



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS A LARGO
PLAZO DEL TRATAMIENTO CON
BIFOSFONATOS Y FÁRMACOS DE
ACCIÓN LENTA SOBRE EL
CARTÍLAGO Y EL HUESO
SUBCONDRALE EN UN MODELO DE
OSTEOARTRITIS EN CONEJO**

Silvia Fernández Martín

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y
APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

LUGO

2021

D./Dña. **Silvia Fernández Martín**

Título da tese: **Estudio de los efectos a largo plazo del tratamiento con bifosfonatos y fármacos de acción lenta sobre el cartílago y el hueso subcondral en un modelo de osteoartritis en conejo**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Lugo, 24 de mayo de 2021.**

Firma electrónica

Fdo. Silvia Fernández Martín

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

ESTUDIO DE LOS EFECTOS A LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON BIFOSFONATOS Y FÁRMACOS DE ACCIÓN LENTA SOBRE EL CARTÍLAGO Y EL HUESO SUBCONDRA EN UN MODELO DE OSTEOARTRITIS EN CONEJO

D./D^a. Antonio González Cantalapedra (director y tutor)

D./D^a. Mónica López Peña (director)

D./D^a. Fernando María Muñoz Guzón (director)

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. Silvia Fernández Martín, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Lugo, 24 de Mayo de 2021

El estudio fue autofinanciado por el Grupo de Investigación “Cirugía Experimental Veterinaria” (G1-1708) y la ayuda para la consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas y otras acciones de fomento en las universidades del SUG-GRC (GRC ED431C 2017/37). Investigador responsable: Antonio González Cantalapiedra.

Durante el periodo de la tesis de doctorado, Silvia Fernández Martín fue beneficiaria de las siguientes ayudas de investigación:

- Ayuda predoctoral FPU con Ref: FPU2015-05325, concedida por Resolución de 5 de agosto 2016, de la Secretaria de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades, por la que se conceden ayudas para contratos predoctorales para la Formación de Profesorado Universitario, de los subprogramas de Formación y Movilidad dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad.
- Ayuda para estancia breve con Ref: EST17/00862, en PORTUGAL, conforme a la Resolución de 31 de agosto de 2018, de la Secretaría de Estado de Universidades, Investigación, Desarrollo e Innovación, por la que se conceden ayudas de movilidad para estancias breves en otros centros españoles y extranjeros y para traslados temporales a centros extranjeros a beneficiarios del subprograma de formación del profesorado universitario.

AGRADECIMIENTOS

¡Y por fin, llegó el final de mi etapa predoctoral! No voy a mentir, no ha sido fácil. Los miedos, las inseguridades, los “no voy a poder...”, han sido miles de veces las que se me pasó por la cabeza abandonar... Llegados a este punto solo puedo dar las GRACIAS a todos los que me acompañasteis en este largo camino dándome el impulso necesario para continuar...

A mis directores de tesis, Antonio, Fernando y Mónica, por vuestra paciencia, apoyo y dedicación, sin vosotros no hubiese sido posible. Especialmente, GRACIAS Antonio, por confiar en mí cuando ni yo misma lo hacía, por tantas y tantas horas de quirófano compartidas, por contagiarme de tu energía, alegría y de tu amor por la cirugía veterinaria, quiero que sepas que si he llegado hasta aquí ha sido por y gracias a ti.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio y del HVU Rof Codina, por cada uno de los buenos momentos compartidos, tanto dentro como fuera de la Universidad.

Gracias a mis compañeros de doctorado Vicky y Mario, porque en ellos encontré dos pilares sobre los que sostenerme, por alegrar mis días grises, por escucharme y por entenderme. ¡Habéis sido los mejores compañeros que se podría tener!

Gracias a mi tutor de estancias “Chema” y todo el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria CEU Cardenal Herrera, por acogerme con los brazos abiertos, y por hacerme sentir una más entre vosotros, por introducirme en el apasionante mundo de la cirugía mínimamente invasiva y por recordarme que el trabajo es importante, pero DISFRUTAR de lo que haces... lo es aún más.

Gracias a todos los compañeros del Hospital Veterinario de la UTAD, donde tuve la suerte de realizar mis estancias internacionales, por vuestra paciencia con mi mal hablado “portuñol”, por mostrarme un trocito de vuestro hermoso país y por enseñarme a tratar a los animales con un cariño y respeto inimaginables.

Gracias a todas esas personas que estáis siempre a mi lado, ¡vosotros sabéis quienes sois!, a las que siempre habéis estado y a las que aparecisteis en mi vida para quedaros, soy muy afortunada de teneros.

