



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO)
Instituto Nacional de Rehabilitación (INR)

*EVALUACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN
LAMINITIS CRÓNICA CON IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES
PURINÉRGICOS P2X EN BIOPSIAS DE TEJIDO LAMELAR*

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:
GABRIELA ARANDA CONTRERAS**

**TUTORA:
Dra. María Masri Daba (FMVZ)**

**COMITÉ TUTOR:
Dra. Sara Caballero Chacón (FMVZ)
Dr. Gerardo García Tovar (FES Cuautitlán)**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

*Con todo mi amor para mi padre Juan Aranda,
mi guía y fuerza siempre.*

*Para mi amor y compañero Amed, por su amor, comprensión y paciencia
A mi madre Pilar y mi hermano Daniel.
Gracias por su apoyo incondicional. Esto es por ustedes.*



AGRADECIMIENTOS

Debo dar las gracias principalmente a la Dra. María Masri y la Dra. Alma García, sin ellas no habría tenido la oportunidad de ser parte de este proyecto tan fantástico y personalmente enriquecedor, agradezco profundamente su voto de confianza y espero haber respondido a la altura. Fue un honor y un privilegio poder contar con su apoyo, consejos y conocimientos, ¡Infinitas gracias!

Los doctores Ricardo Gómez del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y la doctora Margarita Chavarín del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO), gracias a ustedes pude desarrollar mis habilidades de laboratorio, muchas gracias por su apoyo en los ensayos, por su participación en este proyecto y compartir parte de su conocimiento conmigo. Gracias al doctor Ricardo por su disponibilidad, amabilidad y soporte importantísimo en el manejo de biopsias de médula ósea y cultivo celular, una parte delicada del proyecto. Gracias a la doctora Margarita por su enorme paciencia y cariño, por instruirme en cortes histológicos, tinciones e inmunohistoquímicas, debido a eso pude realizar por mí misma estos procedimientos y obtener resultados óptimos. ¡Muchas Gracias!

Gracias a los doctores Gabriel Gutiérrez (IIBO) y Clemente Ibarra (INR) por permitirnos el ingreso a los respectivos institutos y realizar parte importante del proyecto en los laboratorios a su cargo.

A todos los clínicos que confiaron en el proyecto y nos permitieron trabajar con sus pacientes con laminitis en un intento por mejorar su calidad de vida y disminuir el dolor, no tengo palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy ante su confianza, gracias a ustedes pudimos completar este estudio y obtener resultados tan prometedores. Mi más sincero agradecimiento.

Gracias a todos mis maestros, tanto en licenciatura como en posgrado, sus conocimientos y tiempo invertido en mí han sido bien empleados y este trabajo es la prueba.

Gracias a Conacyt.

¡Gracias infinitas UNAM!

CONTENIDO

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Células Troncales Mesenquimales	9
Receptores Purinérgicos P2X7.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
METODOLOGÍA.....	15
Obtención, Aislamiento y Cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea Equina	15
Citometría de Flujo	15
Selección Pacientes en Tratamiento	16
Estudios Venográficos y Termográficos	16
Obtención de Biopsias De Tejido Lamelar Equino.....	16
Evaluación Histológica del Tejido Lamelar	17
Pruebas Inmunohistoquímicas en Tejido Lamelar (Detección de P2X7).....	17
Administración de CTM	17
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS.....	19
Identificación de Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea por Citometría de Flujo.	19
Estudios Venográficos	19
Estudio Termográfico del Casco Equino	21
Evaluación de la Clasificación Obel Previo y Posterior a la Terapia Celular.....	22
Evaluación Histológica del Tejido Lamelar	23
Prueba Inmunohistoquímica (Detección de P2X7)	28
DISCUSION	32
CONCLUSIONES.....	37
PERSPECTIVAS.....	38
REFERENCIAS	39
ANEXOS.....	42
Anexo 1.....	42
Tabla: Datos de los pacientes en estudio	42
Anexo 2.....	42
Tabla: Donadores de Médula Ósea	42

Anexo 3.....	43
Clasificación de Alteraciones Histológicas en Laminitis	43
Anexo 4.....	44
Gráficas. Resultados de Correlación de Pearson.....	44

Evaluación de Células Troncales Mesenquimales Alogénicas en Laminitis Crónica con Identificación de los Receptores Purinérgicos P2X en Biopsias de Tejido Lamelar

RESUMEN.

Introducción: Laminitis es una enfermedad compleja del casco equino. Se caracteriza por el colapso del aparato suspensor de falange distal (ASFD), la unión entre el casco y la falange se debilita hasta que se pierde en su totalidad, la falange distal es desplazada por la presión del peso del animal y fuerzas motoras hacia la suela del casco, dañando arterias y venas, destruyendo el corion de la suela y corona, causando profundo dolor y claudicación. *Objetivos:* Se espera demostrar que las células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, administradas en los caballos que sufren de laminitis crónica por medio de perfusión regional son capaces de controlar inflamación y regenerar el tejido lamelar en estos caballos; y comprobar que receptores purinérgicos P2X-7 se expresan en las biopsias de tejido lamelar de caballos con laminitis crónica y su expresión disminuye debido al tratamiento celular. *Métodos:* se evaluaron 9 caballos antes de la administración de 30 millones de células troncales Mesenquimales (CTM) alogénicas y después de seis meses de su administración por medio de evaluación clínica, clasificación Obel, venografías, termografías, biopsias de tejido lamelar para su estudio histológico, así como inmunohistoquímicas para detectar los receptores P2X-7; los caballos fueron divididos en grupos de una o tres dosis de CTM. *Resultados:* las células en cultivo mostraron inmunofenotipo troncal bajo citometría de flujo, las venografías mostraron evidencias de una aparente angiogénesis después del tratamiento, la termografía mostró disminución significativa en la temperatura de la corona del casco, existió una disminución en los grados de claudicación y dolor, el tejido lamelar mejoró estructuralmente después del tratamiento y las pruebas inmunohistoquímicas mostraron un descenso en la expresión de los receptores sin ser estadísticamente significativo. *Conclusión:* Los resultados mostraron evidencia estadística que comprueba la mejoría clínica de todos los caballos tratados con células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea sin señales de reacciones de hipersensibilidad. Tres dosificaciones de 30 millones de células por dosis mensualmente, resultó ser el tratamiento más efectivo, sin importar el origen de la laminitis o el tiempo de curso con la enfermedad. Los receptores P2X-7 están presentes en el tejido lamelar pero no se encontraron evidencias estadísticamente significativas de su baja expresión debido al tratamiento celular.

PALABRAS CLAVE: Laminitis, células troncales mesenquimales, receptores purinérgicos P2X7, terapia alogénica.

INTRODUCCIÓN.

Laminitis es la enfermedad más compleja del casco equino, provoca cambios patológicos tan severos que terminan en la pérdida de la función motora. Como definición, la palabra laminitis significa *inflamación de la lámina*, que es parte de la unión epidermis-dermis. (Krampf 2012) Puede describirse de forma sencilla como, la imposibilidad de la falange distal para mantener su unión con las láminas internas del casco (Pollitt 2004; French & Pollitt 2004) Se caracteriza por el colapso del aparato suspensor de falange distal (ASFD), la unión entre el casco y la falange se debilita hasta que se pierde en su totalidad, la falange distal es desplazada por la presión del peso del animal y fuerzas motoras hacia la suela del casco, dañando arterias y venas, destruyendo el corion de la suela y corona, causando profundo dolor y claudicación. (Krampf 2012; Collins 2010)

Dependiendo de los cambios patológicos y la apariencia de los signos clínicos, el curso de la enfermedad puede subdividirse en etapas o fases. La laminitis en su fase aguda comienza con la presencia de signos clínicos, entre los cuales se encuentra el aumento de temperatura en los cascos, aumento en el pulso digital y claudicación perceptible. Esta fase termina tan pronto como la falange distal se desplaza dorso ventralmente dentro del casco o después de 72 horas de presentarse los signos. (Laskoski et al. 2016; Paes Leme et al. 2010; Pollitt 2004) Después de este periodo la enfermedad será crónica; sin embargo, no todos los equinos transitan a esta fase, algunos mueren debido a la enfermedad desencadenante original o aparentan tener una recuperación completa al término de la fase aguda. (Krampf 2012)

Se considera crónica, si los signos de la enfermedad permanecen por más de 72 horas o una vez que la falange distal presente desplazamiento dorso palmar/plantar debido a un colapso mecánico del ASFD. (Fig. 1) (Belknap 2017; Krampf 2012; Mitchell 2010) La fase crónica puede durar indefinidamente, con signos clínicos fluctuantes, desde los persistentes, moderados o dolor severo,

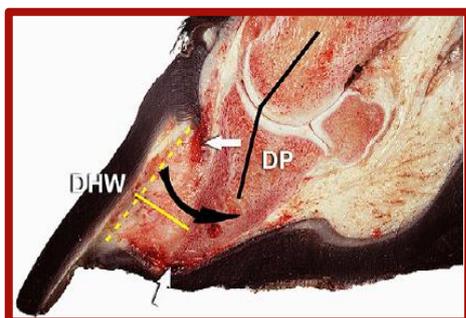


Fig. 1 Corte sagital del dígito equino demostrando rotación dorso palmar de falange distal. DHW-Pared dorsal del casco; DP-falange distal; Flechas blancas-zonas de hemorragia; Líneas amarillas-cuña lamelar; Flecha negra curva-dirección de la rotación. Collins et al. 2010

seguido de degeneración de las uniones lamelares, recumbencia, deformación del casco y desprendimiento de este. Se caracteriza por un colapso mecánico del ASFD, lo que implica la pérdida de la conexión entre la cápsula del casco y la falange distal en diversos grados, su consecuencia, como se ha mencionado, es la rotación dorsopalmar/plantar de la falange distal y su descenso distalmente en los casos severos; como el corion coronario está firmemente unido al casco, el tejido de la banda coronaria desciende junto a la falange; lo anterior origina una depresión notable sobre la región proximal a la banda de la corona y el margen proximal de la cápsula del casco se torna palpable. La profundidad de esta depresión es indicativa del grado en el que la falange distal se ha hundido dentro del casco. En casos de inflamación extensa, la banda coronaria se edematiza y se observa abultada sobre el borde proximal de la pared del casco.

(Pollitt 2004; Mitchell 2010; Krampf 2012) El desplazamiento vertical de la falange ocurre cuando hay pérdida de adhesión lamelar de manera circunferencial, este proceso sucede en pocos días después de la fase de desarrollo; estos caballos tienen un pronóstico reservado y desfavorable; posterior al desplazamiento distal proseguirá la necrosis de las láminas y desprendimiento completo del casco.

El crecimiento normal de la pared dorsal del casco se ve afectado, lo que desemboca en sobrecrecimiento de los talones, de igual manera, cambios en la tasa de crecimiento del dorso del casco dan origen a la aparición de los *"anillos de crecimiento"*; éstos se dibujan paralelos a la corona. El retardo en el crecimiento de la pared del casco de forma continua dará una apariencia de casco plano, también llamado forma de *"plato"*, al no ser corregido, la pinza del casco se curva y comienza a crecer en forma conocida coloquialmente como *"zapato de Aladino"*. (Belknap 2017; Krampf 2012)

Deficiencias en el llenado venoso de vasos circunflejos, circunferenciales y lechos sublamelares han sido reportadas en estudios angiográficos. (Fig. 2) (Baldwin & Pollitt 2010) Los caballos estarán en recumbencia debido al intenso dolor; pero una reducción en el mismo será perceptible al momento en el que el proceso isquémico aumente el área de tejido necrótico, parecerá que el cuadro clínico mejora hasta que el casco se desprende en su totalidad.

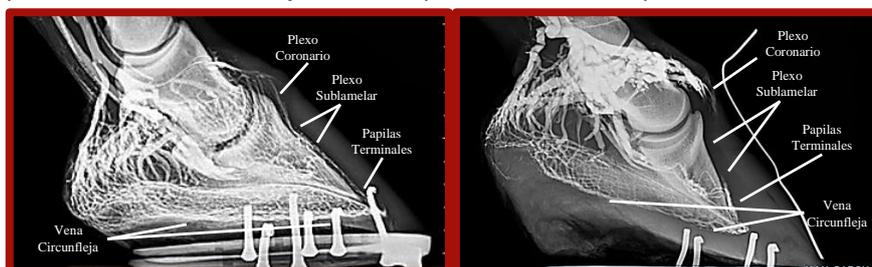


Fig. 2 Izq: Venografía de un caballo sano. Der: Venografía realizada en un caballo con laminitis crónica con curso de 8 meses, se muestra deficiencia de llenado en el plexo coronario, el plexo sublamelar se muestra difuso y se observa la rotación dorso palmar de la falange distal.

Cuando la falange rota dorsoventralmente, el espacio entre su superficie dorsal y la pared dorsal del casco se incrementa; esta área aparece con forma de cuña en un corte sagital, por lo que se refiere a ella como la *cuña lamelar* (Fig. 1). (Collins et al. 2010; Krampf 2012) En casos de rotación moderada, el espacio es ocupado por tejido lamelar debilitado, pero si la membrana basal (MB) ha sido eliminada, las células epidérmicas (CEs) comienzan un proceso hipertrófico para reducir la separación con la dermis (Fig. 3). Si la rotación es severa, la cuña lamelar consiste inicialmente de tejido necrótico, hemorrágico e inflamado, la laceración de la vasculatura contribuye a la formación de seromas; al estabilizarse la falange distal, el tejido dañado comienza con un proceso de reparación y es reemplazado por epidermis hiperplásica e hiperqueratinizada. (KUWANO et al. 2005; Collins et al. 2010)

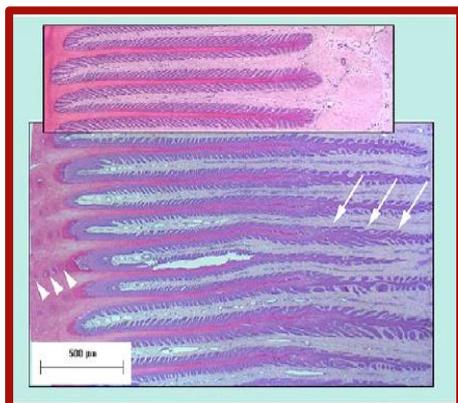


Fig. 3 Microfotografías de láminas normales (arriba) y láminas en fase crónica (abajo), después de 5 días de inducción de laminitis. Flechas: Señalan alargamiento de las láminas caracterizado por láminas epidérmicas secundarias displásicas en los ápices de las láminas epidérmicas primarias. Cabeza de flecha- proliferación epidérmica adyacente a los axis queratinizados de las láminas epidérmicas primarias, formación del cuerno. Collins et al. 2010

Durante un estudio realizado por Kuwano y colaboradores en 2005 en caballos con laminitis crónica, evaluaron los cambios de la MB usando pruebas histológicas, inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica. Mostraron evidencia de separación submural conteniendo un remanente de láminas epidérmicas secundarias (LES) degeneradas sugiriendo la separación de las láminas epidérmicas (LEs) de las láminas dérmicas (LDs) y que esto ocurrió durante las primeras fases de la laminitis. Sus hallazgos sugieren que el proceso de reparación es asociado a una proliferación progresiva de queratinocitos, además de una respuesta metaplásica de la estructura original de la LE en un tejido parecido a una papila terminal; éste cambio metaplásico derivaría en la generación de la línea blanca ectópica. (KUWANO et al. 2005)

La forma crónica de la enfermedad se caracteriza histológicamente por degeneración displásica de las LES, formación excesiva de cuerno intertubular sobre las puntas de las LDP y la proliferación de cuerno tubular cornificado y queratinizado contribuye a la formación de la cuña lamelar (Fig. 3). Sin embargo, el desplazamiento vascular de la dermis resultado del desplazamiento de la falange distal (Collins et al.

2010) limitaría la irrigación de los tejidos epidérmicos, sobre todo a los cercanos a la pared del casco, promoviendo un proceso de diferenciación por sobre un proceso de proliferación. Adicionalmente, el proceso inflamatorio debido a la enfermedad sistémica o al daño local del tejido, modulará el proceso de diferenciación-proliferación de las células epidérmicas. Carter y colaboradores sugieren que la diferenciación de las células epidérmicas, en lugar de su proliferación, contribuye a la acumulación de epitelio laminítico, pero que la proliferación en las fases tempranas podría contribuir a la acumulación inicial de tejido lamelar displásico. (Carter et al. 2011)

Islas epidermales han sido localizadas en la región axial de las LES, son halladas en exámenes histológicos después de 7 días de la inducción de laminitis con oligofruktuosa (Fig. 4). Han sido

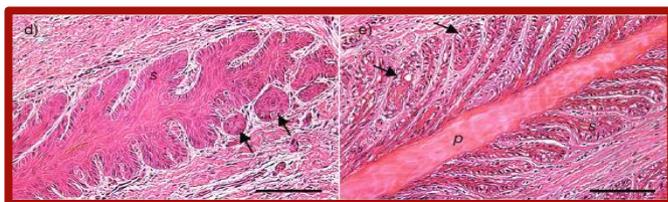


Fig. 4 Islas epidermales en láminas epidérmicas en caballos con laminitis crónica señaladas con flechas. Carter et al. 2011

describas en procesos de reparación cutánea en humanos y se cree son importantes en los procesos de re-epitelialización. A pesar de que, es posible que las islas epidermales que se observan en cortes histológicos de caballos con laminitis crónica, representan un intento por re-epitelializar el defecto generado por la separación de dermis y epidermis, estas estructuras no se

encuentran conectadas a las LEPs, por lo que han perdido su capacidad de servir como un sistema de unión. Con inestabilidad continua, estas islas podrían contribuir con la formación de la cuña lamelar. (Carter et al. 2011; Laminitis n.d.)

