han sido descritas recientemente en la especie canina (Zhang *et al.*, 2018).

Por nuestra experiencia, el tratamiento con MSC en la OA canina, permite una mejoría clínica y funcional de al menos un año de duración en el 95 % de los animales implantados, con una disminución o eliminación de la toma de AINE, y sin ningún tipo de complicación.

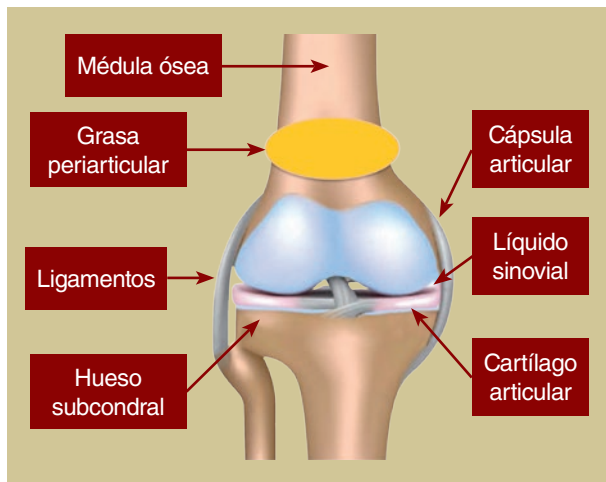


Figura 7. Localización de MSC residentes en la articulación.

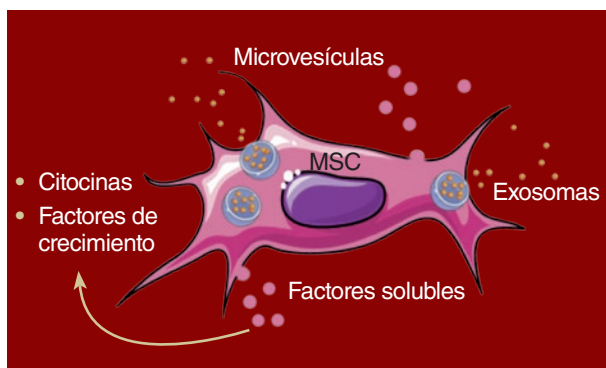


Figura 8. Secretoma de las MSC.

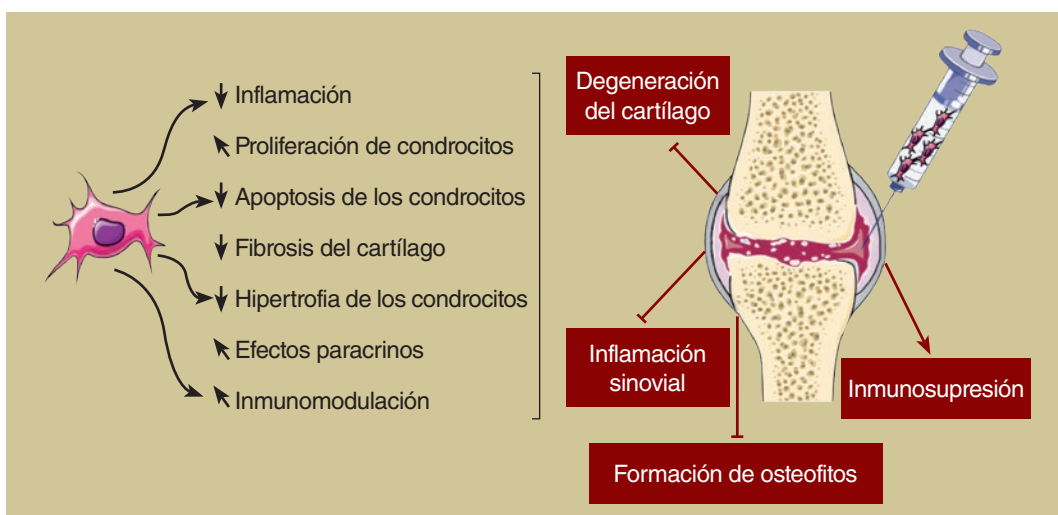


Figura 9. Terapia regenerativa con MSC.