GRACIAS a toda mi familia... a mi guelita, TITA, Jose Manuel, Anina, Fernando, Pepita, Jose María y Celsa, por ayudarme en todo momento y por vuestro apoyo incondicional. Especialmente, a mi guelito “El Pintu”, sé que te habría hecho muy feliz vivir esto conmigo...

GRACIAS a mi mamá, mi mejor amiga, por ser un ejemplo de superación y por todo tu AMOR con mayúsculas, que afortunada soy de tenerte como madre.

A mi PADRE, mi motor, mi fuerza y mi energía, que sepas que pienso en ti TODOS los días de mi vida.

Y por último, GRACIAS a mi César, el mejor compañero de vida que jamás pude imaginar, por tu generosidad, paciencia y comprensión, por tu BONDAD y por ser siempre mi faro en la oscuridad.

ABREVIATURAS

ACLT	Sección del ligamento cruzado anterior
ADAMTS	Desintegrina y metaloproteasa con dominio de tromboespondina
AGE	Productos finales de glicación avanzada (Advanced Glycation End Products)
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ARRIVE	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experiments
BML	Lesiones de la médula ósea (Bone Marrow Lesions)
BPs	Bifosfonatos
BV/TV	Fracción volumétrica ósea
CACT	Comprensión cíclica del cartílago articular tibial
CBD	Cannabidiol
cCg.Th	Grosor del cartílago calcificado
CFM	Cóndilo femoral medial
CFL	Cóndilo femoral lateral
Cg.Th	Grosor total del cartílago
CONT	Grupo control tratado con placebo
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
Coll-II	Colágeno tipo II
COX	Ciclooxigenasa
CS	Condrotín sulfato
CTX-II	Telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo II
DE	Desviación estándar
DMOADs	Fármacos modificadores de la enfermedad osteoartítica (Disease Modifying Osteoarthritis Drugs)
EPIC-μCT	Equilibrium partitioning of an ionic contrast agent based micro-computed tomography
FI	Índice de fibrilación
GH	Glucosamina hidrocloreuro
GS	Glucosamina sulfato
HA	Ácido hialurónico
IA	Intraarticular
IATPF	Fractura intraarticular de la meseta tibial
IL	Interleuquina
KS	Queratán sulfato

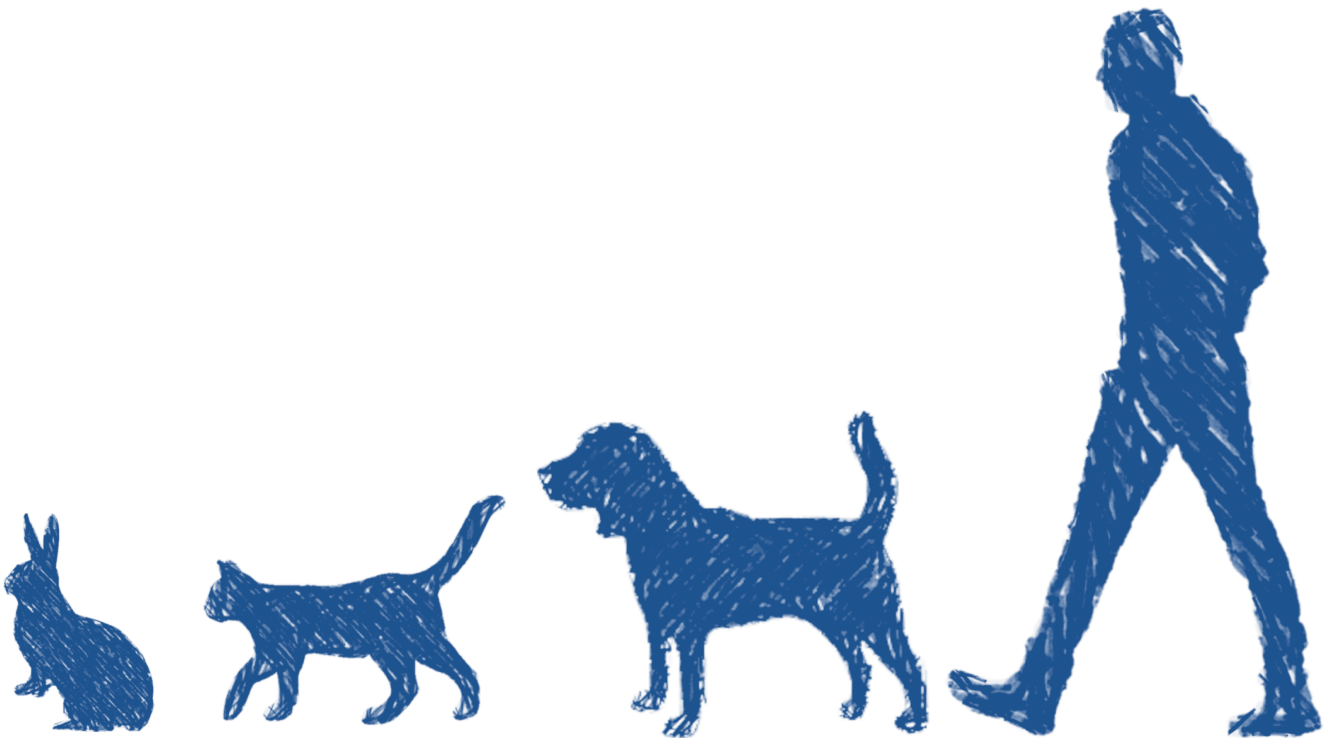
MCLT	Sección del ligamento colateral medial
MIA	Ácido monoyodoacético
Micro-CT	Microtomografía computerizada
mAb	Anticuerpo monoclonal
MMP	Metaloproteasa
MMX	Meniscectomía medial
MTM	Meseta tibial medial
MTL	Meseta tibial lateral
MSC	Células madre mesenquimales
nCg.Th	Grosor del cartílago no calcificado
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis
OARSI	Sociedad Internacional de Investigación de la Osteoartritis (Osteoarthritis Research Society International)
PCLT	Sección del ligamento cruzado posterior
PG	Prostaglandina
PRGF	Plasma rico en factores de crecimiento
PRP	Plasma rico en plaquetas
RIS	Risedronato
RM	Resonancia magnética
SHAM	Grupo de cirugía simulada
SB.Th	Grosor del hueso cortical subcondral
SYSADOAs	Fármacos sintomáticos de acción lenta para la osteoartritis (Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis)
Tb.A	Área trabecular
Tb.N	Número de trabecular
Tb.Pf	Patrón óseo trabecular
Tb.Sp	Separación trabecular
Tb.Th	Grosor trabecular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TIMP	Inhibidor de tejido de MMP
TNF-α	Factor de necrosis tumoral - α
TV	Volumen total
vBMD	Densidad mineral ósea volumétrica
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VOI	Volumen de interés