Se ha propuesto que las lesiones en tejido lamelar son inducidas por factores desencadenantes por diversas condiciones de enfermedad. Múltiples procesos patofisiológicos reportados durante la inducción de laminitis incluyen: aumento en la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, reclutamiento de leucocitos circulantes, vasoconstricción que conduce a hipoxia tisular, disminución en la cantidad de epitelio y uniones de membrana basal, aumento en la producción de enzimas remodeladoras incluyendo metaloproteinasas (MMPs). Estas observaciones sugieren que la laminitis es el resultado de la combinación de inflamación, disfunción en la regulación de proteasas endógenas involucradas en la remodelación y la pérdida de las proteínas de adhesión. Sin embargo, la secuencia del proceso patofisiológico que conduce a la falla de las láminas no ha sido establecido en ningún modelo experimental, y debe determinarse si la inflamación o la remodelación aberrante del tejido en laminitis son procesos independientes o conllevan una relación. También debe establecerse cuales de estos procesos ocurren en los modelos experimentales o en los naturalmente adquiridos de laminitis. (Loftus et al. 2009)

Wagner sugirió en 2003 que la laminitis crónica debe tener un componente autoinmune; aunque esta hipótesis estaba lejos de probarse ya que las enfermedades autoinmunes están caracterizadas por anticuerpos circulantes o la presencia de células T reactivas, aunado a un conteo leucocitario elevado, aumento en las interleucinas, así como de proteínas e inmunoglobulinas de la fase aguda en suero. Pero en 2012 Steelman y Chowdhary encontraron evidencias de esto al ver cambios en las concentraciones de IgM, IgA y proteínas de fase aguda como el fibrinógeno, fetuina A y B, macroglobulina α -2 y antitripsina α -1 en plasma de caballos con laminitis crónica, proveyendo soporte a la posible vía autoinmune como una explicación de la enfermedad. Steelman y colaboradores en 2013 investigaron los parámetros de inmunidad humoral y celular a nivel sistémico y local en caballos con laminitis crónica; sus resultados sugieren un papel importante de los neutrófilos en el mantenimiento del estado inflamatorio crónico de laminitis, así como el daño en el tejido, estos neutrófilos resultaron productores de gran cantidad de IFN- γ , a pesar que los neutrófilos no son reconocidos por la producción de ésta interleucina, algunas evidencias sugirieron que pudo ser provocado por el estímulo de la IL-12. (Steelman et al. 2013) Debido a la habilidad de los neutrófilos de liberar proteasas, especies reactivas de oxígeno y citocinas inflamatorias, es muy probable que esto contribuya al daño lamelar durante la fase crónica de laminitis. De hecho, algunos científicos han propuesto la hipótesis de que los neutrófilos conducen la inflamación sistémica y laminar durante la fase aguda, particularmente en la inducción con nogal negro; es posible especular que la presencia de los neutrófilos en la fase crónica es el resultado de traumas repetidos en el tejido durante la biomecánica del caballo. Todas estas evidencias no fueron suficientes para sostener una hipótesis autoinmune, pero sugieren que la inflamación en las láminas puede estar ligada a los queratinocitos y al infiltrado de neutrófilos en respuesta a lesiones continuas debido al desplazamiento y soporte de la masa corporal del caballo diariamente. (Steelman et al. 2013; Leise 2018)

Células Troncales Mesenquimales

La perfusión regional endovenosa de células troncales mesenquimales (CTM) es una técnica aprovechada actualmente por algunos investigadores y clínicos para el tratamiento de laminitis empleando la vena digital lateral. Sin embargo, aún no existen los lineamiento de la enfermedad y su patofisiología no está determinada, lo que limita la visión del tratamiento; existen escasos datos publicados que evalúen la efectividad de éstas células troncales como tratamiento en laminitis, técnica de administración, tipo celular, número de células administradas, etc. (Schnabel et al. 2013). De forma ideal, los caballos con laminitis deben ser tratados en la fase aguda, en un intento de disminuir la respuesta inflamatoria, lo que requiere la administración de células autólogas o alogénicas.

Las características funcionales, su capacidad multipotencial y plasticidad de las CTM las vuelven ideales para su aplicación clínica. Su uso clínico, presente y futuro, abarca enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco y hematopoyético, entre otros. El empleo de CTM en esquemas terapéuticos en humanos ya se ha realizado con éxito. Lazarus y cols., citado por Flores (2006), han presentado evidencia al respecto, demostrando que las CTM de humano pueden ser expandidas in vitro y trasplantadas en sujetos, sin causar efectos adversos; éstas células fueron bien toleradas por pacientes y detectadas en distintos tiempos posteriores al trasplante. (Flores-Figueroa et al. 2006) Otra alternativa en la terapia celular es el uso de las CTM para promover angiogénesis. Diversos estudios han usado los modelos de isquemia y demostraron que estas células tienen un efecto positivo en la recuperación del flujo sanguíneo. Se han propuesto dos mecanismos por los cuales esto ocurre; por una parte, existe evidencia de generación e incorporación de nuevas células endoteliales derivadas de CTM a los capilares en neoformación, y por otro lado, se ha demostrado que las CTM promueven la angiogénesis a través de diversas citocinas con éste propósito (VEGF-A, FGF-2, IL-6, PIGF y MCP-1). (Flores-Figueroa et al. 2006)

Las CTM tienen la capacidad de dar origen a diversos tipos celulares, como fibroblastos o células reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos. En los años 90's, los investigadores usaron el término *célula troncal mesenquimal* para describir cualquier tipo celular obtenido de los compartimentos estromales de médula ósea, grasa y otros tejidos, eran células con capacidad de adhesión al plástico de placas de cultivo y capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares in vitro. Pero los científicos tuvieron problemas para diferenciar éstas células in vivo, lo que originó cuestionamientos a cerca de la capacidad terapéutica de estas células. En 2006, durante la reunión de la International Society for Cellular Therapy, se creó un documento proponiendo a la comunidad científica el uso del término *células estromales mesenquimales multipotentes* en lugar de *célula troncal mesenquimal*, éste último solo se reservaría a los casos en los cuales las células fueran capaces de autorenovarse y diferenciarse en tipos celulares específicos in vivo. Arnold Caplan, quien propusiera el nombre de *célula troncal mesenquimal* en 1991, dio a conocer en 2017 su postura y pidió a la comunidad científica referirse a este tipo celular como "*medicinal signaling cells*". A pesar de las peticiones, existen gran cantidad de artículos publicados actualmente en diversas plataformas científicas aún con el nombre de Células Troncales Mesenquimales. Es importante mencionar que bajo estas premisas, el presente trabajo habla de células estromales mesenquimales multipotentes derivadas de médula ósea de equinos, ya que el protocolo usado para su cultivo solo ha demostrado en proyectos anteriores, diferenciación in vitro.

Una célula troncal, es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente sino también de forma funcional. Las CTM son células multipotentes que inicialmente se creía eran células progenitoras en un tejido en remodelación y actualmente son estudiadas por su potencial inmunomodulador en medicina regenerativa. (Cassano et al. 2015)

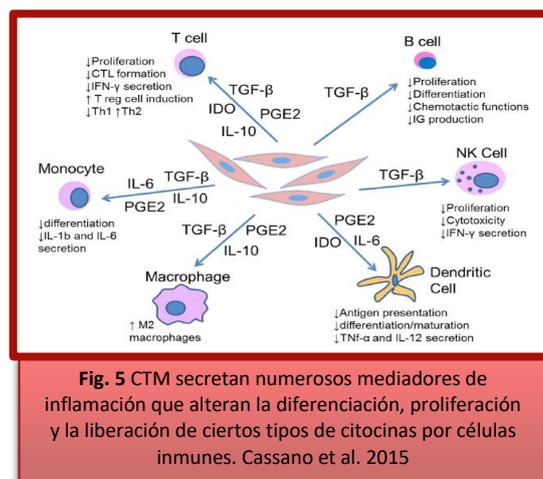
En un principio, se reportaba que las CTM expresaban un bajo o nulo nivel de MHC-II, el cual es utilizado para reconocimiento y activación inmune; en diversos estudios posteriores se observó que las CTM poseían una expresión variable de MHC-II en diversas especies. Cassano (2015) encontró que la expresión de MHC-II en CTM derivadas de médula ósea fue variable entre individuos y puede cambiar adicionalmente con el pasaje celular. (Cassano et al. 2015) Ranera y colab. (2011) caracterizaron las CTM en equinos, con la finalidad de identificar los marcadores celulares que eran

compartidos con los humanos; concluyeron que los antígenos de superficie son fenotípicamente similares entre humano y equino. (Ranera et al. 2011; Penny et al. 2012)

Diversas moléculas relevantes en la hematopoyesis son producidas por las CTM, incluye a componentes de la matriz extracelular (colágena, laminina, trombospondina, tenacina, fibronectina), citocinas (IL-6, IL-11, factor inhibitorio de leucemia LIF, factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF, SCF, ligando de FLT-3, trombospondina Tpo, factor de crecimiento vascular endotelial VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 1 FGF-1, proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 y factor de crecimiento de placenta PlGF. Estas células secretan varias citocinas como prostaglandina $E_2\alpha$ (PGE_2), factor transformante β ($TGF\beta$), antagonista del receptor de interleucina 1 ($IL-1ra$), $IL-6$ e $IL-10$; también secretan indolamina 2,3 desoxigenasa (IDO), la cual está involucrada en el catabolismo del triptófano y es uno de los mecanismos por los cuales puede inhibir la proliferación de células T; en conjunto, estas citocinas actúan generando un microambiente propicio para la reparación tisular. (Flores-Figueroa et al. 2006; Cassano et al. 2015)

Entre sus características funcionales generales se encuentran las siguientes (Vertes et al. 2015; Cassano et al. 2015; Flores-Figueroa et al. 2006; Lanza et al. 2004; Vázquez et al. 2012; Schnabel et al. 2013):

- ⊗ No se diferencian en tejido dañado.
- ⊗ Tropismo por tejidos lesionados.
- ⊗ Retrasa cicatrización.
- ⊗ Favorece angiogénesis.
- ⊗ Químico atracción.
- ⊗ Tienen a migrar y localizarse en la red capilar más cercana (CXCL12, CXCL4).
- ⊗ No generan hipersensibilidad o rechazo en forma de trasplante, ya que no expresan MHC-II.
- ⊗ Propiedad inmunomoduladora: linf. T, cél. dendríticas, cél. B, cél. NK.



Las CTM tienen efectos diversos sobre las células del sistema inmune (Fig. 5), secretan factores que concluyen en múltiples niveles de regeneración. Las CTM inducen la proliferación de células T_{REG} en modelos animales sobre artritis reumatoide y uveoretinitis, resultando en la supresión de la población T efectora. De manera *in vitro*, las CTM disminuyen la proliferación de células T, secreción de $IFN-\gamma$ e induce respuesta humoral por parte de las células Th2. De igual forma, la diferenciación de células B hacia células plasmáticas se ha visto ser inhibida por CTM derivadas de tejido adiposo; la proliferación, secreción y citotoxicidad del $IFN-\gamma$ por las células NK también se ve reducida de manera importante. (Cassano et al. 2015; Vertes et al. 2015; Fortier 2005) CTM alogénicas podrían ser una fuente rápida de células troncales para su administración como terapia, debido a sus características inmunoprivilegiadas. (Fortier 2005) Este tipo celular troncal dirige la población de monocitos a su polarización a una población de macrófagos tipo 2 (M2), el cual es un fenotipo regenerativo esencial en la eliminación del tejido dañado, sin creación de mayor inflamación. (Cassano et al. 2015)

Receptores Purinérgicos P2X7

Zamboulis y cols. (2013), estudiaron la distribución de los subtipos de receptores purinérgicos en distintos tejidos de caballos, al ser de gran interés por su relevancia en la transmisión de señales dolorosas, como lo es laminitis. Encontraron que los subtipos 1, 2 y 7 fueron evidentes en células de músculo liso de pruebas inmunohistoquímicas en arteria y vena digital palmar. En cuanto a las células epidérmicas basales de las láminas del casco, estas fueron positivas a los subtipos 1, 2, 3 y 7. (D. E. Zamboulis et al. 2013; D. Zamboulis et al. 2013) El subtipo 7 se expresó únicamente y fuertemente en las células de neurolemocitos. (D. Zamboulis et al. 2013) En otro estudio realizado por Zamboulis (2013) en caballos con laminitis, encontraron mayor expresión de P2X7 en células epidérmicas

parcialmente queratinizadas y en proliferación, éstas se encontraban adyacentes al axis queratinizado de la LEP, en caballos sanos no se observó su presencia (Fig. 6).

El término purinérgico hacía referencia a los nervios que utilizan ATP como su principal neurotransmisor, actualmente, este término se refiere más ampliamente a las señales impartidas por nucleótidos y nucleósidos extracelulares en todo tipo de células. (Lazarowski & Schwarzbaum 2009) Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática y se activan por la unión del ATP extracelular y una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na^+ , K^+ y Ca^{++}). Se han identificado hasta la fecha, siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan formando homo o heterooligómeros que dan lugar a canales fusionados. El grado de activación de los receptores purinérgicos depende del tipo y la concentración de los nucleótidos extracelulares. (Portugal & Gualix 2009; Lazarowski & Schwarzbaum 2009; D. Zamboulis et al. 2013)

Los receptores purinérgicos están distribuidos en todos los tejidos a través del sistema nervioso central y periférico, así como también en los endotelios y epitelios, túnica muscular de la vascular, leucocitos, plaquetas, mastocitos y macrófagos. Dentro del sistema nervioso central, éstos receptores se encuentran tanto en neuronas pre y post sinápticas como en células de la glía. Han sido asociados funcionalmente a la percepción del dolor y otras sensaciones. El receptor P2X7 está presente en células del sistema inmune, así como en la glía reactiva, en donde juega un papel en los procesos de inflamación y dolor. Otra característica distintiva del P2X7 es que, en determinados tipos celulares, la estimulación prolongada del receptor conduce a la apertura de un poro en la membrana que permite el paso de cationes. (Lazarowski & Schwarzbaum 2009; Portugal & Gualix 2009)

El papel del receptor P2X en células no excitables como leucocitos y células epiteliales está siendo ampliamente reconocido. El ATP endógeno liberado por células endoteliales y otro tipo de células epiteliales en respuesta a cambios en el microambiente del tejido, como hipoxia o acidosis, resulta en respuestas tales como proliferación celular, diferenciación y sobrevivencia.

La estimulación de los receptores P2X7 incrementa la expresión inducida de IFN- γ de la NOS de tipo II y la subsecuente producción de NO en la línea microglial de murinos BV-2. (Portugal & Gualix 2009) Los receptores P2X en la muscular lisa de vasos sanguíneos han sido relacionados con una función vasoconstrictora; el subtipo 7, de manera particular, tiene un papel importante en la regulación local de la circulación sanguínea en diversos tejidos, incluyendo arterias coronarias y cerebrales, mesenterio hepático, vasos sanguíneos de placenta y umbilicales. Se sugiere que los subtipos encontrados en piel tienen una función importante como sensores de estímulos externos; los receptores P2X7, son reconocidos por estar involucrados en la apoptosis inducida por ATP y se cree que es muy probable su participación en los procesos de diferenciación de los queratinocitos a su última etapa (terminal). La presencia

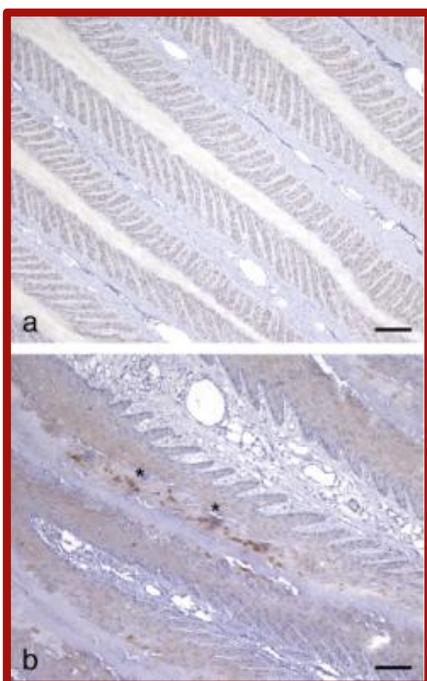


Fig. 6 Expresión del receptor P2X7 en láminas de casco de un caballo sano (a) y en láminas de un caballo con laminitis crónica (b). Zamboulis et al. 2013

de estos receptores en las células epidérmicas del casco sugiere una relación de éstos con el crecimiento y diferenciación celular. Por otra parte, el receptor P2X7 se relaciona a la inmunomodulación local de la función axonal de los neurolemocitos, lo realiza regulando la liberación de citocinas, esto toma particular importancia en lesiones nerviosas periféricas o neuropatías. (D. Zamboulis et al. 2013)

JUSTIFICACIÓN.

Investigaciones de la estructura del casco y función del aparato suspensor de la falange distal (ASFD), han brindado información fundamental para comprender como es que la laminitis se desarrolla. (Pollitt 2010) Los cambios patológicos están confinados al ASFD, los mecanismos patofisiológicos que dan origen a laminitis comenzarán a llevarse a cabo bajo el casco, cambiando de forma ultraestructural la histología normal del ASFD, siendo evidentes únicamente bajo el microscopio. La comprensión de la patofisiología de la enfermedad es vital para establecer las terapias efectivas contra la misma. (Belknap & Geor 2017, pt.Pathophysiology of Laminitis)

Existen diversas terapias disponibles únicamente para controlar el dolor en caballos con laminitis; debe elegirse y emplearse de acuerdo a la fase clínica de la enfermedad. La analgesia en la fase crónica de la enfermedad es llevada a cabo usualmente bajo terapia de antiinflamatorios no esteroideos; Paes Leme indicó en 2010 que el flunixin, ketoprofeno y fenilbutazona no evitaban el daño a las láminas, si éstos se administraban después de la aparición de los primeros signos clínicos, es decir después de la fase de desarrollo.(Paes Leme et al. 2010) El tratamiento basado en herrajes se encuentra ampliamente registrado en la literatura; se basa en el recorte y la aplicación de herrajes ortopédicos, existen gran variedad de técnicas para este fin, así como diversidad en herrajes con efectividad cuestionable; el objetivo del herraje es estabilizar la falange distal, reducir el dolor y estimular el crecimiento de casco nuevo. (Laskoski et al. 2016)

El uso de células troncales en la medicina veterinaria está comenzando; la aplicación de CTM derivadas de médula ósea para problemas musculoesqueléticos (tendinitis, Osteoartritis, OCD, etc.) está descrito en la actualidad para diversas especies y de manera importante en el equino, sin embargo, la eficacia y diversos ángulos en su uso como terapia sigue bajo investigación. La optimización de éste tipo de terapia está enfocado en el origen, aislamiento y procesamiento, así como la vía de administración, formulación y dosis terapéuticas. La perfusión regional endovenosa de CTM es utilizada actualmente por algunos investigadores y clínicos para el tratamiento de laminitis empleando la vena digital lateral. Debe destacarse que existen pocos o nulos datos publicados que evalúen la efectividad de éste tipo troncal como tratamiento en laminitis, técnica de administración, tipo celular, número de células administradas, etc. (Schnabel et al. 2013) En 2014, Morrison y cols., administraron CTM alogénicas derivadas de cordón umbilical en caballos con laminitis crónica, administraron 20-30 millones de células vía perfusión regional intraarterial y endovenosa (a. y v. digital palmar); aquellos caballos que recibieron el tratamiento dentro de los primeros 30 días posteriores a la presentación aguda obtuvieron un 100% de éxito y por último reportaron que en los casos con más de 90 días de laminitis, solo obtuvieron un 50% de éxito. (Morrison et al. 2014) Angelone y cols. (2017), dieron a conocer los resultados de su investigación, en ella trataron caballos con laminitis crónica usando CTM derivadas de tejido adiposo en combinación con plasma rico en plaquetas (PRP), cada animal fue tratado bajo tres administraciones en intervalos de un mes, de 15 millones de CTM; obtuvieron como resultado que sus pacientes mostraron mejoría clínica y la mayoría de ellos regresaron a su actividad, en las venografías se mostró recuperación de la vascularización acorde con la mejoría en la función motora, atribuible a la terapia celular. Señalaron que no observaron efectos adversos a causa de la terapia alogénica. (Angelone et al. 2017)

La distribución de receptores purinérgicos fue llevada a cabo por Zamboulis y cols. (2013) en distintos tejidos de caballos, al ser de gran interés por su relevancia en la transmisión de señales dolorosas, como lo es laminitis. Encontraron que los subtipos 1, 2 y 7 fueron evidentes en células de músculo liso de pruebas inmunohistoquímicas en arteria y vena digital palmar; el subtipo 3 se encontró en células de músculo liso de arteria únicamente. El subtipo 1 fue el más predominante en el tejido vascular. Las células endoteliales expresaron los subtipos 2 y 3. (D. E. Zamboulis et al. 2013; D. Zamboulis et al. 2013) En cuanto a las células epidérmicas basales de las láminas del casco, están fueron positivas a los subtipos 1, 2, 3 y 7.(D. E. Zamboulis et al. 2013; D. Zamboulis et al. 2013) El subtipo 7 se expresó únicamente y fuertemente en las células de Schwann (neurolemocitos). (D. Zamboulis et al. 2013) En otro estudio realizado por Zamboulis (2013) en caballos con laminitis, encontraron mayor expresión de P2X7 en células epidérmicas parcialmente queratinizadas y en

proliferación, éstas se encontraban adyacentes al axis queratinizado de la LEP, en caballos sanos no se observó.