RESUMEN/RESUMO/SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	11
1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	11
2 LA OSTEOARTRITIS EN MEDICINA VETERINARIA.....	13
2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA.....	13
2.2 ETIOPATOGENIA Y CLASIFICACIÓN.....	15
2.3 EL DOLOR ASOCIADO A LA OSTEOARTRITIS EN LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA: IMPLICACIONES Y REPERCUSIÓN	16
3 PATOGENIA DE LA OSTEOARTRITIS.....	18
3.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOARTRITIS	18
3.2 PRINCIPALES ESTRUCTURAS ARTICULARES Y SU PAPEL EN LA OSTEOARTRITIS	19
3.2.1 El cartílago articular en la osteoartritis, metabolismo y propiedades biomecánicas.....	19
3.2.2 El rol del hueso subcondral en la patogenia de la osteoartritis.....	22
3.2.3 La membrana sinovial en la patofisiología y desarrollo de los signos clínicos de la osteoartritis	23
4 LOS MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE LA OSTEOARTRITIS.....	25
4.1 TIPOS DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA OSTEOARTRITIS...26	
4.2 EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITIS.....	30
4.3 DESAFÍOS EN LOS MODELOS ANIMALES ACTUALES.....	31
5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN EN ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE OSTEOARTRITIS.....	32
5.1 HISTOLOGÍA.....	33
5.2 TÉCNICAS DE IMAGEN	34
5.3 BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS	36
6 MANEJO FARMACOLÓGICO DE LA OSTEOARTRITIS EN MEDICINA VETERINARIA.....	38

6.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS	40
6.1.1 Antiinflamatorios no esteroideos con acción inhibidora de la ciclooxigenasa	40
6.1.2 Antiinflamatorios no esteroideos de la clase piprant: gapiprant.....	42
6.2 CORTICOESTEROIDES	43
6.3 ANALGÉSICOS	45
6.3.1 Paracetamol.....	45
6.3.2 Tramadol	46
6.3.3 Amantadina	47
6.3.4 Gabapentina	48
6.4 FÁRMACOS DE ACCIÓN SINTOMÁTICA LENTA.....	48
6.4.1 Glucosamina.....	49
6.4.2 Condroitín sulfato.....	50
6.4.3 Ácido hialurónico.....	51
6.5 BIFOSFONATOS.....	52
6.5.1 Risedronato.....	54
6.6 DERIVADOS CANNABINOIDES	55
6.7 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN OSTEOARTRITIS	56
6.7.1 Plasma rico en plaquetas.....	57
6.7.2 Células madre mesenquimales	58
6.7.3 Anticuerpos monoclonales anti-factor de crecimiento nervioso.....	59
OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. MODELO ANIMAL Y CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	67
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	67
3. TRATAMIENTOS	68