Los receptores P2X en la muscular lisa de vasos sanguíneos han sido relacionados con una función vasoconstrictora; el subtipo 7, de manera particular, tiene un papel importante en la regulación local de la circulación sanguínea en diversos tejidos, incluyendo arterias coronarias y cerebrales, mesenterio hepático, vasos sanguíneos de placenta y umbilicales. Se sugiere que los subtipos encontrados en piel tienen una función importante como sensores de estímulos externos; los receptores P2X7, son reconocidos por estar involucrados en la apoptosis inducida por ATP y se cree que es muy probable su participación en los procesos de diferenciación de los queratinocitos a su última etapa (terminal). La presencia de estos receptores en las células epidérmicas del casco sugiere una relación de éstos con el crecimiento y diferenciación celular. Por otra parte el receptor P2X7 se relaciona a la inmuno modulación local de la función axonal de las células de Schwann, lo realiza regulando la liberación de citocinas, esto toma particular importancia en lesiones nerviosas periféricas o neuropatías. (D. Zamboulis et al. 2013)

HIPÓTESIS

Las células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, administradas en los caballos que sufren de laminitis crónica, por medio de perfusión regional endovenosa, son capaces de controlar inflamación y regenerar el tejido lamelar en estos caballos, resultando en una mejoría clínica.

Los receptores purinérgicos P2X subtipo 7 se expresan en las biopsias de tejido lamelar de caballos con laminitis crónica y no así en tejido lamelar sano. Por lo que la terapia con CTM resultaría en la disminución de su expresión.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso terapéutico de células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea para controlar la inflamación y regenerar el tejido lamelar lesionado en caballos con laminitis crónica.

Demostrar la presencia de receptores purinérgicos P2X subtipo 7 en tejido de caballos con laminitis crónica y su probable función como indicador de éxito en la terapia celular en laminitis para este estudio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener Células Troncales Mesenquimales de médula ósea equina, y demostrar su naturaleza troncal mesenquimal.
- Correlacionar los cambios vistos en las termografías con el avance clínico y por ende con la terapia celular.
- Correlacionar los cambios vistos en las venografías con el avance clínico y por ende con la terapia celular.
- Correlacionar los cambios histopatológicos de las biopsias lamelares de los pacientes con la terapia celular y mejoría clínica.
- Demostrar la presencia de los receptores purinérgicos P2X subtipo 7 en las muestras lamelares con laminitis crónica.
- Correlacionar los cambios en la expresión de los receptores purinérgicos P2X subtipo 7 con la terapia celular al finalizar el estudio.
- Correlacionar los cambios clínicos (mejoría clínica) en los pacientes con laminitis, con el tratamiento de células troncales mesenquimales.

METODOLOGÍA.

Obtención, Aislamiento y Cultivo de Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea Equina

Las células troncales mesenquimales (CTM) fueron extraídas de aspirados de médula ósea de caballos con un rango de edad entre 3 y 8 años, clínicamente sanos, sin cirugías o patologías infecciosas recientes, descartando Anemia Infecciosa Equina utilizando el Equine Infectious Anemia Antibody Test Kit (ViraCHEK®/EIA, Laboratory Pack. San Diego, California. USA). El procedimiento de biopsia fue realizado en las instalaciones de DITEQ, Hipódromo de las Américas, México. Los donadores fueron sedados previamente con xilacina (1.1 mg/kg IV), se rasuró el área del esternón para posteriormente realizar antisepsia con yodo povidona y alcohol; con ayuda de una aguja hipodérmica de calibre 25G se administraron entre 2-3 ml de lidocaína al 2% subcutáneos, justo en la zona de punción en el esternón localizando la cuarta o quinta esternebra palpable, guiado por ultrasonido, con una navaja de bisturí del número 15 se creó una incisión vertical de 0.5cm atravesando piel y músculo. Una aguja de aspirado de médula ósea Rosenthal (Kendall, Texas USA) se insertó justo en el sitio de incisión, con una jeringa conteniendo heparina de sodio a una concentración de 2000 UI/ml, se extrajo la muestra de médula ósea para ser transportada dentro de las cuatro horas posteriores al laboratorio de la Unidad de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), en condiciones de refrigeración para su caracterización y expansión in vitro.

Las muestras fueron procesadas en una campana de flujo laminar vertical (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA), la muestra se colocó en tubos de poliestireno de 50ml (Falcon, Becton Dickinson, USA) y se creó una dilución con solución salina fosfatada buferada PBS (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) a concentración 1:1. Posteriormente se adicionó Ficoll Paque™ (Amersham Bioscience, Picataway, NJ) en una relación 1:3 para separar el paquete de células mononucleares, las muestras son centrifugadas a 300Xg durante 30 minutos; las células fueron separadas y lavadas con PBS para ser resuspendidas en medio de cultivo DMEM F12 (Invitrogen Co. Gibco®, NY, EUA) adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco®, USA) y antibióticos/antimicóticos al 1% (penicilina 10,000 UI, estreptomycin 10,000 µg y anfotericina B/Nistatina 25 µg). Inicialmente son sembradas en cajas de cultivo T25 de poliestireno (Becton Dickinson) hasta confluencia celular, los siguientes pases celulares en cajas T75 o T150, por un lapso de cuatro semanas en incubación a 37°C y mantenidas bajo una atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada tercer día hasta obtener una población de 30-40X10⁶ células.

Las CTM son preparadas en alícuotas de dosificación conteniendo 30X10⁶ células y preservadas en tubos de polipropileno de 2ml (Criovial, Corning®, NY. USA) bajo condiciones de congelación a -195°C en el INR.

Citometría de Flujo

Se tomó una porción de la muestra celular ya separada del Ficoll y lavada con PBS 1X pH 7.4, aproximadamente 25X10⁴ células de médula ósea son colocadas en tubos Falcon con 10µL de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo; se emplearon anticuerpos contra marcadores de humano debido a que no hay en el mercado específicos contra caballo. Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores troncales y hematopoyéticos, anti CD34-PE (Beckton Dickinson), CD45-APC (Beckton Dickinson), CD14-FITC, CD90-PE (BD, Pharmigen™), CD 105-FITC (BD, Pharmigen™) y CD73-PE, (BD, Pharmigen™). Los controles negativos se realizaron empleando los anticuerpos isotipo κ IgG1-FITC contra ratón (BD, Bioscience), isotipo κ IgG1-PE contra ratón (BD, Bioscience) e isotipo κ IgG1-APC contra ratón (BD, Bioscience). La incubación fue llevada a cabo durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Los datos fueron analizados por el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson, USA) con una media de 75,000 eventos y una emisión de láser de 88nm. La emisión de fluoresceína FITC se midió en FL1, PE en FL2, APC en FL3 y 7AAD en FL4.

Selección Pacientes en Tratamiento

Seleccionamos 9 equinos con laminitis crónica, (laminitis mayor a 72 horas de inicio o con evidencia de rotación dorso ventral de falange distal por estudios radiográficos) todos fueron evaluados y tratados en su lugar de origen. (Ver Anexo 1)

Se realizó un examen físico general, examen de aparato locomotor completo (estática y dinámica), incluyendo clasificación de claudicación (Grado de Obel) con registro fotográfico y en video, intensidad del pulso digital, temperatura de los cascos, evaluación de banda coronaria buscando edema o áreas de depresión, forma de la suela del casco, concavidad o protrusión, tamaño y conformación del pie. Los equinos debían estar fuera de cualquier tratamiento para laminitis, la enfermedad primaria debía estar apropiadamente controlada y no presentar evidencias de desprendimiento de casco o absceso subcórneo. La recomendación a los propietarios fue colocar un herraje ortopédico por un herrador especialista.

Estudios Venográficos y Termográficos

Las venografías fueron tomadas utilizando un equipo radiográfico digital convencional de la región del casco de ambos miembros torácicos en el día 0 (antes del tratamiento) y 6° mes, utilizando la toma dorso-palmar, latero-medial y latero-medial en flexión (Britta 2016). El caballo fue sedado con xilacina (1.1 mg/kg IV) y el bloqueo perineural abaxial se realizó con lidocaína sin epinefrina al 2% administrando 4 ml medial y lateral. La región de la cuartilla fue rasurada y la antisepsia se efectuó con clorhexidina y alcohol. La administración de 15 ml del medio de contraste Scanlux® (Sanochemia Pharmazeutika AG, Alemania) se efectuó en la vena digital palmar lateral o medial, próxima a la corona del casco, usando un catéter mariposa calibre 25G. Un torniquete con venda Smarch (Bantex, México) fue colocado en el menudillo del miembro torácico antes de la administración del medio de contraste.

Las termografías se llevaron a cabo utilizando el termógrafo (FLIR Systems, E40, USA) en ambos miembros torácicos, la primera medición es realizada antes de iniciar con el tratamiento a base de CTM, el estudio se repitió mensualmente hasta concluir en el sexto mes posterior al tratamiento, llevando el registro mensual de los cambios en la temperatura del casco, con enfoque en la banda coronaria, procurando una distancia de 30cm entre el aparato y el miembro del caballo. Se solicitó que antes de realizar la termografía, el caballo se mantuviera en su caballeriza, sin haber realizado algún tipo de ejercicio o estar bajo el sol de manera directa.

Obtención de Biopsias De Tejido Lamelar Equino

Adquirimos biopsias de tejido lamelar (protocolo modificado Ranera B., 2011) para ser examinadas por medio de microscopía, antes de administrar las CTM y al finalizar el sexto mes de evaluación. Estas se practicaron en uno de los miembros torácicos afectados, la selección del miembro tuvo como criterios el examen locomotor, los cambios conformacionales del casco, los resultados de la termografía y del estudio venográfico.

El casco seleccionado para biopsia fue lavado con jabón y agua corriente para eliminar los residuos de suciedad; el caballo fue sedado con xilacina (1.1 mg/kg IV) y el bloqueo perineural abaxial se realizó con lidocaína al 2% administrando 4 ml mediales y laterales. La antisepsia se practicó con clorhexidina y alcohol. Utilizando un mototool (Dremel 3000, México) con fresa de óxido de aluminio (3.1mm, Dremel) y fresa para grabado (3/32 pulgadas 2.4mm, Dremel) se perforó el casco hasta alcanzar la línea blanca y el tejido epidérmico más blando. Una navaja número 11 o 15 fue requerida para realizar cortes en la periferia de la zona de biopsia para después extraer la epidermis-dermis completamente con un *scaler* dental de punta diamante. Las muestras fueron lavadas con solución salina fisiológica para retirar los remanentes de sangre, la biopsia se colocó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas para después ser inmersa en solución sacarosa al 15% y posteriormente 30%; fueron llevadas para su procesamiento al Laboratorio De Fisiología Celular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Ciudad Universitaria, UNAM.

Evaluación Histológica del Tejido Lamelar

Las biopsias fueron cubiertas por Tissue-Tek (Neg-50, Richard-Allan Scientific™) y congeladas en hielo seco para su corte en el criotomo (Slee Medical MNT, Alemania) a -25°C con un grosor y avance de 30µm. Los cortes fueron colocados en laminillas preparadas con grenetina y sulfato de cobre; se les conservó en refrigeración a -4°C hasta su procesamiento inmunohistoquímico.

Las laminillas seleccionadas se colocaron en PBS 1X pH 7.4 durante 5 minutos para rehidratar el tejido y posteriormente inmersas en el colorante Violeta de Cresilo, seguido de un tren de etanol (70%, 96% y 100%), preservadas con xilol y Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific). La visualización para la evaluación y clasificación histológica se practicó en el microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU), Software Stereo Investigator® (MBF Bioscience, USA).

Pruebas Inmunohistoquímicas en Tejido Lamelar (Detección de P2X7)

El estudio inmunohistoquímico (metodología modificada, Zamboulis 2013) en biopsias de tejido lamelar se efectuó para observar la expresión de receptores purinérgicos P2X subtipo 7.

La rehidratación del tejido se realizó en PBS 1X pH 7.4 tres veces, en intervalos de 15 minutos, a temperatura ambiente. Las laminillas fueron cubiertas con solución BLOXALL™ (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente, terminado este periodo, el BLOXALL™ fue retirado y las preparaciones lavadas con PBS 1X tres veces en intervalos de 5 minutos. Se adicionó la solución Immunoretriever (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA) y se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 60°C, seguido de lavados con PBS 1X en intervalos de 5 minutos para posteriormente adicionar la solución de bloqueo (PBS 1X; 10% suero de cabra, Vector Laboratories; 5% Tritón X-100 Sigma-Aldrich®) a las laminillas e incubar a 25°C por 30 minutos. Es retirada la solución de bloqueo para ser añadido el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-P2X subtipo 7 (APR-008, Alomone, Israel) en concentración 1:200, incubación a 25°C durante hora y media; seguido de tres lavados con PBS 1X. El anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Anti Rabbit Biotin AP182B, Millipore®, México) fue agregado a cada preparación en una concentración 1:200 durante 1 hora a 25°C, seguido de tres lavados con PBS 1X. Se administró la solución Avidina+Biotina (Avidin/Biotin blocking kit, VECTASTAIN, Vector Laboratories) durante 1 hora a 25°C para finalmente revelar con diaminobencidina (DAB substrate kit, Vector Laboratories). El control negativo fue el tejido de un caballo sin laminitis y el segundo control negativo se realizó en un tejido de caballo con laminitis, con omisión del anticuerpo primario. La contra tinción se realizó con Violeta de Cresilo.

Administración de Células Troncales Mésenquimales

Los pacientes fueron asignados a dos grupos de manera aleatoria: Grupo 1 (tratamiento único) y Grupo 2 (tres tratamientos). Caballos pertenecientes al grupo dos, recibieron tres administraciones de CTM alogénicas en intervalos de un mes. Por el contrario, los pertenecientes al grupo uno, recibieron una dosis de CTM. La administración del tratamiento fue al menos tres a cinco días posteriores a la extracción del tejido lamelar.

Se administraron 30 millones de células troncales suspendidas en medio de transporte y solución salina fisiológica aforada a 15ml, por medio de perfusión endovenosa, colocando un catéter mariposa calibre 25G en la vena digital palmar en la región de la cuartilla, próxima a la banda coronaria. Previamente, se colocó la presión del torniquete en la región del menudillo con venda Smarch Smarch (Bantex, México), la sedación se practicó con xilacina (1.1 mg/kg IV) y el bloqueo perineural abaxial se realizó con lidocaína sin epinefrina al 2% administrando 4 ml mediales y laterales. La región de la cuartilla fue rasurada y la antisepsia se efectuó con clorhexidina y alcohol. El torniquete permaneció 20 minutos después de la infusión de las CTM. El paciente fue valorado clínicamente mensualmente.

Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de las variables consideradas (Termografías, Grados Obel, Clasificación Histológica y Grados de expresión inmunohistoquímica), el software GraphPad Prism 7[®] fue el programa de elección. La evaluación del estudio termográfico requirió una prueba ANOVA Sidak con un nivel de confianza del 95%; se obtuvieron medias aritméticas de la temperatura del dorso y lateral del casco en ambos miembros torácicos, obteniendo finalmente la media de temperatura del caballo antes del tratamiento (temperatura basal) y la media de su temperatura después de seis meses, se analizaron a todos los pacientes y por grupo de tratamiento. El análisis estadístico de la clasificación Obel, se realizó con la prueba T student prueba pareada y ANOVA Sidak con nivel de confianza de 95%, para conocer si existe una diferencia en el Obel asignado inicialmente contra el Obel al final del tratamiento para todos los caballos tratados y por grupos de tratamiento. Los datos de clasificación histológica antes y después del tratamiento se analizaron con una prueba T student pareada y ANOVA Sidak, nivel de confianza del 95%; el grado asignado se basó en la clasificación modificada de Pollitt (1996) y Paes Leme (2010) encontrada en el Anexo 3 de este trabajo, se realizaron las pruebas por grupos y con la exclusión de dos caballos debido a cambios degenerativos en las biopsias finales. Las pruebas T student pareada y ANOVA Sidak se llevaron a cabo en la evaluación de la expresión los receptores purinérgicos antes y después del tratamiento en todos los caballos, con un nivel de confianza del 95%; los tejidos lamelares sometidos a prueba inmunohistoquímica fueron evaluados de forma semicuantitativa, se les asignó un “grado de expresión” en relación al porcentaje de tejido con expresión de P2X7 al observarse en cinco campos del tejido de manera aleatoria bajo el microscopio, se realizaron las pruebas por grupos y con la exclusión de dos caballos debido a cambios degenerativos en las biopsias finales. Las pruebas de clasificación histológica e inmunohistoquímica no pudieron realizarse en dos caballos (C4 y C8) de manera completa al faltar la biopsia lamelar final. La correlación existente entre la expresión de receptores P2X-7 en tejido lamelar y la clasificación o daño histológico antes y después del tratamiento con CTM, requirió la prueba de Correlación de Pearson con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Identificación de Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea por Citometría de Flujo.