4. NECROPSIA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	69
5. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS	70
5.1 MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA.....	70
5.1.1 Formación de osteofitos.....	70
5.1.2 Microestructura del hueso trabecular	71
5.2 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA.....	71
5.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	72
5.3.1 Histología cualitativa.....	72
5.3.2 Histología cuantitativa.....	74
6. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	75
CAPÍTULO I	79
CAPÍTULO II.....	95
CAPÍTULO III.....	113
CAPÍTULO IV	131
CAPÍTULO V.....	155
DISCUSIÓN GENERAL	169
CONCLUSIONS.....	191
BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXOS	225

RESUMEN
RESUMO
SUMMARY



RESUMEN

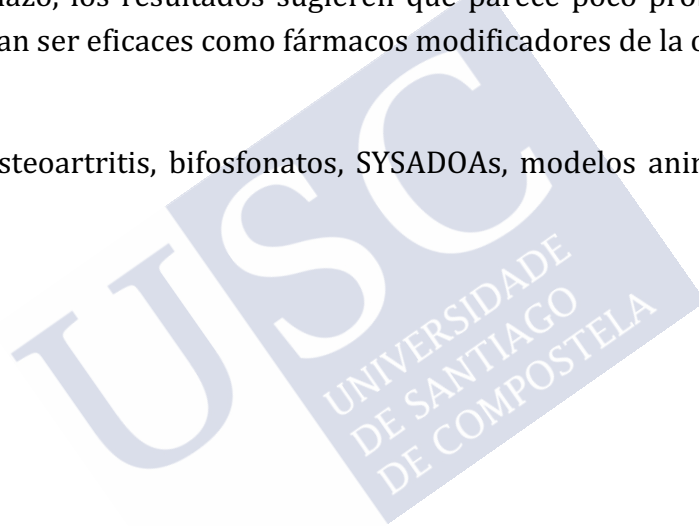
La osteoartritis es la enfermedad articular degenerativa más frecuente en el hombre y en los animales. Se trata de una compleja patología crónica que afecta a las articulaciones sinoviales causando molestia, dolor e incapacidad funcional y que se caracteriza, principalmente, por la destrucción progresiva del cartílago articular, la alteración del hueso subcondral y la inflamación de la membrana sinovial. El tratamiento de la osteoartritis, tanto en medicina humana como veterinaria, continúa siendo un reto en el ámbito de la investigación, al no disponer de fármacos aprobados capaces de modificar el desarrollo de la enfermedad. Los fármacos sintomáticos de acción lenta y los bifosfonatos constituyen algunos de los grupos terapéuticos que han suscitado mayor interés en los últimos años. Estos fármacos han demostrado presentar efectos analgésicos y antiinflamatorios tanto en estudios clínicos como preclínicos. Sin embargo, sus efectos estructurales a nivel de la articulación sinovial todavía no se han esclarecido y su eficacia continúa siendo dudosa. Además, existe una clara falta de evidencia científica evaluando sus efectos a largo plazo. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento vía oral de un bifosfonato y de una combinación de fármacos de acción lenta en los diferentes tejidos articulares de un modelo experimental de osteoartritis en conejo. Para ello se realizó la evaluación morfológica macroscópica, la evaluación histológica cualitativa y cuantitativa y el análisis microtomográfico. Adicionalmente, se llevaron a cabo dos revisiones sistemáticas de la literatura científica actual, en las que se analizó la eficacia de estos fármacos en estudios preclínicos con modelos animales con objeto de intentar clarificar su efectividad como posibles fármacos modificadores de la enfermedad.

En el análisis de las publicaciones científicas incluidas en las revisiones sistemáticas, se observó que la administración de bifosfonatos parece mostrar una conservación positiva del hueso subcondral y una menor alteración de los biomarcadores de osteoartritis. Sin embargo, no parece suprimir el desarrollo de osteofitos y su efecto condroprotector es muy variable entre los estudios. En cuanto a la administración de fármacos de acción lenta, parecen proporcionar efectos condroprotectores y menor respuesta bioquímica inflamatoria en aproximadamente la mitad de los estudios. Con respecto al resto de componentes de la articulación sinovial, no parecen ser capaces

de suprimir los cambios a nivel del hueso subcondral, la inflamación sinovial ni la formación de osteofitos, aunque se precisan más estudios que evalúen sus efectos a estos niveles. En líneas generales, ambos grupos farmacológicos parecen presentar mejores respuestas terapéuticas con administraciones tempranas, con la selección de dosis farmacológicas altas y con la combinación de terapias.