La Citometría de Flujo fue llevada a cabo en las células en cultivo en el cuarto pase celular para identificar el inmunofenotipo de las poblaciones celulares listas para su administración como terapia celular. Se analizaron 6 marcadores de superficie, tres de ellos reconocidos como marcadores de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea en equinos: CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), CD90 (Thy-1) y CD105 (endoglina); y tres marcadores indicadores de un fenotipo celular hematopoyético: CD14, CD34 y CD45. Los porcentajes de expresión de los marcadores analizados se encuentran en la Fig.7, contiene los resultados en muestras de médula ósea de equinos seleccionados como donadores hallando que el fenotipo de las poblaciones celulares analizadas presentan marcadores indicadores de un estado no diferenciado, el marcador CD90 presentó mayor porcentaje con una media de $33.82\% \pm 5.473e.s.$ de expresión en las poblaciones analizadas; así mismo, se obtuvo una expresión baja a marcadores de linaje hematopoyético, CD14 presentó una media de $1.23\% \pm 0.7674e.s.$, CD34 $1.443\% \pm 0.7159e.s.$, finalmente CD45 $1.217\% \pm 0.6649e.s.$ A pesar de no contar con mayor porcentaje de expresión en los marcadores CD73 y CD 105, estos se encontraron presentes en el análisis por citometría. Los anticuerpos monoclonales de IgG usados como control, no mostraron inmunoreactividad.

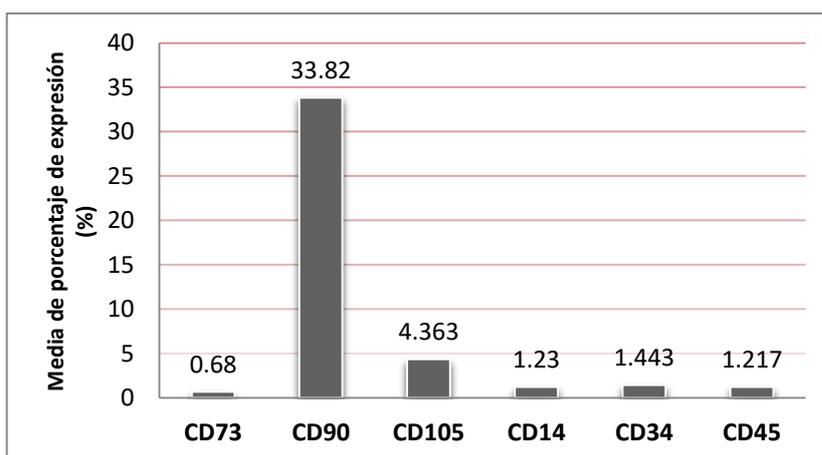


Fig. 7 Gráfica representando la media de los porcentajes de expresión del inmunofenotipo de las poblaciones celulares analizadas, pertenecientes a médula ósea de equino, resultados obtenidos de células en el cuarto pase celular.

Estudios Venográficos

Las radiografías tomadas a los pacientes en estudio previo a la terapia celular, mostraron evidencias de rotación dorso palmar de la falange distal en diferentes grados, líneas de aire en la muralla del casco, algunos pacientes presentaron evidencias de osteolisis en el extremo distal de falange distal, claras evidencias de laminitis crónica. El estudio angiográfico con medio de contraste realizado previamente a la terapia celular en cada uno de los pacientes, mostró deficiencias en el llenado del plexo coronario, plexo sublamelar, en las papilas terminales, circunfleja y en el plexo palmar; ésta deficiencia puede verse en mayor o menor medida en cada uno de los pacientes, pero el llenado incompleto del plexo coronario y sublamelar fue una constante en los pacientes.

La venografía realizada al sexto mes de evaluación post-tratamiento mostró mejoría en el llenado venoso de los plexos inicialmente afectados en ambos grupos de tratamiento, siendo claramente perceptibles en el estudio radiográfico; otros plexos y ramas venosas aparentan mayor calibre comparado con el estudio inicial, especialmente en el plexo coronario, circunfleja y plexo

palmar. Existió una disminución en la presencia de las líneas de aire en la muralla vistas inicialmente. No existió un retroceso en cuanto a la rotación dorso palmar de la falange distal, ésta permaneció o continuó, esto último mayormente ocurrió en aquellos casos en los que no se dio seguimiento oportuno con un herrador ortopedista. En los pacientes con evidencias de osteolisis previas, no se revelaron evidencias de que su proceso osteolítico continuara, aunado a la aparente mejoría en la irrigación de la región distal del casco.

En las figuras 8 a 10, se muestran las evidencias fotográficas de los estudios angiográficos, en éstas se puede constatar lo anteriormente descrito, de manera adicional se colocó la imagen del casco antes y después del tratamiento concerniente al miembro en cuestión, en estas imágenes se evidencia el cambio en la estructura externa del casco, reduciendo la cantidad de grietas y ceños en la muralla.



Fig. 8 Caballo 3, integrante del grupo de un solo tratamiento. Arriba se muestran el estudio venográfico inicial, en las tomas dorso palmar, latero-medial y latero-medial en flexión de manera secuencial. Abajo se muestra el estudio realizado al término del estudio. Puede observarse un aumento en el calibre de los plexos venosos proximales y plexo palmar, así como mayor cantidad de ramas en el plexo sublamelar (flechas).

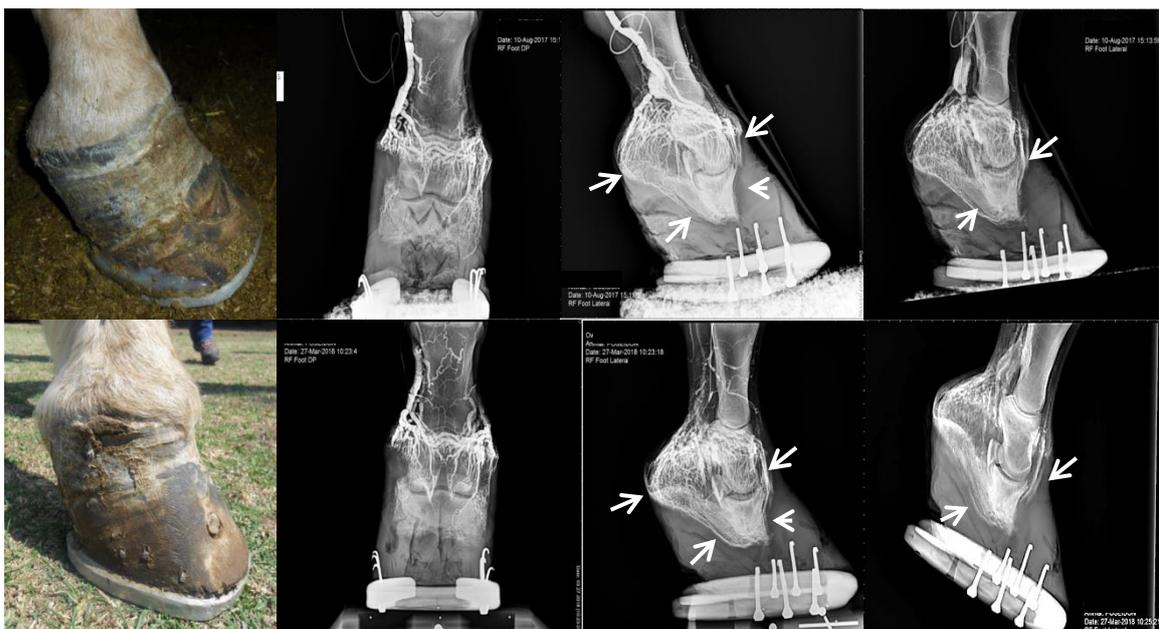


Fig. 9 Caballo 6, integrante del grupo de tres tratamientos. Arriba se muestran el estudio venográfico inicial, en las tomas dorso palmar, latero-medial y latero-medial en flexión de manera secuencial de izquierda a derecha. Abajo se muestra el estudio realizado seis meses posteriores del primer tratamiento. Puede observarse un aumento en el tamaño de los vasos sanguíneos y se tornan más evidentes los plexos de la corona, sublamelares, circunfleja y plexo palmar (flechas). El proceso osteolítico de la falange distal mostrado en el estudio inicial no es evidente en el estudio a los seis meses, tal como se muestra en las imágenes.

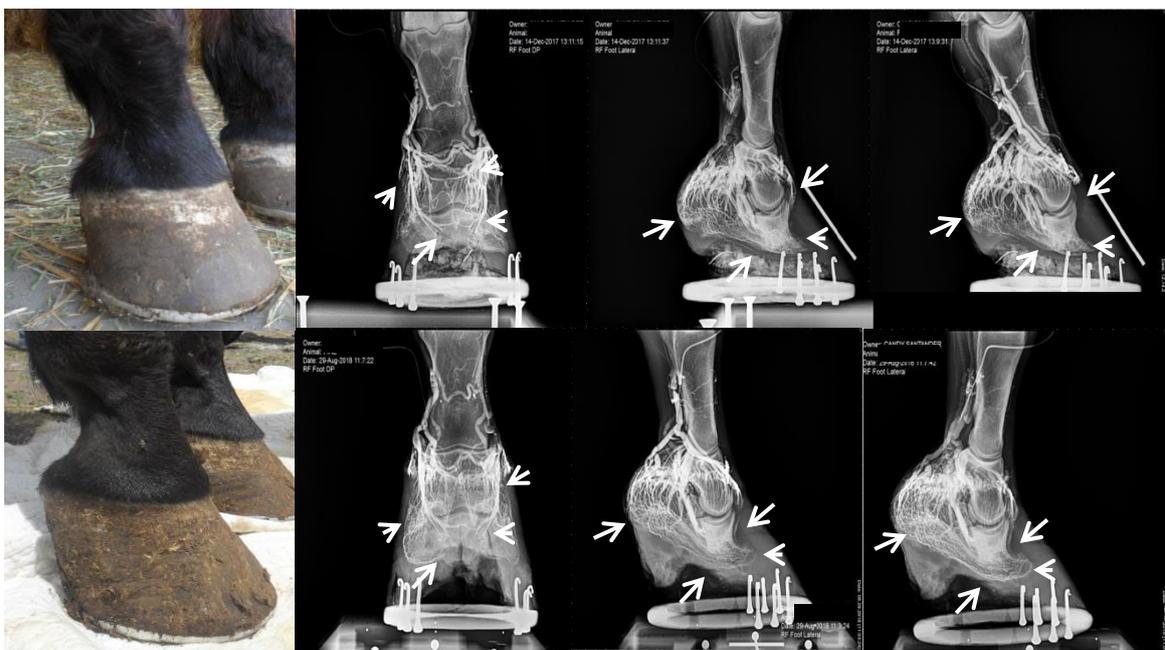
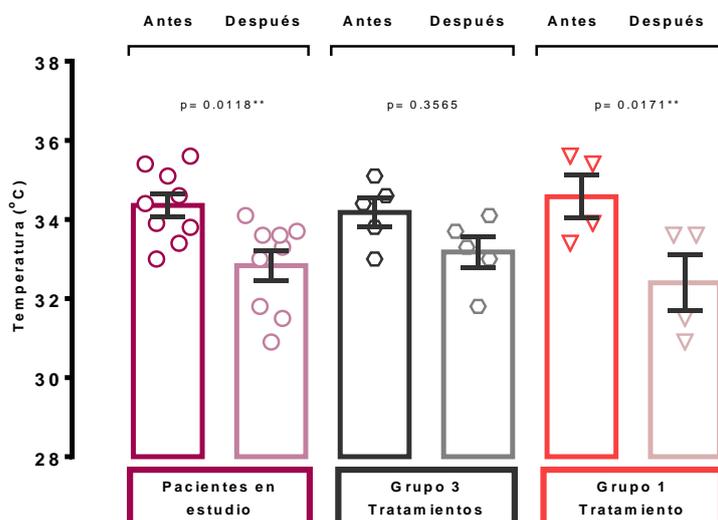


Fig. 10 Caballo 9, integrante del grupo de tres tratamientos. Arriba se muestran el estudio venográfico inicial, en las tomas dorso palmar, latero-medial y latero-medial en flexión de manera secuencial de izquierda a derecha. Abajo se muestra el estudio realizado al término del estudio. Puede observarse de manera notoria los plexos de la corona, sublamelares, circunfleja y plexo palmar (flechas) al terminar el estudio.

Estudio Termográfico del Casco Equino

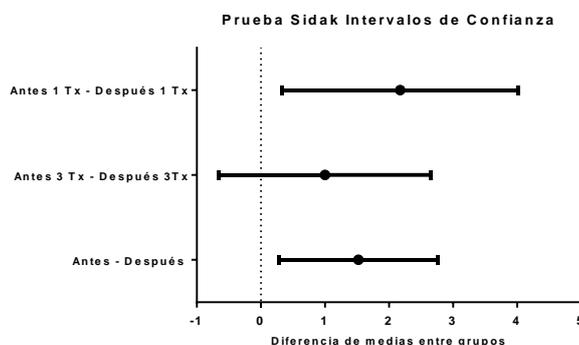
En el cuadro siguiente está contenida la información resultante de las termografías de los caballos en el estudio. Se muestra un aparente descenso en la temperatura en la zona de la corona del casco, con excepción del caballo 1 y 3, los cuales parecen mantener su temperatura en el rango basal.

Tratamientos	3	3	1	1	3	3	1	1	3
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
ANTES	33	34,4	33,4	35,6	34,6	33,8	35,4	33,9	35,1
DESPUÉS	33,3	31,8	33,6	31,5	34,1	33	33,6	30,9	33,7
Salida del proyecto				5° MES				2° MES	



Gráfica 1. ANOVA termografías (χ^2 y SEM) mostrando los resultados en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

La Gráfica 1 muestra los resultados la prueba ANOVA para el análisis por grupos. El primero está conformado por todos los caballos tratados, antes y después de la administración de las células troncales, como puede observarse existe una disminución en la temperatura de la corona estadísticamente significativa ($p= 0.0118$) después de la administración del tratamiento independientemente de la cantidad de dosificaciones suministradas. El grupo de un solo tratamiento presenta una disminución en la temperatura posterior al tratamiento ($p=0.0171$), en contraste con el grupo de tres dosificaciones en el cual la disminución de la temperatura no es estadísticamente significativa.



Gráfica 2. ANOVA Sidak de termografías, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

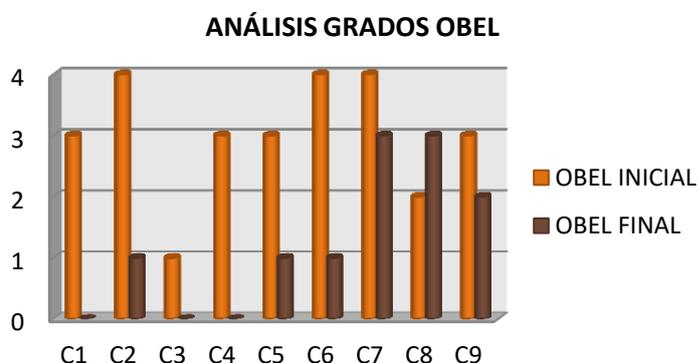
En la Gráfica 2 se representan los intervalos de confianza para los tres grupos, evidenciando que el grupo de tres tratamientos no muestra un cambio significativo en la temperatura comparado con el grupo de una sola dosificación.

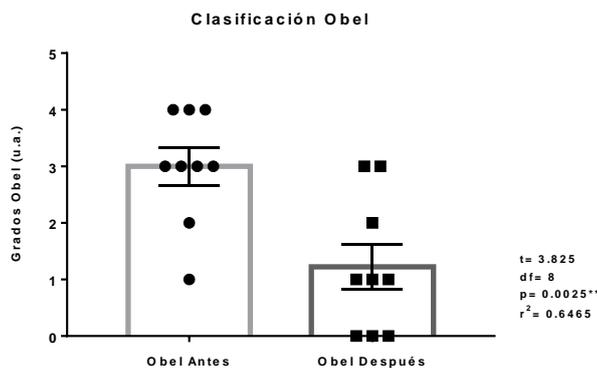
Evaluación de la Clasificación Obel Previo y Posterior a la Terapia Celular.

En el cuadro inferior se muestran los datos recabados de los pacientes, tomando el valor de Obel inicial y el final en el sexto mes de evaluación. La tabla muestra un evidente descenso en el grado Obel de todos los pacientes, exceptuando al caballo 8 ya que este presentó en su segundo mes de evaluación un absceso subcórneo.

CABALLO	TX	OBEL INICIAL	OBEL FINAL	
C1	3	3	0	
C2	3	4	1	
C3	1	1	0	
C4	1	3	0	*5 MES ESTUDIO
C5	3	3	1	
C6	3	4	1	
C7	1	4	3	
C8	1	2	3	*2 MES ESTUDIO
C9	3	3	2	

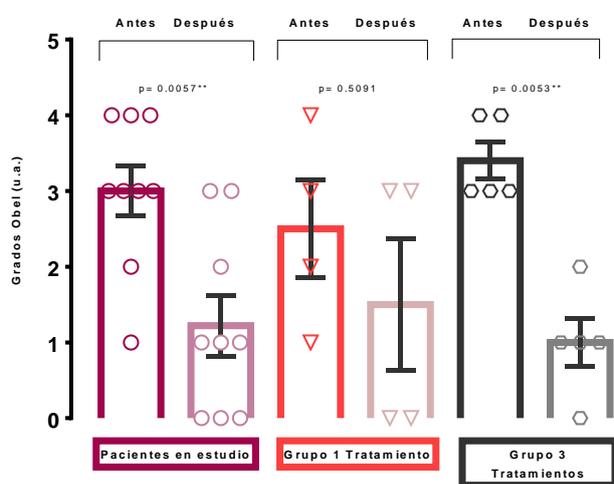
* Indica el mes en el que el caballo salió del protocolo.
TX: Tratamientos administrados



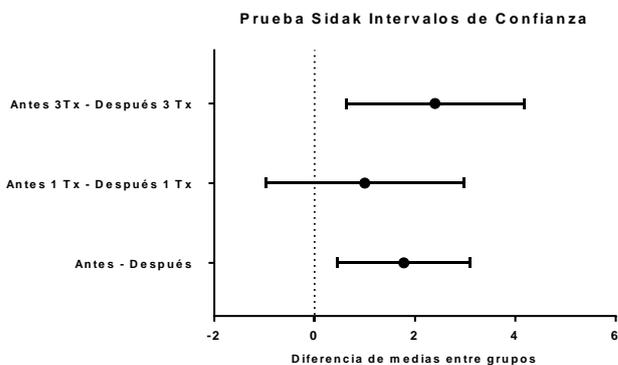


Gráfica 3. Prueba T student pareada (χ y SEM). Clasificación Obel. $\alpha=0.05$

La Gráfica 3 representa los resultados de la prueba T, demuestra una diferencia significativa ($p=0.0025$) al disminuir los grados Obel después de la administración del tratamiento, sin importar el grupo de tratamiento asignado. Demostrando y respaldando la mejoría clínica vista en los pacientes.



Gráfica 4. ANOVA Grados Obel (χ y SEM) mostrando los resultados en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$



Gráfica 5. ANOVA Sidak de Grados Obel, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

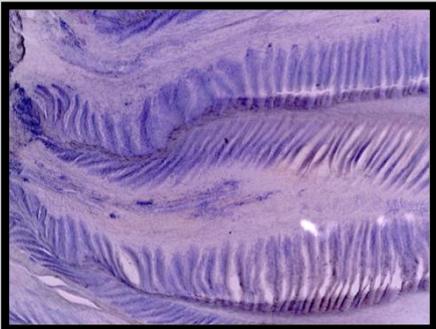
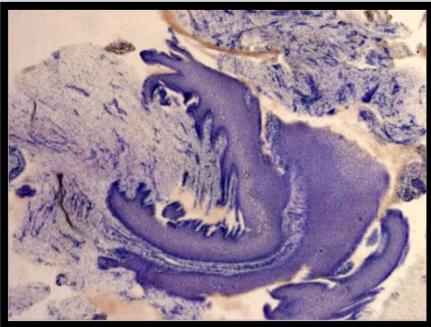
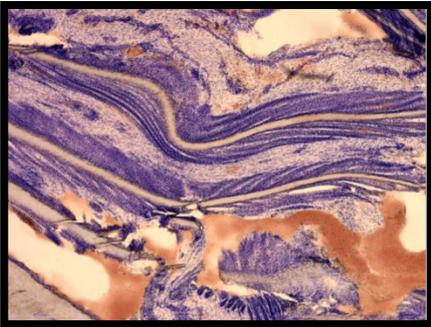
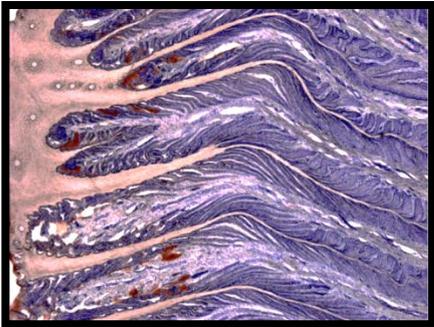
Los resultados de la prueba ANOVA se ven reflejados en las gráficas 4 y 5; el análisis de todos los caballos mostró una disminución en el grado Obel de manera significativa ($p=0.0057$). El grupo de caballos que recibió tres dosificaciones de células troncales mostró una disminución significativa en el grado Obel ($p=0.0053$) comparado con el grupo de un tratamiento, tres dosificaciones resultaron en una mejoría clínica más evidente comparado con el grupo de un solo tratamiento. La Gráfica 5 presenta los intervalos de confianza señalando lo anteriormente descrito.

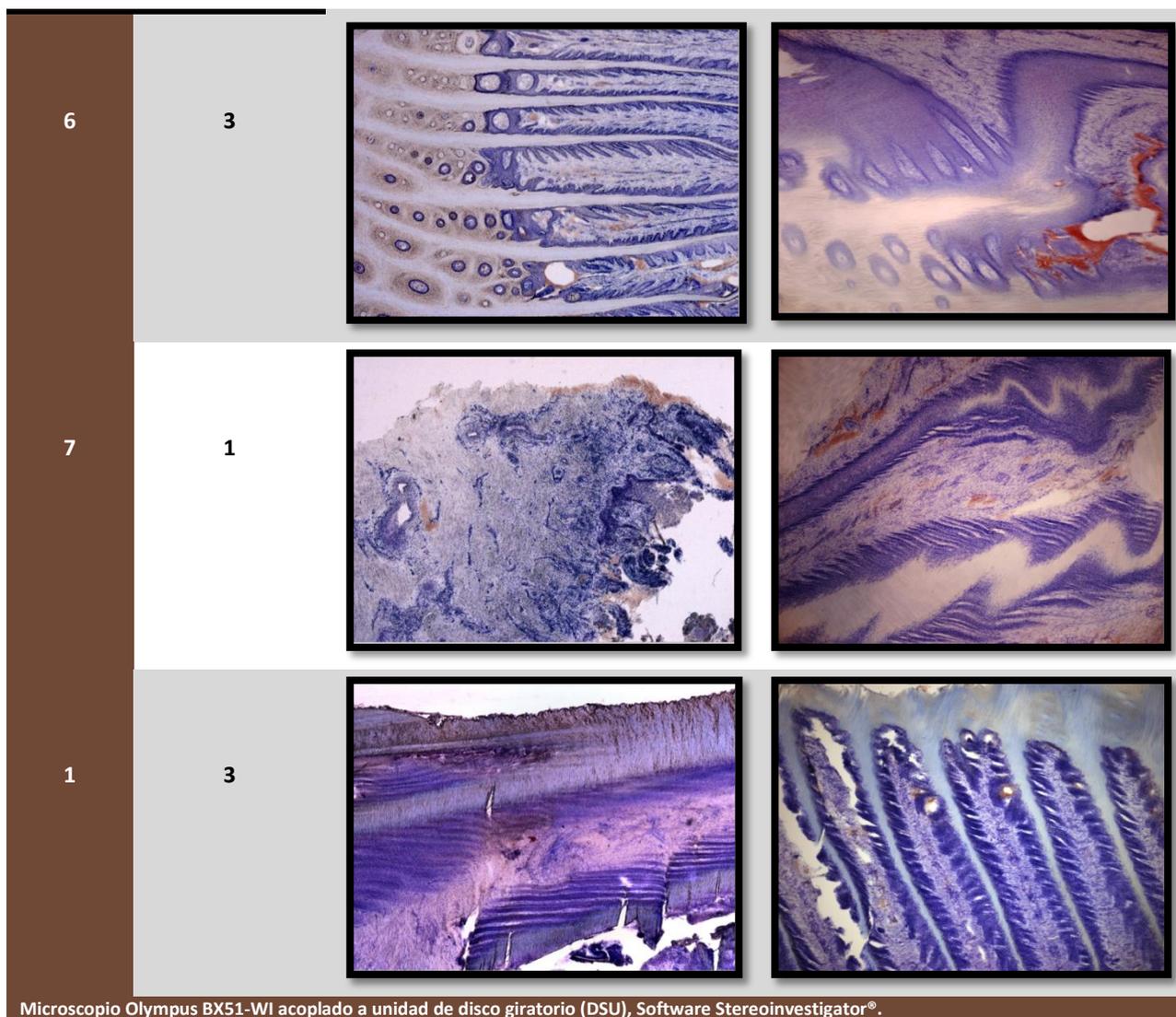
Evaluación Histológica del Tejido Lamelar

Obtuvimos biopsias de tejido lamelar en un caballo sin laminitis y en 9 caballos con laminitis crónica, éstas se extrajeron previamente a la terapia celular y nuevamente a los seis meses de su administración con la finalidad de observar los cambios histológicos atribuibles a la terapia celular. El tejido lamelar obtenido después del tratamiento en los caballos con laminitis crónica mostrados en el cuadro a continuación, muestran cambio estructural sustancial comparado con la estructura histológica previa al tratamiento, la arquitectura se torna similar a la de un caballo sin laminitis como lo muestra la histología del caballo control, mejorando la presencia, cantidad y orientación de las

láminas epidérmicas secundarias, se observa disminución de tejido con infiltrado perivascular, las células epidérmicas presentaban núcleo abaxial a la membrana basal y se encontró menos cantidad de láminas epidérmicas secundarias separadas de la membrana basal. El caballo 6, mostró un deterioro en el tejido lamelar, probablemente causado por un deficiente método de conservación, ya que estos hallazgos no concuerdan con la clasificación Obel del mismo caballo durante su última evaluación, así mismo el tejido obtenido en la biopsia se presentó estructurado y firme.

Microfotografías de cortes histológicos de caballos con laminitis crónica antes y después del tratamiento celular.

CABALLO CONTROL			
CABALLO	No. TRATAMIENTOS	ANTES DEL TRATAMIENTO Aumento 4X	DESPUÉS DEL TRATAMIENTO Aumento 4X
2	3		
3	1		

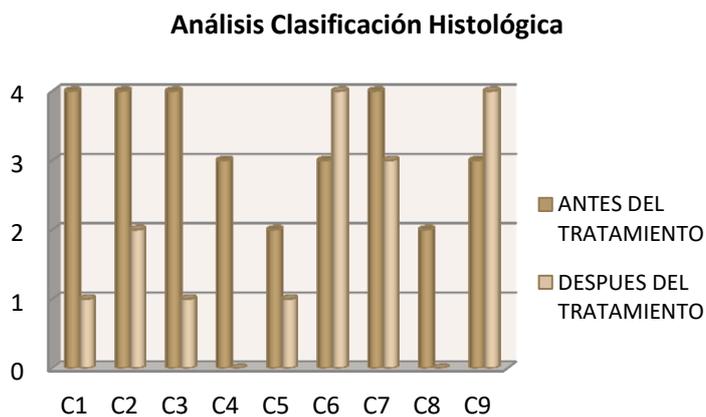


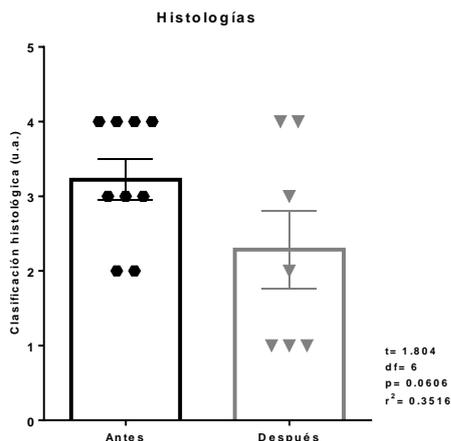
Microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU), Software Stereoinvestigator®.

En la tabla siguiente se muestra la asignación en la clasificación de la alteración histológica en biopsias lamelares de los caballos, previo y después del tratamiento. El grado asignado se basó en la clasificación modificada de Pollitt (1996) y Paes Leme (2010) encontrada en el Anexo 3 de este trabajo. Como puede notarse, existen dos caballos de los cuales no se obtuvo biopsia final comparativa de las láminas del casco. Así mismo, dos caballos pertenecientes al grupo de tres tratamientos (C6 y C9) mostraron progresión en el daño lamelar, aumentando su grado en la clasificación.

CABALLO	TX	ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUES DEL TRATAMIENTO
C1	3	4	1
C2	3	4	2
C3	1	4	1
C4	1	3	x
C5	3	2	1
C6	3	3	4
C7	1	4	3
C8	1	2	x
C9	3	3	4

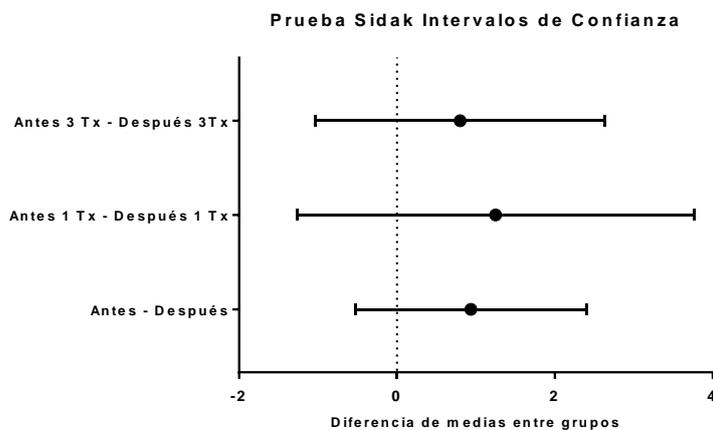
X: No pudo evaluarse el tejido lamelar
TX: Tratamientos administrados





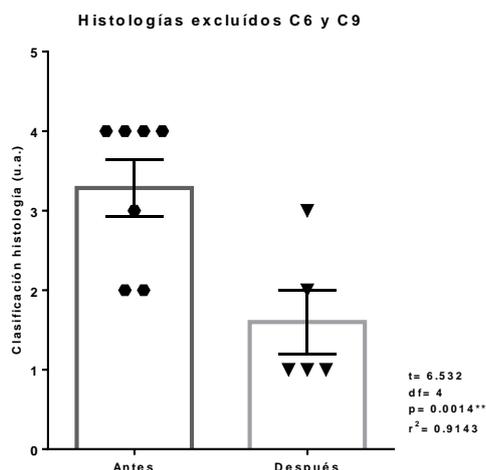
Gráfica 6. Prueba T student pareada (χ y SEM). Histologías $\alpha=0.05$

En la Gráfica 6 se observan los resultados de la prueba T en todos los caballos, mostrando una disminución en el grado asignado en la clasificación histológica, es decir, el tejido lamelar después del tratamiento muestra menos lesiones histológicas comparado con el tejido lamelar en fase de laminitis crónica sin tratamiento, pero esta mejoría no es estadísticamente significativa ($p=0.0606$).



Gráfica 7. ANOVA Sidak de Histologías, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

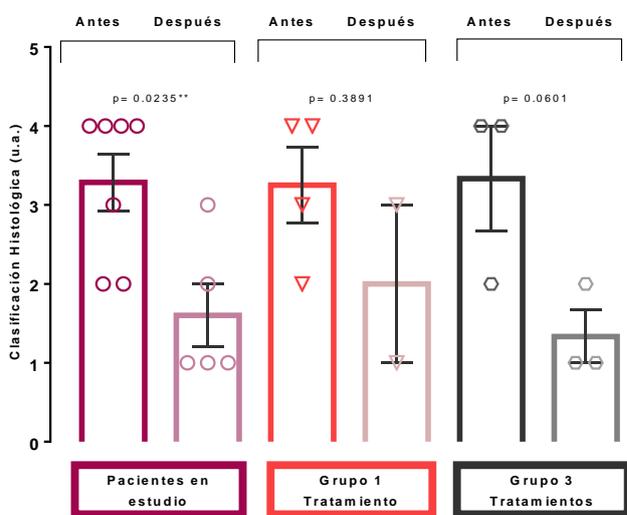
La Gráfica 7 representa los intervalos de confianza de la prueba ANOVA Sidak con un nivel de confianza del 95%, demostrando que no hay una diferencia entre el grupo de una sola dosificación y el grupo de tres tratamientos.



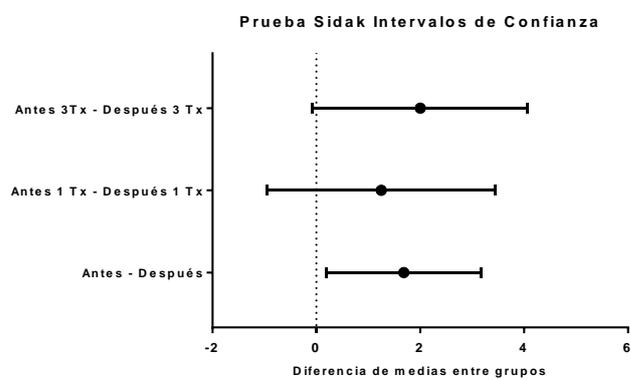
Gráfica 8. Prueba T student pareada. Histologías, excluyendo caballo 6 y 9. $\alpha=0.05$

La Gráfica 8 muestra los resultados de la prueba T excluyendo los resultados del caballo 6 y 9, ya que las biopsias finales podrían presentar cambios degenerativos debido a una inadecuada preservación de las muestras, se discutirá más adelante.

Los resultados muestran una diferencia estadística significativa ($p=0.0014$) entre la clasificación histológica previo al tratamiento contra la clasificación después del tratamiento. El tejido lamelar presentó un descenso en grado de daño histológico posterior al tratamiento celular.



Gráfica 9. ANOVA histologías excluyendo C6 y C9 (χ y SEM) mostrando los resultados en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$



Gráfica 10. ANOVA Sidak de histologías excluyendo C6 y C9, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

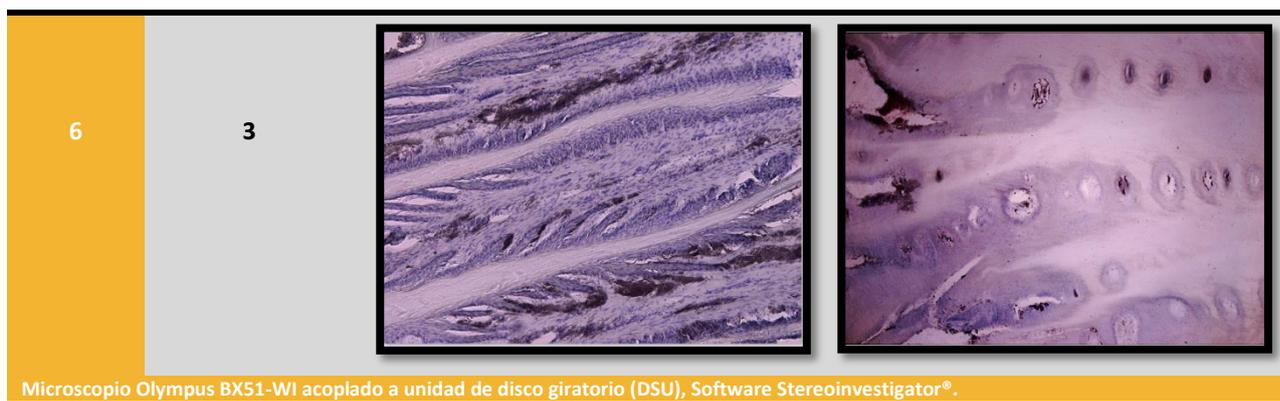
Los resultados de la prueba ANOVA se ven reflejados en las gráficas 9 y 10; el análisis de todos los caballos mostró una disminución en el grado de daño histológico reflejándose al bajar grados en su clasificación de manera significativa ($p= 0.0235$). No se encontraron pruebas estadísticas suficientes para decir que grupo de tratamiento fue mejor o que presentó una diferencia en la disminución en la clasificación histológica. La Gráfica 10 contiene los intervalos de confianza señalando lo anteriormente descrito.