En cuanto a los efectos de los fármacos evaluados en nuestro estudio experimental, los resultados del análisis macroscópico e histológico mostraron que la administración de los tratamientos a largo plazo no logró disminuir el daño articular. Sin embargo, se observó un ligero efecto antiinflamatorio a nivel de la membrana sinovial. En relación al análisis cuantitativo de los cambios determinados a nivel del hueso subcondral, ninguno de los grupos farmacológicos logró prevenir el desarrollo de osteofitos ni la pérdida de hueso subcondral trabecular. En ausencia de más estudios a largo plazo, los resultados sugieren que parece poco probable que estos tratamientos puedan ser eficaces como fármacos modificadores de la osteoartritis.

Palabras clave: osteoartritis, bifosfonatos, SYSADOAs, modelos animales, cartílago, hueso subcondral.



RESUMO

A osteoartrite é a enfermidade articular dexenerativa máis frecuente no home e nos animais. Trátase dunha complexa patoloxía crónica que afecta ás articulacións sinoviais causando molestia, dor e incapacidade funcional e que se caracteriza, principalmente, pola destrución progresiva da cartilaxe articular, a alteración do óso subcondral e a inflamación da membrana sinovial. O tratamento da osteoartrite, tanto en medicina humana como veterinaria, continúa sendo un reto no ámbito da investigación, ao non dispoñer de fármacos aprobados capaces de modificar o desenvolvemento da enfermidade. Os fármacos sintomáticos de acción lenta e os bifosfonatos constitúen algúns dos grupos terapéuticos que suscitaron maior interese nos últimos anos. Estes fármacos demostraron presentar efectos analxésicos e antiinflamatorios tanto en estudos clínicos como preclínicos. Con todo, os seus efectos estruturais a nivel da articulación sinovial aínda non se esclareceron e a súa eficacia continúa sendo dubidosa. Ademais, existe unha clara falta de evidencia científica avaliando os seus efectos a longo prazo. O obxectivo principal desta tese doutoral foi avaliar o efecto a longo prazo do tratamento vía oral dun bifosfonato e dunha combinación de fármacos de acción lenta nos diferentes tecidos articulares dun modelo experimental de osteoartrite en coello. Para iso realizouse a avaliación morfolóxica macroscópica, a avaliación histolóxica cualitativa e cuantitativa e a análise microtomográfica. Adicionalmente, leváronse a cabo dúas revisións sistemáticas da literatura científica actual, nas que se analizou a eficacia destes fármacos en estudos preclínicos con modelos animais con obxecto de tentar clarificar a súa efectividade como posibles fármacos modificadores da enfermidade.

Na análise das publicacións científicas incluídas nas revisións sistemáticas, observouse que a administración de bifosfonatos parece amosar unha conservación positiva do óso subcondral e unha menor alteración dos biomarcadores de osteoartrite. Con todo, non parece suprimir o desenvolvemento de osteofitos e o seu efecto condroprotector é moi variable entre os estudos. En canto á administración de fármacos de acción lenta, a súa administración parece proporcionar efectos condroprotectores e menor resposta bioquímica inflamatoria en aproximadamente a metade dos estudos. Con respecto ao resto dos compoñentes da articulación sinovial, non parecen ser capaces de suprimir os cambios a nivel do óso subcondral, a inflamación sinovial nin a formación de osteofitos, aínda que se precisa de máis

estudos que avalíen os seus efectos a estes niveis. En liñas xerais, ambos os grupos farmacolóxicos parecen presentar mellores respostas terapéuticas con administracións temperás, coa selección de doses farmacolóxicas altas e coa combinación de terapias.

En canto aos efectos dos fármacos avaliados no noso estudo experimental, os resultados da análise macroscópica e histolóxica mostraron que a administración dos tratamentos a longo prazo non logrou diminuír o dano articular. Con todo, observouse un lixeiro efecto antiinflamatorio a nivel da membrana sinovial. En relación á análise cuantitativa dos cambios determinados a nivel do óso subcondral, ningún dos grupos farmacolóxicos logrou previr o desenvolvemento de osteofitos nin a perda de óso subcondral trabecular. En ausencia de máis estudos a longo prazo, os resultados suxiren que parece pouco probable que estes tratamentos poidan ser eficaces como fármacos modificadores da osteoartrite.

Palabras chave: osteoartrite, bifosfonatos, SYSADOAs, modelos animais, cartilaxe, óso subcondral.