Prueba Inmunohistoquímica (Detección de P2X7)

Las pruebas inmunohistoquímicas realizadas en las biopsias de tejido lamelar para identificar los receptores purinérgicos P2X7 mostraron que los tejidos de caballos con laminitis crónica revelaron la presencia de P2X7 en células epidérmicas adyacentes al axis de la lámina epidérmica primaria (LEP). En las microfotografías de los tejidos lamelares obtenidos después la terapia celular se muestra una disminución aparente en la expresión de receptores P2X7 comparado con el tejido lamelar antes del tratamiento. Los tejidos controles no manifestaron receptores P2X7.

Microfotografías Inmunohistoquímicas Receptores Purinérgicos P2X7 en tejido lamelar de caballos con laminitis crónica.

		Tejido Sin Anticuerpo 10X	Tejido Sin Laminitis 10X
CABALLOS CONTROL			
CABALLO	No. TRATAMIENTOS	ANTES DEL TRATAMIENTO 10X	DESPUÉS DEL TRATAMIENTO 10X
3	1		
2	3		



Microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU), Software Stereoinvestigator®.

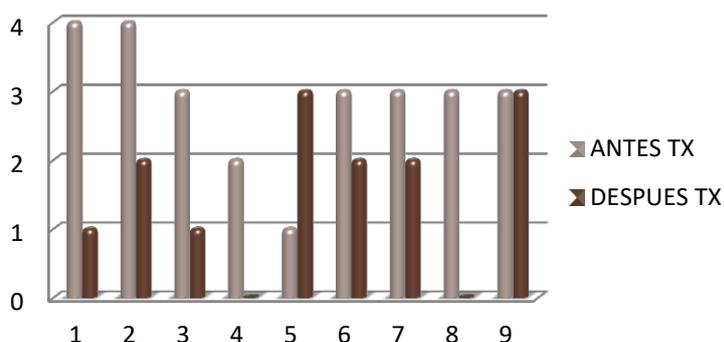
Los tejidos lamelares sometidos a prueba inmunohistoquímica, fueron evaluados de forma semicuantitativa. Estos mostraron una aparente disminución en la expresión de receptores purinérgicos basados en el grado de expresión en la tinción, como puede verse en la tabla y gráfica correspondiente; los caballos 5 y 9 mostraron un aumento en la expresión de estos receptores en la biopsia final.

Grado de Expresión	Porcentaje De Expresión En Tejido
0	0
1	≤5
2	15
3	20
4	≥25

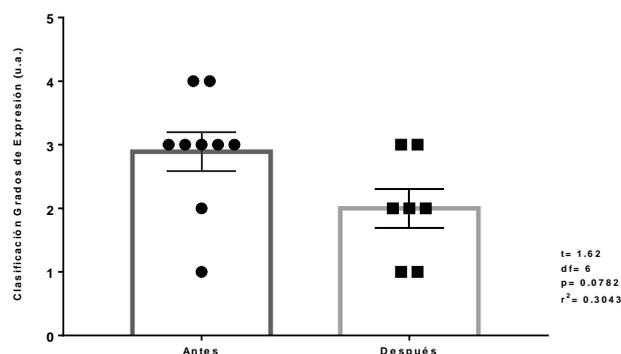
CABALLO	ANTES		DESPUES	
	TX	TRATAMIENTO	TRATAMIENTO	
C1	3	4	1	
C2	3	4	2	
C3	1	3	1	
C4	1	2	X	
C5	3	1	3	
C6	3	3	2	
C7	1	3	2	
C8	1	3	x	
C9	3	3	3	

X: No pudo evaluarse el tejido lamelar
TX: Tratamientos administrados

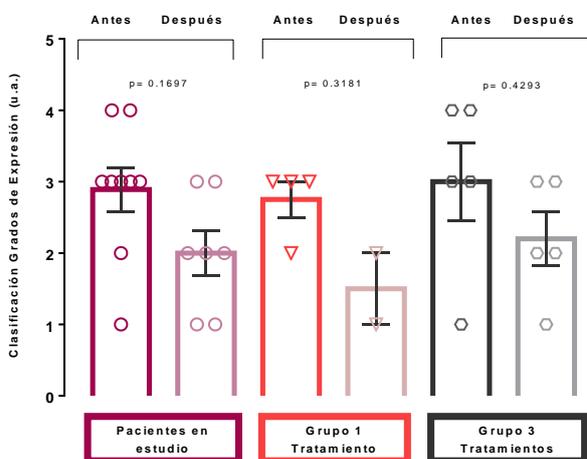
Análisis Inmunohistoquímico



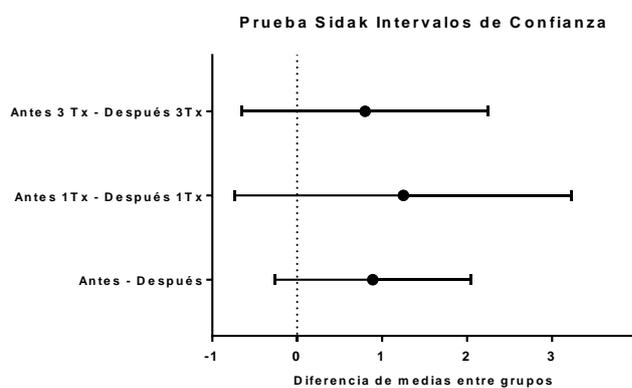
Gráfica 11. Prueba T student pareada (χ y SEM). Inmunohistoquímicas. $\alpha=0.05$



Todos los caballos fueron considerados en el análisis con la prueba T representado en la Gráfica 11. Se muestra una disminución en la expresión de los receptores purinérgicos subtipo 7 en los tejidos lamelares posterior al tratamiento, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa ($p= 0.0782$).

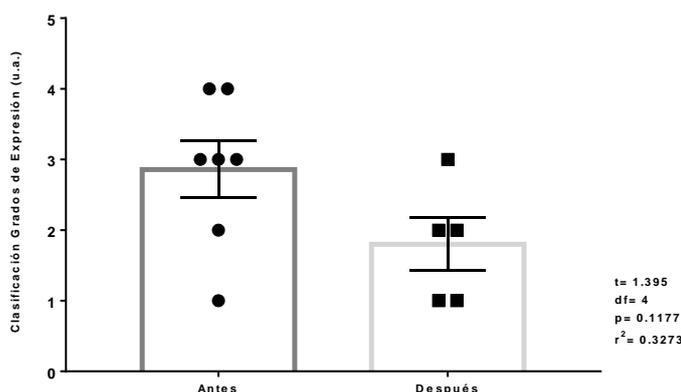


Gráfica 12. ANOVA Inmunohistoquímicas (χ y SEM) mostrando los resultados en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$



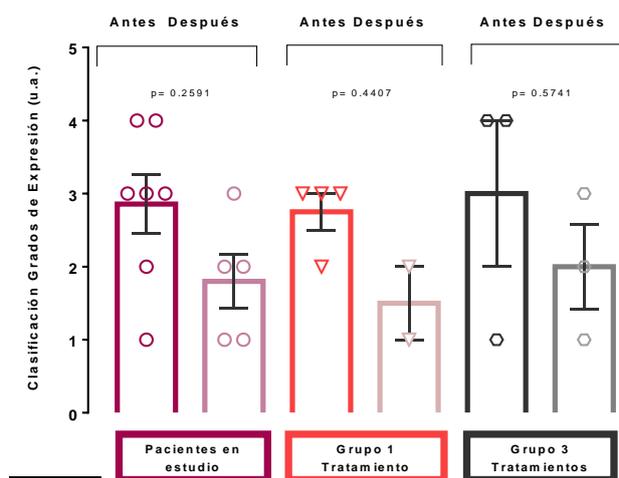
Gráfica 13. ANOVA Sidak Inmunohistoquímicas, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

Los resultados de la prueba ANOVA para conocer la diferencia entre grupos de tratamiento y saber que tratamiento fue más eficiente se ven reflejados en las gráficas 12 y 13; no existen diferencias significativas entre grupos. La Gráfica 13 contiene los intervalos de confianza señalando lo anteriormente descrito.

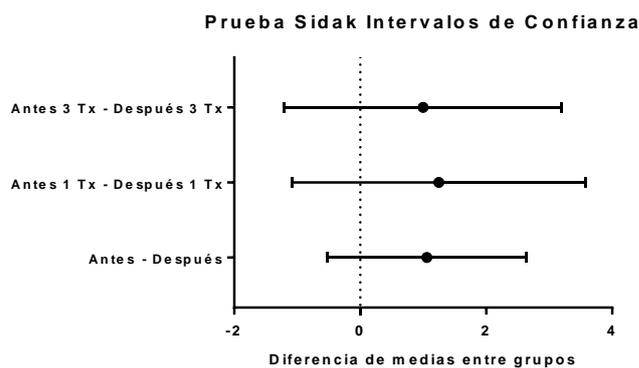


Gráfica 14. Prueba T student pareada (χ y SEM). Inmunohistoquímicas excluyendo C6 y C9. $\alpha=0.05$

La Gráfica 14 contiene el resultado de la prueba T pareada para la expresión de los receptores purinérgicos excluyendo los resultados de los caballos 6 y 9 cuyo tejido podría estar dañado por una técnica de conservación deficiente. Aparece una disminución en la expresión P2X7 después del tratamiento con células troncales sin ser estadísticamente significativa.



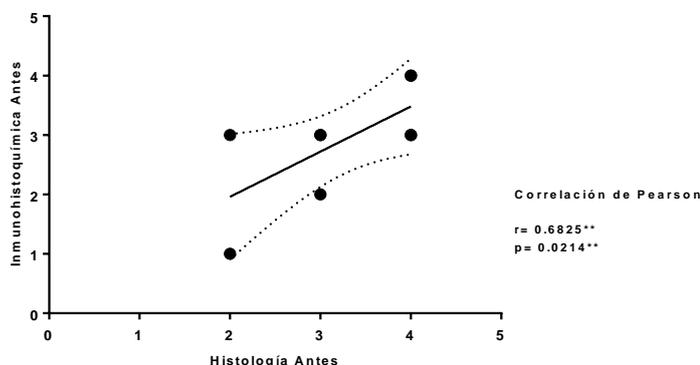
Gráfica 15. ANOVA Inmunohistoquímicas excluyendo C6 y C9 (χ y SEM) mostrando los resultados en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$



Gráfica 16. ANOVA Sidak Inmunohistoquímicas excluyendo C6 y C9, mostrando los intervalos de confianza en los tres grupos analizados. $\alpha=0.05$

La prueba ANOVA en la que se excluyen los caballos 6 y 9 pertenece a las gráficas 15 y 16; no existen diferencias significativas entre grupos de tratamiento. La Gráfica 13 contiene los intervalos de confianza señalando lo anteriormente descrito.

Al no mostrar resultados estadísticamente concluyentes a pesar de la disminución en los grados de expresión de los receptores purinérgicos P2X subtipo 7, se realizó un estudio de correlación de Pearson, con esta prueba se esperó comprobar la relación existente entre el daño histológico lamelar y la presencia de los receptores en el tejido.



Gráfica 17. Correlación de Pearson. Inmunohistoquímica Antes del tratamiento e Histología Antes del tratamiento. $\alpha=0.05$

La Gráfica 17 contiene el resultado de la correlación de Pearson, demuestra la existencia de una relación dependiente entre el grado de lesión histológica antes del tratamiento y la expresión de los receptores purinérgicos por medio de inmunohistoquímica previo a la terapia celular ($r=0.6825$).

Los resultados de correlación entre la expresión de purinérgicos después del tratamiento y la clasificación histológica después del tratamiento no mostraron una correlación estadísticamente significativa. La prueba se realizó de igual forma excluyendo los caballos 6 y 9, no se hallaron evidencias suficientes para probar una relación entre ambas variables. Las gráficas de lo anteriormente descrito están disponibles para consulta en el Anexo 4.

DISCUSION

Como pudo verse en los resultados del análisis de citometría de flujo, se obtuvieron poblaciones con un porcentaje alto al menos a un marcador (CD90 media de 33.82% \pm 5.473e.s.) indicador de un inmunofenotipo indiferenciado, lo que concuerda con lo reportado por Ranera y cols. (2011), por el contrario, los marcadores de superficie concernientes a fenotipos hematopoyéticos se encontraron bajos, CD14 presentó una media de 1.23% \pm 0.7674e.s., CD34 1.443% \pm 0.7159e.s., finalmente CD45 1.217% \pm 0.6649e.s. como puede verse en la fig. 7. A pesar de ser anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie humano y no ser específicos contra caballo, se ha buscado anteriormente la compatibilidad que existe entre los anticuerpos humanos y los pertenecientes a equinos, ya que no existen en el mercado anticuerpos específicos a la especie de interés. El resultado de este análisis arrojó los siguientes resultados para algunos anticuerpos en mención: CD14 humano y equino 74%, CD34 humano y equino 68%, CD45 humano y equino 39%, CD90 anti-equino 99%. (Roldan 2015) Por lo anterior se puede inferir un grado de confiabilidad en la citometría realizada a las poblaciones celulares a utilizar como tratamiento en los caballos del proyecto. Nuevamente debe mencionarse que de manera estricta, en nuestro trabajo se administraron *células estromales mesenquimales multipotentes* derivadas de médula ósea de equinos, ya que el protocolo usado para su cultivo solo ha demostrado en proyectos anteriores, diferenciación in vitro y no así in vivo.

Después de la administración de las células troncales mesenquimales en los pacientes no se encontraron señales de respuestas de hipersensibilidad debido al trasplante celular; en el caso que los pacientes tuvieran dolor debido a la obtención de la biopsia lamelar, se administró fenilbutazona (4.4 mg/kg PO/SID) por tres días. De manera particular el caballo 8 presentó un absceso subcórneo en el segundo mes de evaluación, éste suceso más que asociarse a la administración de las células troncales, podría explicarse por un manejo inadecuado de la antisepsia durante la toma de biopsia lamelar o aún más probable a causa del mismo proceso laminítico.

Como se observa en las gráficas 3-5 y tablas de concentración de datos para la clasificación Obel antes del tratamiento y después del mismo, los caballos se encontraban entre los grados más altos de Obel (3 y 4), independientemente del tiempo en curso de laminitis en cada paciente. Los caballos 4 y 8 no concluyeron los seis meses de observación debido a diferentes causas, el individuo C4 fue vendido como reproductora ya que no presentaba signos de laminitis y el individuo C5 fue trasladado a Mérida, además de presentar un absceso subcórneo en su último mes de evaluación; se consideró el Obel final registrado al 5º y 2º mes respectivamente. La prueba T student demostró una disminución estadísticamente significativa ($p=0.0025$) en el grado de claudicación debido al descenso en los grados Obel después del tratamiento, sin considerar la cantidad de dosificaciones administradas. Las evidencias clínicas muestran una mejoría evidente, estas se encuentran en registro fotográfico y en video. Al tener una mejoría clínica notoria, debemos considerar que en este punto, las células troncales mesenquimales administradas disminuyeron la inflamación, el tejido lamelar debe encontrarse mejor estructurado, aunado a una mejor vascularización en esta región distal, para comprobar algunos de estos supuestos, se realizaron los estudios venográficos, histológicos y termográficos. Para conocer que grupo de caballos presentó una mejoría clínica debido al número de tratamientos y seleccionar el más eficiente, se realizó la prueba ANOVA, en este caso el grupo de tres tratamientos mostró un descenso significativo ($p=0.0053$) en su claudicación y dolor; lo que indica que tres dosificaciones de células troncales en intervalos de un mes, fueron más eficientes para conducir a una mejoría clínica.

Las evidencias mostradas en el estudio venográfico de los caballos (fig. 8 a 10), infieren un aparente aumento en vascularización por estímulo de la angiogénesis, observándose vasos de mayor calibre, antes del tratamiento los vasos sanguíneos se encontraban ausentes o poco evidentes; estos cambios angiográficos fueron visibles en todos los estudios sin importar el grupo de tratamiento al que pertenecieran los caballos; analizar que tratamiento fue mejor en este respecto es difícil, ya que cada caballo se encontraba en una etapa de laminitis diferente en cuanto a daño y duración como laminitis crónica, por lo que solo puede compararse consigo mismo. Cabe señalar que múltiples textos que tratan sobre procedimientos angiográficos (Rucker 2010; Baldwin 2010), remarcan que la sola administración del medio de contraste, por el volumen administrado, podría distender los vasos

sanguíneos lo que podría ocasionar un aparente aumento en la vascularización; aun así, en este caso indicaría que el medio de contraste después del tratamiento tendría mayor posibilidad de distender o alcanzar vasos sanguíneos más distales y de menor calibre, lo que de forma indirecta indicaría un cambio importante en el sistema debido al tratamiento. Otro punto a tomar en cuenta, es la mención por algunos autores que el origen químico de algunos medios de contraste podría provocar vasodilatación lo que resultaría en un error durante la interpretación como angiogénesis. Las venografías fueron realizadas con el mismo volumen de medio de contraste, marca del medio y técnica en ambos casos, antes y después del tratamiento para todos los caballos, por lo que el aumento en la vascularización hallado en todos los pacientes se debe al tratamiento con CTM alogénicas y no así por el estudio angiográfico *per se*.

Es importante mencionar que el casco, tal como se muestra en las figuras del apartado mejora de manera notable en su arquitectura y textura, los ceños y pigmentos blanquecinos se ven reducidos en su apariencia, así como las grietas en la muralla. El herrador fue una constante para todos los caballos ingresados, pero no todos los dueños siguieron la indicación, las visitas sugeridas cada 20 a 25 días se extendían en lapsos más largos o incluso preferían la visita por otro herrador de su confianza, por ello algunos caballos en las fotografías se ven mucho más altos de talones y largos de pinzas, lo que biomecánicamente no colaboró en balance de las cargas y generó más tensión en las estructuras lamelares del casco y facilitó la progresión de la rotación dorso palmar de la falange distal por el tendón flexor digital profundo. En este respecto, la rotación dorso palmar de la falange no retrocedió en su proceso en ninguno de los equinos, el eje podofalángico permaneció roto. La falange mantuvo el mismo ángulo o en su defecto continuó el proceso de rotación, debido a la ausencia de un herraje ortopédico adecuado además de la asimetría de los cascos. La rotación dorso palmar por sí misma daña los capilares y tejido del corion en su avance hacia palmar, lo que podría disminuir la visualización de capilares o vasos sanguíneos en las zonas adyacentes en la venografía después del tratamiento, podría inferirse una mejoría en la vascularización de haberse detenido la rotación de la falange distal con ayuda de herrajes ortopédicos. Esto último solo es una posibilidad que con dificultad, más no de forma imposible, podría demostrarse en un próximo estudio.