SUMMARY

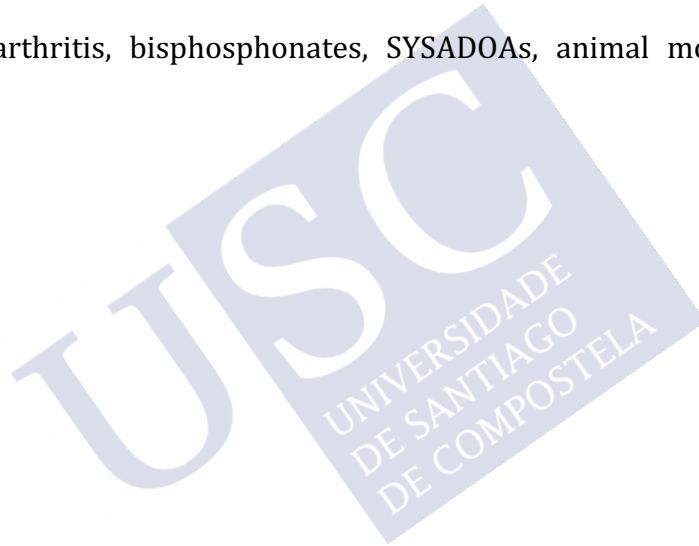
Osteoarthritis is the most common degenerative joint disease in humans and animals. It is a complex chronic pathology that affects the synovial joints causing discomfort, pain and functional disability and is mainly characterised by progressive destruction of the articular cartilage, disruption of the subchondral bone and inflammation of the synovial membrane. The treatment of osteoarthritis, both in human and veterinary medicine, remains a challenge in the field of research, as there are no approved drugs capable of modifying the development of the disease. Slow-acting symptomatic drugs and bisphosphonates are among the therapeutic groups that have attracted most interest in recent years. These drugs have been shown to have analgesic and anti-inflammatory effects in both clinical and preclinical studies. However, their structural effects at the synovial joint level have not yet been elucidated and their efficacy remains questionable. Furthermore, there is a clear lack of scientific evidence evaluating its long-term effects. The main objective of this doctoral thesis was to evaluate the long-term effect of oral treatment with a bisphosphonate and a combination of slow-acting drugs on the different joint tissues in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. For that purpose, macroscopic morphological evaluation, qualitative and quantitative histological evaluation and microtomographic analysis were performed. Additionally, two systematic reviews of the current scientific literature were carried out, analysing the efficacy of these drugs in preclinical studies with animal models in an attempt to clarify their effectiveness as potential disease-modifying drugs.

In the analysis of the scientific publications included in the systematic reviews, it was observed that the administration of bisphosphonates seems to show a positive preservation of subchondral bone and less osteoarthritis biomarkers alteration. However, it did not appear to suppress the development of osteophytes and its chondroprotective effect is highly variable between studies. As for the administration of slow-acting drugs, their administration seems to provide chondroprotective effects and lower inflammatory biochemical response in about half of the studies. In regard to the other components of the synovial joint, they did not appear able to suppress subchondral bone changes, synovial inflammation or osteophyte formation, although more studies are required to assess their effects on such levels. Overall, both pharmacological groups appeared to show better therapeutic responses with early

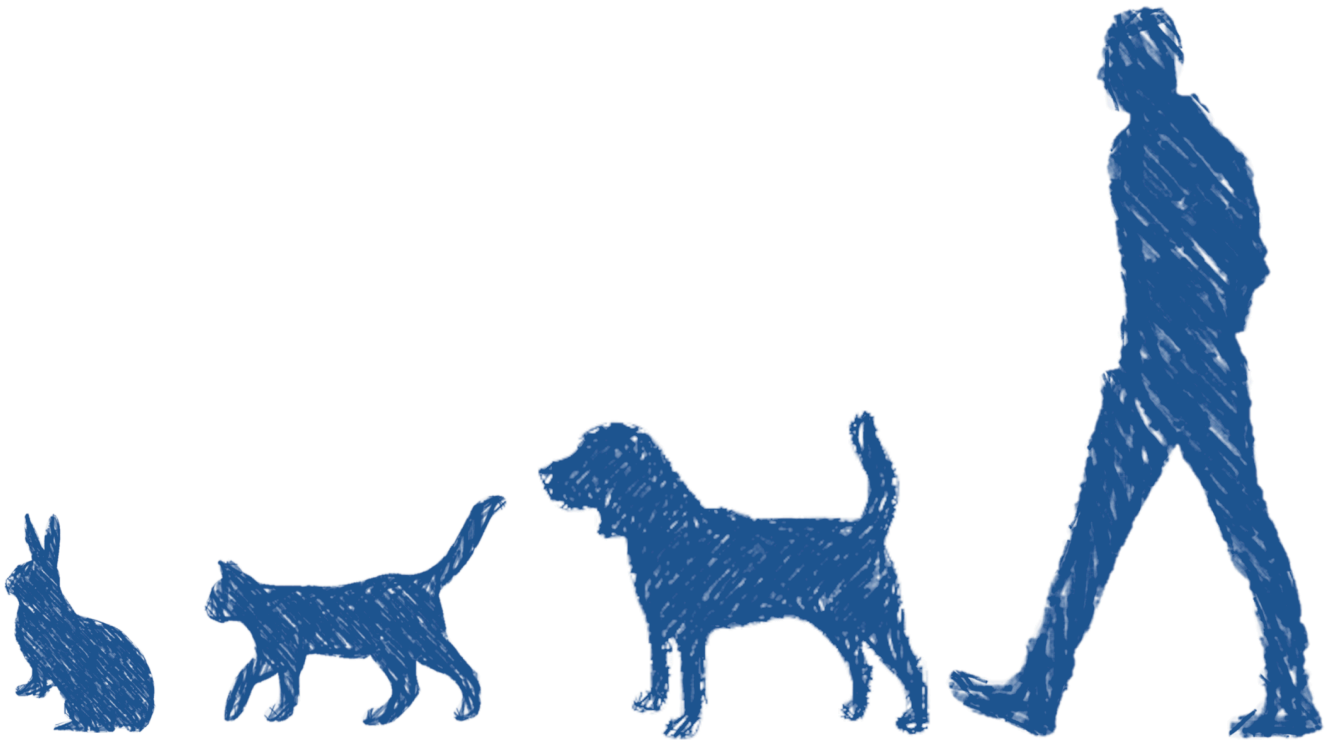
administrations, with the selection of high drug doses as well as several combined therapies.