Obtener el tejido lamelar de los caballos con laminitis crónica implicó realizar el orificio de biopsia en la misma zona en ambas muestras. Antes del tratamiento, la distancia de la muralla al tejido lamelar fue en promedio 2,4 cm comparado con un promedio de 1,9 después de seis meses, la distancia se redujo, lo que podría traducirse en una disminución en la cuña lamelar y el trabajo del herrador. El tejido lamelar con mayor daño, debido al tiempo que tenía el equino con laminitis (9-10 años) o a la falta de balance y simetría del casco lo que conlleva a un estrés biomecánico constante, en su mayoría era de consistencia laxa, frágil, fácil de cortar pero al mismo tiempo fácil de segmentar y por tanto obtener tejido incompleto de no realizarse cuidadosamente.

Se utilizó una clasificación para asignar un número al grado de daño encontrado en el tejido lamelar de los caballos tratados, esta clasificación fue basada en la propuesta por Pollit y puede consultarse en el Anexo 3, en este cuadro se describen detalladamente las características histológicas en cada grado asignado. La mayoría de los caballos presentaron grados altos de daño histológico (3 y 4), es decir que la arquitectura del tejido lamelar se encontraba comprometida, las láminas epidérmicas primarias estaban ausentes o en orientación longitudinal, con células epidérmicas hiperplásicas de tamaño reducido, láminas secundarias cortas o ausentes, abundante infiltrado perivascular, hemorragias, tejido conectivo abundante, gran distancia entre el tejido epidérmico y dérmico, células en apoptosis y en etapas de proliferación.

Estadísticamente se realizó la prueba T student sin importar el grupo de dosificación para comprobar una disminución en la clasificación histológica de daño. Para esta prueba no se consideraron los datos de los caballos 4 y 8, ya que estos no concluyeron los seis meses de observación y la biopsia final no pudo obtenerse. El resultado no arrojó resultados estadísticamente significativos ($p=0.0606$), a pesar de que se muestra en la gráfica 6 un descenso en el grado histológico de daño, aunado a las evidencia en microfotografía disponibles en el apartado de Resultados de Pruebas Inmunohistoquímicas. Los tejidos de los caballos 6 y 9 mostraron cambios degenerativos antes del corte en el criostato, relacionados a un protocolo de conservación deficiente en cualquiera de sus etapas, las fotografías obtenidas del tejido muestran mejor estructura y textura firme durante su obtención en la última evaluación de los pacientes, incluso existió dificultad para

retirar el tejido lamelar debido probablemente a su mejor adherencia a la falange distal. Otro punto a este respecto es la clasificación Obel, en múltiples escritos (Laskoski 2016; Belknap 2017; De Laat 2013; Pollitt 2004) se ha comprobado la relación directa existente entre Obel y daño histológico, a mayor daño en las láminas epidérmicas y dérmicas del casco, mayor será el nivel de claudicación y dolor. Y como se señaló anteriormente, el Obel descendió de manera considerable, incluso en estos caballos el último día de evaluación. Por estas razones, se repitió la prueba T excluyendo los caballos 6 y 9; en esta ocasión se demostró una diferencia estadística significativa ($p=0.0014$), indicando una mejoría en la estructura lamelar de los caballos debido al tratamiento, sin importar el número de dosificaciones administrado. La prueba ANOVA mostró nuevamente la mejoría en la estructura lamelar de los pacientes ($p=0.0235$), pero no se hallaron evidencias que señalaran que grupo de tratamiento fue más eficiente al generar un cambio en la estructura lamelar. El grupo de tres tratamientos fue el más cercano ($p=0.06$), al aproximarse a la significancia estadística, por lo que este número de dosificaciones debe considerarse como un punto de referencia en futuros estudios.

La mejoría del tejido lamelar debido a la terapia celular puede tener varias vías de explicación, pero todas ellas por determinarse en futuros proyectos. Entre esas vías se encuentra la posibilidad de que las células administradas se queden en el tejido de manera permanente ejerciendo su función inmunomoduladora, desinflamatoria, angiogénica y liberadora de factores de crecimiento favoreciendo la regeneración tisular. En caso de que estas células no permanezcan en la zona dañada, recluten otras células troncales mesenquimales de médula ósea del propio caballo para mantener el efecto, o en su defecto favorezca la proliferación y permanencia de las células troncales epidérmicas p63 endémicas de casco, las cuales son reconocidas por mantener el *pool* celular normal en el casco equino (Carter 2011).

Debido a que en artículos publicados se identificó la presencia de receptores al dolor crónico P2X7 en tejido lamelar de caballos con laminitis y no así en tejidos lamelares de caballo sano, se realizaron pruebas para detectarlos en los tejidos de caballos con laminitis crónica y observar su comportamiento debido al tratamiento celular, esperando que ya que se encontró una mejoría estructural importante en los tejidos lamelares después del tratamiento celular, la expresión de los receptores se redujera al disminuir la inflamación y lesión en el tejido lamelar debido a la terapia. La prueba inmunohistoquímica fue evaluada al traducir la expresión de los receptores purinérgicos vistos al microscopio, en grados de expresión dependiendo del porcentaje de tejido teñido. La tinción mostró la presencia de receptores purinérgicos en células epidérmicas halladas paralelas al axis de las láminas epidérmicas primarias, similar a lo reportado por Zamboulis (2013). La prueba T student realizada no mostró una diferencia significativa, no se hallaron evidencias de disminución en la expresión de receptores purinérgicos debido al tratamiento. Lo anterior se comprobó nuevamente en la prueba ANOVA, no se encontraron evidencias estadísticas respecto a que un grupo de tratamiento fuera mejor que el otro. Las pruebas se realizaron excluyendo a los caballos 6 y 9, nuevamente los resultados no demostraron la disminución estadística en la expresión de los receptores purinérgicos P2X-7 debido al tratamiento o a la mejoría del tejido lamelar. Debido a esto se analizó la relación entre el daño histológico y la expresión de los receptores purinérgicos por medio de un estudio de correlación de Pearson, como se esperaba se encontró una relación directa como se mostró en la Gráfica 17, entre mayor daño en las láminas del casco equino, mayor expresión de receptores purinérgicos en el tejido lamelar, traduciéndose en mayor respuesta inflamatoria debido a la lesión tisular. La misma prueba se realizó con los valores de daño histológico después del tratamiento y el grado de expresión de purinérgicos después del tratamiento, sorprendentemente no se encontró la relación esperada, la prueba indicó que son variables independientes. La posible respuesta en este punto, podría hallarse en el manejo del caballo de manera individual, ya que al encontrarse en su lugar de origen no se puede hablar de un medio controlado para todos los individuos en experimentación, las visitas del herrador involucrando el tipo de herraje y recorte del casco, el trabajo ocasional, el tipo de suelo de su hogar, podrían colaborar en la permanencia de microtraumatismos y acción de fuerzas biomecánicas sobre el tejido lamelar que prologaría el estado inflamatorio crónico en diferentes grados, lo que podría justificar que algunos caballos no mostraran un descenso más notable en la expresión de receptores P2X-7, los cuales son asociados a inflamación crónica, como se vio en el apartado introductorio.

El caballo 5 por ejemplo, mostró un aumento en la expresión de receptores purinérgicos, sin presentar un progreso en el daño histológico, esto podría ser explicado por la visita del herrador días antes de la última evaluación, quien recortó en exceso la suela de los miembros torácicos del equino, dejando una capa sumamente delgada entre la queratina del casco y el corion, el contacto del casco con cualquier tipo de superficie carecía de amortiguamiento, este contacto y la exposición del corion, generaría una respuesta inflamatoria que podría traducirse en una mayor cantidad de P2X-7. Pese a esto, más estudios deben realizarse y con un número de individuos en experimentación mayor, lo que ayudaría a dar más certeza a los hallazgos en el proyecto.

En este proyecto solo se tienen pruebas de una mejor estructura lamelar histológicamente debido al tratamiento, pero no se realizaron procedimientos que constaten la integridad de la membrana basal, la cual sería la indicadora de una estructura lamelar integrada y semejante a la normal. Para evaluar el colágeno del tejido lamelar se realizaron tinciones PAS por sus siglas en inglés Periodic Acid Schiff (resultados no mostrados), pero debido al grosor de las muestras las tinciones no fueron las óptimas y los resultados por tanto inútiles a este fin. Solo se puede inferir que existieron cambios benéficos en la membrana basal y sus componentes, ya que el cambio en la estructura lamelar presentó cambios cercanos a la arquitectura normal, los cambios en longitud y orientación de las láminas epidérmicas secundarias no podría haber ocurrido sin los cimientos, es decir, sin una membrana basal y proteínas de adhesión que mantuviera el tejido epidérmico-dérmico en unión y aposición.

La prueba ANOVA mostró una disminución estadísticamente significativa ($p=0.0118$) en la temperatura de la corona de los miembros torácicos de los caballos en el proyecto debido al tratamiento y comparado con la temperatura antes de la terapia, sin importar la cantidad de dosis suministradas. La misma prueba ANOVA indicó que el grupo de un solo tratamiento mostró un descenso estadísticamente significativo ($p=0.0171$) comparado con el grupo de tres tratamientos, este último también mostró un descenso en la temperatura pero de manera estadística, un solo tratamiento fue eficiente en este respecto. La disminución en la temperatura puede hacer referencia a la disminución en la inflamación del tejido lamelar, probablemente debido al efecto inmunomodulador de las células troncales administradas. También podría traducirse en incremento de la irrigación tisular justo en esta porción distal del miembro torácico de los equinos, optimizando el flujo sanguíneo disminuyendo el estasis sanguíneo, así como restituyendo el retorno venoso. Debe mencionarse que la temperatura tomada con el equipo de termografía varía rápidamente y por infinidad de circunstancias. Exposición al sol, baños, trabajo, caballos colgados en piso duro, camas húmedas, trabajo del herrador, etcétera, antes de la visita para su evaluación mensual modificaban los valores obtenidos hasta en 3°C . Por lo que tomar esta variable como un indicador de "mejoría" es controversial y debe realizarse en conjunto con otras pruebas como las realizadas en nuestro trabajo o en el mejor de los casos bajo un ambiente controlado para los equinos en experimentación.

La doctora Lisa Fortier en el XL Congreso Anual del AMMVEE, habló sobre la transmisión de Parvovirus tres semanas posteriores de la administración de las células troncales mesenquimales en un equino seguido de su muerte por insuficiencia hepática, en el presente trabajo no se presentó la muerte de animales debido a enfermedad o eutanasia así como la ausencia de signos de enfermedad infecciosa. Debe recordarse que los caballos seleccionados como donadores solo fueron analizados para AIE (Anemia Infecciosa Equina). No puede descartarse la posibilidad de transmisión de cualquier enfermedad de este mismo origen o el hecho de que el trasplante celular y la nueva información genética transmitida por este método podrían provocar la activación de genes inactivos en el individuo receptor, lo que podría resultar en efectos benéficos o perjudiciales, así como la transmisión de oncogenes. Por lo anterior, la posibilidad de adquirir los factores de crecimiento y los productos de las células troncales para ser administrados sin la célula, es un área de investigación actualmente atractiva.

El factor biológico es un punto a considerar, cada equino bajo experimentación es un ser con características biológicas diferentes y particulares, cada uno de ellos presenta una respuesta inmunológica e inflamatoria diferente de otros, lo cual influirá inevitablemente en la respuesta a las células troncales administradas, el tiempo de permanencia, su actividad y respuesta biológica, así mismo a los tiempos de reparación y regeneración de la estructura lamelares. La terapia celular resultó efectiva en caballos con laminitis crónica, pero debe considerarse que los caballos en el

proceso de estudio no se encontraban en un medio controlado, además de los diversas variables involucradas ya que se desconoce en la mayoría de los equinos en el proyecto si la causa de laminitis es de origen metabólico o de un síndrome inflamatorio, lo cual mostraría resultados interesantes en cuanto al tiempo requerido para ver un efecto en el tejido lamelar dependiendo del origen.

Publicaciones similares son escasas, es difícil comparar nuestros resultados debido a que existen diferencias importantes. Son muy pocos los reportes en laminitis crónica, en su mayoría los artículos se enfocan en la fase aguda de la enfermedad, los estudios de daño histológico son de biopsias de tejido lamelar de caballos con laminitis obtenidas después de la eutanasia, tampoco existe la comparación del tejido lamelar debido a algún tratamiento ya que las biopsias obtenidas de caballos en pie solo se han reportado en caballos sanos. (Ranera 2011) En su mayoría, las investigaciones enfocadas en la patofisiología y tratamiento de laminitis, utilizan modelos experimentales de inducción de laminitis con sobrecarga de carbohidratos y no el modelo “natural” de la enfermedad como lo hace nuestro trabajo.

En 2014, Morrison y cols., administraron CTM alogénicas derivadas de cordón umbilical en caballos con laminitis crónica, administraron 20-30 millones de células vía perfusión regional intraarterial y endovenosa (a. y v. digital palmar) con ayuda de un torniquete a nivel del menudillo, el cual permaneció de 25 a 30 minutos posteriores a la administración. Reportaron que la administración de células alogénicas no mostró reacciones adversas al probarse vía intradérmica antes de su administración por perfusión regional. Señalaron que las vías venosas y arteriales son efectivas para el depósito de las células troncales y que observaron mejoría clínica en 87% de los casos clínicos tratados ($p=0.0464$) antes de 71.5 días con laminitis, para los caballos con más de 71.5 días con laminitis el porcentaje de éxito fue de 53% ($p=0.0464$), cada uno de ellos recibió de 1 a 4 dosis por miembro afectado. Aquellos caballos que recibieron el tratamiento dentro de los primeros 30 días posteriores a la presentación aguda obtuvieron un 100% de éxito y por último reportaron que en los casos con más de 90 días de laminitis, solo obtuvieron un 50% de éxito. (Morrison et al. 2014). No se menciona en el artículo el tipo de análisis estadístico seleccionado para evaluar la mejoría clínica, en nuestro trabajo el análisis con la prueba T pareada y ANOVA para la clasificación Obel mostró mejoría clínica estadísticamente significativa ($p=0.0025$) de todos los caballos en el estudio sin importar el tiempo con la enfermedad y a pesar de que las CTM administradas en el estudio de Morrison no fueron de médula ósea. La administración de las células fue únicamente por vía endovenosa para disminuir la probabilidad de trombos complicaciones por su causa como la pérdida de casco, por el contrario al trabajo de Morrison quien también realizó la administración de las células vía arterial; para los caballos que trató con laminitis crónica severa, mencionó que no existió mejoría debido a que la cuña lamelar y la rotación dorso palmar de la falange distal permaneció sin cambios en los estudios radiográficos, lo que concuerda con lo encontrado en este trabajo; Morrison no realizó biopsias de tejido lamelar por lo que no pudo comprobar el proceso regenerativo de las láminas a pesar de no disminuir la rotación de la falange distal .

En otro artículo, Angelone y cols. (2017), dieron a conocer los resultados de su investigación, en ella trataron 9 caballos con laminitis crónica usando CTM derivadas de tejido adiposo en combinación con plasma rico en plaquetas (PRP), cada animal fue tratado bajo tres administraciones en intervalos de un mes, de 15 millones de CTM resuspendidas en 15ml de PRP, usando un torniquete justo en la región del menudillo (articulación metacarpofalángica) y administradas en la vena digital lateral o medial; la primera administración de CTM era alogénica y las siguientes dos administraciones eran de origen autólogo, el PRP siempre fue autólogo. Efectuaron exámenes clínicos cada cuatro horas durante tres días posteriores a la administración y posteriormente cada 8 horas, realizaron venografías antes y después del tratamiento para evaluar la condición de la región del casco. Como resultado del tratamiento sus pacientes mostraron mejoría clínica y la mayoría de ellos regresaron a su actividad dentro de los seis meses posteriores al tratamiento, en las venografías se mostró recuperación de la vascularización acorde con la mejoría en la función motora, atribuible a la terapia celular. Señalaron que no observaron efectos adversos a causa de la terapia alogénica, de los nueve caballos, solo dos mostraron signos de laminitis después de un año del tratamiento. (Angelone et al. 2017) La mejoría clínica demostrada por análisis estadístico a los seis meses posteriores al tratamiento coincide con lo reportado por Angelone, lamentablemente no realizó pruebas estadísticas sobre esta variable. Los cambios en la recuperación de la vascularización,

también fueron vistos en el nuestro trabajo (Fig. 8-10) y coinciden con la mejoría motora de los pacientes mencionada en su artículo; al igual que en su investigación no se vieron signos clínicos de hipersensibilidad debido a la administración de las células, aunque en este caso Angelone usó una combinación de CTM de origen adiposo con plasma rico en plaquetas, mientras que en nuestro trabajo las células tuvieron como origen médula ósea sin adición de otro componente en el tratamiento para tener mayor certeza de los efectos de las CTM alogénicas sobre el tejido lamelar. Adicionalmente, Angelone menciona que observó mejoría en la condición corporal de caballos tratados, esto también fue observado durante el avance del proyecto, fue evidente sobre todo en cinco caballos con mayor tiempo de enfermedad, presentaron aumento de peso promedio de 30,4kg además de una mejor actitud o estado anímico (dato subjetivo mencionado por las personas responsables de los caballos).

En ninguno de los trabajos anteriores se llevó registro de un grupo control o negativo, en nuestro trabajo tampoco tuvimos un grupo control, exceptuando el caballo sano del que se extrajo la biopsia de tejido lamelar sin laminitis y el estudio venográfico. A pesar de ver los cambios en la disminución de la temperatura del casco, la aparente angiogénesis en las venografías y la mejoría en la arquitectura histológica de las láminas del casco en una comparativa del antes y después del tratamiento en todos los caballos con laminitis crónica, la presencia de un grupo control en el que se administrara solución salina fisiológica o medio de transporte de las células sin las células, daría mayor certeza respecto los resultados obtenidos, ya que en este punto no podemos asegurar que ninguno de estos factores haya podido influir en los resultados presentados.