Concerning the effects of the drugs investigated in our experimental study, the results of the macroscopic and histological analysis showed that long-term administration of the treatments failed to reduce the joint damage. However, a slight anti-inflammatory effect was observed in the synovial membrane. In relation to the quantitative analysis of the changes determined in the subchondral bone, none of the pharmacological groups were able to prevent the development of osteophytes or the loss of the trabecular subchondral bone. In the absence of further long-term studies, the results suggest it seems unlikely that these treatments could be effective as osteoarthritis-modifying drugs.

Keywords: osteoarthritis, bisphosphonates, SYSADOAs, animal models, cartilage, subchondral bone.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La osteoartritis (OA) o enfermedad degenerativa articular es una compleja patología crónica y progresiva, muy frecuente tanto en medicina humana como veterinaria, que afecta a las articulaciones sinoviales causando molestia, dolor, e incapacidad funcional. Morfológicamente, esta enfermedad se caracteriza principalmente por la presencia de un progresivo deterioro del cartílago articular, esclerosis del hueso subcondral, inflamación de la membrana sinovial y formación de osteofitos (Felson y Neogi, 2004; Karsdal et al., 2008).

La OA ha sido considerada durante muchos años una enfermedad degenerativa asociada a la edad y el desgaste articular. Con el progreso de la biología molecular, en la década de los noventa, este paradigma fue profundamente modificado. Durante esta época, se descubre la participación y presencia de muchos mediadores inflamatorios como prostaglandinas (PGs) y citoquinas que favorecen la producción de metaloproteasas (MMPs) de matriz por parte de los condrocitos. Todo ello, conduce a la formulación de la teoría “inflamatoria”. Sin embargo, tuvieron que pasar varios años para que la sinovitis fuera aceptada como una de las características cruciales en la patofisiología de la enfermedad. Asimismo, se ha investigado el papel fundamental del hueso subcondral como elemento implicado en la degradación del cartílago articular, así como fuente de producción de elementos inflamatorios. Actualmente, se considera a la OA una enfermedad realmente compleja, con participación de mediadores inflamatorios a nivel de los 3 elementos estructurales principales de la articulación sinovial: cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial (Loeser et al., 2012; Berenbaum, 2013). Sin embargo, a día de hoy todavía no se han esclarecido todos los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, especialmente en estadios iniciales. Esto, por su parte, ha condicionado de manera negativa el desarrollo de herramientas específicas de diagnóstico temprano y de terapias capaces de modificar el desarrollo de la enfermedad (McCoy, 2015).