CONCLUSIONES

- ❏ El tratamiento con células troncales mesenquimales alogénicas con origen en médula ósea de equinos parece ser un tratamiento prometedor para caballos con laminitis crónica, nuestros resultados sugieren un proceso regenerativo en el tejido lamelar.
- ❏ Los resultados obtenidos en el análisis estadístico de termografías, venografías, clasificación Obel y clasificación histológica, mostraron evidencia estadística significativa en la disminución de la temperatura del casco, aparente aumento en la vascularización en la región distal del casco, disminución en el dolor y claudicación de los pacientes, así como un proceso regenerativo en el tejido lamelar de los caballos sugerente de la eficacia del tratamiento con células troncales mesenquimales alogénicas con origen en médula ósea sin señales de reacciones de hipersensibilidad en los caballos tratados.
- ❏ Tres dosificaciones de 30 millones de células por dosis mensualmente, resultó el tratamiento más efectivo con base en las pruebas estadísticas.
- ❏ A pesar de hallarse receptores purinérgicos P2X-7 en el tejido lamelar y ver la disminución en su expresión en el tejido después del tratamiento, la evaluación de los receptores purinérgicos no resultó estadísticamente un parámetro indicador en la mejoría del tejido lamelar, diversos factores modifican la expresión de éstos, pero no debe descartarse en futuros estudios con mayor cantidad de pacientes o ambientes controlados.
- ❏ Los factores biomecánicos son determinantes en cuanto a la velocidad o éxito del tratamiento, los retrasos en la mejoría clínica y probablemente en la regeneración del tejido lamelar de algunos equinos debido a un herraje ortopédico incorrecto no pueden descartarse y deben considerarse para estudios futuros. El herraje ortopédico es un punto importante en el tratamiento contra laminitis.
- ❏ Un mayor número de pacientes, ambiente controlado y herraje ortopédico podrían dar mayor certeza a los resultados histológicos e inmunohistoquímicos en futuras

investigaciones, además del análisis ultraestructural de la membrana basal en el tejido lamelar de los caballos tratados para comprobar la regeneración a este nivel.

- ❏ La adición de un grupo control en el cual solo se administre medio de transporte sin contener las células, daría mayor certeza en futuros estudios del proceso regenerativo en caballos con laminitis debido a la terapia celular y no así por el medio de transporte en el que están suspendidas las células o por el estímulo del proceso de dosificación en los caballos.

PERSPECTIVAS

En nuestro trabajo las células listas para su administración fueron mantenidas en alícuotas bajo congelación, la creación de un banco de células troncales mesenquimales de origen alogénico es una idea atractiva, permitiría tener el tratamiento disponible rápidamente en respuesta a la demanda de los equinos con laminitis sin la necesidad de esperar un aproximado de 4 semanas como lo es en los tratamientos con células troncales autólogas.

No puede descartarse la posibilidad de transmisión de cualquier enfermedad viral o el hecho de que el trasplante celular y la nueva información genética transmitida por este método podrían provocar la activación de genes inactivos en el individuo receptor, lo que podría resultar en efectos benéficos o perjudiciales, así como la transmisión de oncogenes. Por lo anterior, la posibilidad de adquirir los factores de crecimiento y los productos de las células troncales para ser administrados sin la célula, es un área de investigación actualmente atractiva.

Los resultados de este trabajo podrían abrir puertas a nuevas investigaciones en el ámbito veterinario o incluso en medicina humana en área regenerativa a nivel epitelial, en aquellas enfermedades cutáneas en las que se han perdido proteínas de adhesión en membrana basal o daño directo en membrana basal.

REFERENCIAS

1. Angelone, M. et al., 2017. The Contribution of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to the Treatment of Chronic Equine Laminitis: A Proof of Concept. *International journal of molecular sciences*, 18(10), p.2122.
2. Baldwin, G.I. & Pollitt, C.C., 2010. Progression of venographic changes after experimentally induced laminitis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(1), pp.135–140.
3. Belknap, J.K. & Geor, R.J., 2017. *Equine Laminitis*, John Wiley & Sons.
4. Black, S.J. et al., 2006. Leukocyte emigration in the early stages of laminitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109(1-2), pp.161–166.
5. Britta L, Assessment of digital venograms in non laminitic horses., In: 62th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2016, Orlando, Florida, (Ed.).
6. Budras, K.-D., Sack, W.O. & Rock, S., 2003. *Anatomy of the horse: an illustrated text*, Schlütersche.
7. Carter, R.A. et al., 2011. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine veterinary journal*, 43(5), pp.543–51.
8. Cassano, J.M. et al., 2015. Mesenchymal Stem Cell Therapy: Clinical Progress and Opportunities for Advancement. *Current Pathobiology Reports*, 3(1), pp.1–7.
9. Claver, J. & Giménez-Urquiza, A., 2003. *El casco equino*.
10. Collins, S.N. et al., 2010. The lamellar wedge. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(1), pp.179–195.
11. Denoix, J.-M., 2000. *The equine distal limb: an atlas of clinical anatomy and comparative imaging*, CRC Press.
12. Driessen, B., Bauquier, S.H. & Zarucco, L., 2010. Neuropathic pain management in chronic laminitis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(2), pp.315–337.
13. Eps, A. & Pollitt, C., 2004. Equine laminitis: cryotherapy reduces the severity of the acute lesion. *Equine veterinary journal*, 36(3), pp.255–260.
14. Flores-Figueroa, E., Montesinos, J.J. & Mayani, H., 2006. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de investigación clínica*, 58(5), pp.498–511.
15. Fortier, L.A., 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), pp.415–423.
16. Fortier, L.A. & Travis, A.J., 2011. Stem cells in veterinary medicine. *Stem cell research & therapy*, 2(1), p.9.
17. French, K. & Pollitt, C., 2004. Equine laminitis: loss of hemidesmosomes in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligofructose induction model: an ultrastructural study. *Equine veterinary journal*, 36(3), pp.230–235.
18. Gravena, K. et al., 2012. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural access. *Journal of equine veterinary science*, 32(12), pp.858–862.
19. Hampson, B. et al., 2012. Histopathological examination of chronic laminitis in Kaimanawa feral horses of New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 60(5), pp.285–289.
20. Harfoush, K. et al., 2016. Venous valvular distribution in the thoracic and pelvic limbs of the horse. *Anatomia, histologia, embryologia*, 45(6), pp.409–417.
21. Hernández, M.P., TERAPIA REGENERATIVA: CELULAS MADRE.
22. Heymering, H.W. & others, 2010. 80 Causes, predispositions, and pathways of laminitis. *The Veterinary Clinics Of North America*, 26(1), p.13.
23. Hood, D.M. et al., 1993. The role of vascular mechanisms in the development of acute equine laminitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(4), pp.228–234.
24. Krampf, A.-C., 2012. *Equine laminitis*.
25. KUWANO, A. et al., 2005. Unilateral basement membrane zone alteration of the regenerated laminar region in equine chronic laminitis. *Journal of veterinary medical science*, 67(7), pp.685–691.
26. De Laat, M.A. et al., 2013. Histological and morphometric lesions in the pre-clinical, developmental phase of insulin-induced laminitis in Standardbred horses. *The Veterinary Journal*, 195(3), pp.305–312.
27. Laminitis, E., In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 2003, New Orleans, Louisiana, (Ed.).
28. Lanza, R. et al., 2004. *Handbook of Stem Cells, Two-Volume Set: Volume 1-Embryonic Stem Cells; Volume 2-Adult & Fetal Stem Cells*, Academic Press.
29. Laskoski, L.M. et al., 2016. An update on equine laminitis. *Ciência Rural*, 46(3), pp.547–553.
30. Lazarowski, E.R. & Schwarzbaum, P.J., 2009. Señales purinérgicas. *Medicina (Buenos Aires)*, 69(2), pp.267–276.
31. Leise, B., 2018. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell and tissue research*, pp.1–10.

32. De Lima, L.R. et al., 2016. Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofructose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. *Pesq. Vet. Bras*, 36(1), pp.13–18.
33. Loftus, J.P. et al., 2009. Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 129(3-4), pp.221–230.
34. Lunn, D.P. & Hurley, D.J., 2009. The role of leukocyte biology in laminitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 129(3-4), pp.158–160.
35. Medina-Torres, C.E. et al., 2011. Hypoxia and a hypoxia mimetic up-regulate matrix metalloproteinase 2 and 9 in equine lamellar keratinocytes. *The Veterinary Journal*, 190(2), pp.e54–e59.
36. Mitchell, C. & Beadle, R., 2010. Deep Digital Flexor Tenotomy as a Treatment for Horses With Chronic Laminitis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(2), p.111.
37. Morrison, S. et al., 2014. How to use stem cells in clinical laminitis cases. In *Proceedings of the 60th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Salt Lake City, Utah, USA, December 6-10 2014. pp. 499–503.
38. Nourian, A.R. et al., 2010. Intraosseous Infusion of the Distal Phalanx and Lamellar Microdialysis: New Techniques for Lamellar Drug Delivery and Analysis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(2), p.98.
39. Onishi, J.C. et al., 2012. Chronic laminitis is associated with potential bacterial pathogens in the laminae. *Veterinary microbiology*, 158(3-4), pp.329–336.
40. Paes Leme, F. et al., 2010. Histopatologia das lâminas do casco de equinos com laminite aguda induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.
41. Penny, J. et al., 2012. The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front Biosci*, 17, pp.892–908.
42. Pilliner, S., Elmhurst, S. & Davies, Z., 2009. *The horse in motion: The anatomy and physiology of equine Locomotion*, John Wiley & Sons.
43. Pollitt, C., *Atlas en color el pie del caballo*, (1998) Editorial Harcourt Brace.
44. Pollitt, C.C., 1996. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine veterinary journal*, 28(1), pp.38–46.
45. Pollitt, C.C., 2004. Equine laminitis. *Clinical Techniques in equine practice*, 3(1), pp.34–44.
46. Pollitt, C.C., 2010. The anatomy and physiology of the suspensory apparatus of the distal phalanx. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 26(1), pp.29–49.
47. Portugal, M.T.M. & Gualix, J., 2009. Neurotransmisión mediada por nucleótidos: perspectivas terapéuticas en neurodegeneración y neuroprotección. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
48. Prosper, F. et al., 2006. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. In *Anales del sistema sanitario de Navarra*. pp. 219–234.
49. Ranera, B. et al., 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(1-2), pp.147–154.
50. Roldan, G., 2015. Tesis Movilización de células troncales Mesenquimales a circulación periférica usando el factor de estimulación de colonias de granulocitos en equinos, UNAM.
51. Rucker, A., 2010. Equine venography and its clinical application in North America. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 26(1), pp.167–177.
52. Saldívar-Santoyo, H.J. et al., 2013. El nicho de las células troncales: los secretos de su “código postal.” *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 56(3), pp.47–59.
53. Schnabel, L.V. et al., 2013. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 197(3), pp.570–7.
54. Stashak, T.S., 2004. *Adams: Claudicación en el caballo*,
55. Steelman, S.M. et al., 2013. Cellular and humoral immunity in chronic equine laminitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 153(3-4), pp.217–226.
56. Terry, R.L. et al., 2010. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Gabapentin in Horses: A Potentially Useful Analgesic Agent for the Treatment of Laminitis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(2), pp.100–101.
57. Vázquez, F., Romero, A. & Rodellar, C., 2012. Medicina regenerativa: aplicación en la clínica equina. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2), pp.38–48.
58. Vertes, A.A. et al., 2015. Stem cells in regenerative medicine: Science, regulation and business strategies, John Wiley & Sons.

59. Visser, M. & Pollitt, C., 2011. The timeline of lamellar basement membrane changes during equine laminitis development. *Equine veterinary journal*, 43(4), pp.471–477.
60. Wang, L. et al., 2013. Impact of laminitis on the canonical Wnt signaling pathway in basal epithelial cells of the equine digital laminae. *PloS one*, 8(2), p.e56025.
61. De Windt, T.S., Vonk, L.A. & Saris, D.B., 2017. Response to: Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem cells translational medicine*, 6(8), pp.1747–1748.
62. Zamboulis, D. et al., 2013. Distribution of purinergic P2X receptors in the equine digit, cervical spinal cord and dorsal root ganglia. *Purinergic signalling*, 9(3), pp.383–393.
63. Zamboulis, D.E. et al., 2013. Expression of purinergic P2X receptor subtypes 1, 2, 3 and 7 in equine laminitis. *The Veterinary Journal*, 198(2), pp.472–478

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla: Datos de los pacientes en estudio

PACIENTE	EDAD	SEXO	RAZA	No. DE TRATAMIENTOS	CAUSA LAMINITIS	TIEMPO APROXIMADO CON LAMINITIS	GRADO OBEL
C1	8	H	Cuarto milla	3	SAA	1 año	3
C2	15	H	SRD	3	Aborto, Retención placentaria	9 años	4
C3	8	M	PSI	1	SAA	8 meses	1
C4	7	H	Cuarto milla	1	Desconocido	2 semanas	3
C5	2	MC	Cuarto milla	3	Postquirúrgico Desmotomía	1 año	3
C6	14	M	SRD	3	Desconocido	2 años	4
C7	19	H	SRD	1	Retención placentaria	9 años	4
C8	5	M	Cuarto milla	1	Desconocido	2 años	2
C9	8	H	Cuarto milla Appendix	3	Desconocido	5 años	3

SAA: Síndrome Abdominal Agudo
H: Hembra
M: Macho entero
MC: Macho castrado
SRD: Sin Raza Definida

Anexo 2.

Tabla: Donadores de Médula Ósea

CABALLO	DESCRIPCIÓN
1	PSI MACHO ENTERO, 2 AÑOS, 450KG
2	PONY MACHO CASTRADO, 8 AÑOS, 350KG
3	PSI YEGUA, 3 AÑOS, 380KG
4	PONY CASTRADO, 10 AÑOS, 396KG
5	PONY CASTRADO, 11 AÑOS, 435 KG
6	PONY CASTRADO, 4 AÑOS, 380KG
7	PSI ENTERO, 2 AÑOS, 450 KG
8	PSI HEMBRA, 2 AÑOS, 450 KG
9	PSI ENTERO, 3 AÑOS, 480 KG

PONY: Caballo criollo del hipódromo
Todas las muestras fueron recolectadas en las instalaciones del Hipódromo de las Américas, DITEQ.

Anexo 3.

Clasificación de Alteraciones Histológicas en Laminitis

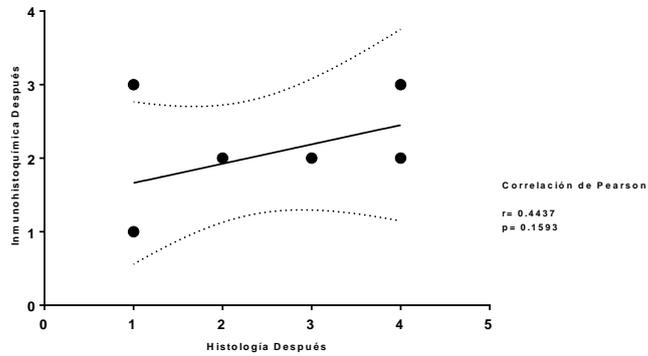
CLASIFICACIÓN DE ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN LÁMINAS DE CABALLOS CON LAMINITIS CRÓNICA	
GRADO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS
0	LD ¹ y LE ² homogéneas e intercaladas. Dirigidas oblicuamente del axis de las LP correspondientes. Ápice redondeado y adherido firmemente al tejido conectivo y membrana basal. Células basales con núcleo oval y apical a membrana basal. Ausencia de infiltrado inflamatorio perivascular.
1	Alargamiento de las LEP ³ . Terminación "puntiaguda" de las LES ⁴ . Células basales con núcleo redondo y elongadas. Núcleo adyacente a membrana basal. Separación de membrana basal. Burbujas pequeñas de MB desprendida. Láminas secundarias distorsionadas y reducidas en tamaño. Poco o nulo infiltrado perivascular.
2	Degeneración de las LEP. Zonas de necrosis celular. Separación de LEP y LDP. Membrana basal retraída junto con LDS ⁵ Hiperplasia de células basales en LE. Zonas amorfas sin MB adyacentes al axis de LEPs. Núcleos de células basales picnóticos, cariólisis, cariorrexis. Señales de apoptosis. Tejido conectivo abundante. Infiltrado perivascular escaso.
3	Agregados de MB libre, adyacentes a las LEPs Pérdida de la orientación de las LES Células epidérmicas basales libres, sin unión a la dermis. Hiperplasia marcada de células epidérmicas basales. Láminas separadas completamente de MB y sus uniones de tejido conectivo. Abundante infiltrado perivascular. Presencia de células leucocitarias. Tejido queratinizado abundante, mayor distancia hasta la punta de la LDP ⁵ .
4	Pérdida de la arquitectura de las láminas. Material amorfo localizado entre las láminas. Abundante tejido conectivo. Núcleos de células basales picnóticos, cariólisis, cariorrexis. Infiltrado inflamatorio perivascular marcado. Hiperplasia de células epidérmicas abundante sin estructura de LEP.

Modificado de Pollitt (1996), Paes Leme (2010)

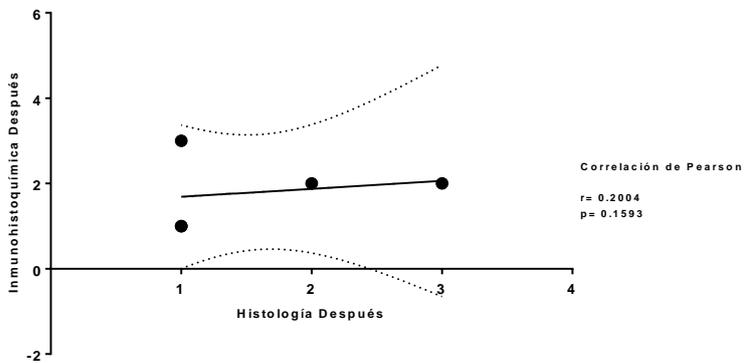
1. Lámina dérmica
2. Lámina epidérmica
3. Lámina epidérmica primaria
4. Láminas epidérmicas secundarias
5. Láminas dérmicas secundarias
6. Lámina dérmica primaria

Anexo 4.

Gráficas. Resultados de Correlación de Pearson



Gráfica 18. Correlación de Pearson $\alpha=0.05$ Inmunohistoquímicas después del tratamiento e Histologías después del tratamiento.
 No existen evidencias de una relación entre las lesiones histológicas y la expresión de receptores purinérgicos



Gráfica 19. Correlación de Pearson $\alpha=0.05$ Inmunohistoquímicas después del tratamiento e Histologías después del tratamiento. Excluyendo C6 y C9.
 No existen evidencias de una relación entre las lesiones histológicas y la expresión de receptores purinérgicos