El tratamiento de la OA, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, continúa siendo un reto en el ámbito de la investigación. En la actualidad, no existen

fármacos modificadores de la enfermedad (DMOADs) aprobados para su tratamiento en la OA, siendo los analgésicos y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) las principales opciones terapéuticas disponibles hasta el momento (He et al., 2020). Estos fármacos producen un alivio rápido y efectivo de los síntomas. Sin embargo, su administración a largo plazo se ha asociado a la aparición de múltiples efectos secundarios (Apostu et al., 2019). El desarrollo de los fármacos sintomáticos de acción lenta (SYSADOAs) como posibles opciones terapéuticas en el manejo de la OA, supuso una gran esperanza en el ámbito de la investigación. Dentro de este grupo de fármacos, los precursores de la matriz del cartílago, comúnmente llamados condroprotectores, como la glucosamina, el condroitín sulfato (CS) y el ácido hialurónico (HA) han demostrado efectos clínicos y preclínicos positivos en el manejo de la OA en el hombre y en los animales. Su administración se ha relacionado con una mejoría de la sintomatología clínica de los pacientes, como la reducción del dolor asociado a OA y un aumento de la funcionalidad articular (Henrotin et al., 2005; Huskisson, 2008; Comblain et al., 2016). Además, algunos estudios preclínicos han evidenciado que el tratamiento con condroprotectores contribuye a la disminución del daño en el cartílago y demás estructuras sinoviales, presentando también efectos antiinflamatorios a nivel articular (Wen et al., 2010; Terencio et al., 2016). Por el contrario, otros autores refieren que su administración no parece mejorar el daño estructural en la articulación sinovial (Panahifar et al., 2014; Roman-Blas et al., 2017). La heterogeneidad de resultados observada, así como la falta de estudios experimentales a largo plazo, dificulta su evidencia científica y hoy en día, su recomendación para el tratamiento de la OA es controvertida. Por otro lado, los bifosfonatos constituyen otro de los grandes grupos de fármacos propuestos para el tratamiento de la OA en estadios iniciales, por su posible efecto inhibitorio a nivel de la remodelación del hueso subcondral y consecuente descenso del daño a nivel del cartílago articular (Karsdal et al., 2014). Aunque algunos artículos científicos han evidenciado resultados prometedores, su eficacia continúa siendo dudosa. Además, las diferencias observadas entre los resultados preclínicos y los ensayos clínicos generan mayor controversia en cuanto a su posible uso como DMOADs (Eriksen et al., 2020).

Los modelos animales experimentales en la OA juegan un papel fundamental en la evaluación de la eficacia terapéutica de numerosos fármacos, al permitirnos evaluar de forma directa el efecto de la administración de los tratamientos sobre el tejido articular a lo largo de las diferentes fases de la enfermedad (Kuyinu et al., 2016). En este sentido, el efecto de los condroprotectores y de los bifosfonatos ha sido ampliamente investigado en numerosos modelos animales. Sin embargo, en la actualidad su uso como posibles estrategias terapéuticas en el manejo de la OA sigue generando discusión en la comunidad científica. Debemos tener en cuenta que, en los

métodos de evaluación histológica, la subjetividad y la posibilidad de variaciones intra-e inter-observador son muy elevadas, lo que podría justificar algunas de las discrepancias observadas entre estudios (Pastoureau et al., 2010). Asimismo, al tratarse de fármacos de inicio de acción lento, se precisa de estudios prolongados en el tiempo que permitan clarificar la funcionalidad de estos tratamientos. A todo esto debemos sumar el posible “efecto placebo”, descrito en medicina humana pero también en medicina veterinaria, pudiendo atribuir a este efecto algunas de las respuestas beneficiosas observadas en ensayos clínicos tras la administración de los tratamientos (KuKanich, 2013). Todas estas circunstancias hacen que sea fundamental el desarrollo de estudios preclínicos a largo plazo que evalúen de manera objetiva, reproducible y fiable, el efecto terapéutico de estos fármacos en la patología osteoartítica.

2 LA OSTEOARTRITIS EN MEDICINA VETERINARIA

2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA

La OA es la patología articular crónica degenerativa más frecuente en personas y animales y su manejo constituye un reto en investigación biomédica. En medicina humana, el impacto físico y económico de esta enfermedad musculoesquelética es enorme, afectando aproximadamente al 15% de la población global y a más del 50% de la población alrededor de los 60 años de edad (Johnson y Hunter, 2014; Nelson, 2018). Además, es una de las principales causas de discapacidad en el mundo, en gran parte debido al dolor, que constituye el síntoma principal de esta enfermedad (Neogi, 2013).

En cuanto a la medicina veterinaria, se trata de una enfermedad muy frecuente en los animales de compañía. Sin embargo, actualmente se desconocen los datos epidemiológicos precisos de la prevalencia de la OA en las diferentes especies animales, y los resultados publicados muestran valores contradictorios (Henrotin et al., 2005). La aparición de signos clínicos típicos de la enfermedad, como cojera, dolor y rigidez articular, disminuyen notablemente la calidad de vida de los pacientes afectados (Rychel, 2010). Adicionalmente, el dolor producido en el desarrollo de la enfermedad es frecuentemente mal manejado en los animales; como consecuencia, algunos casos clínicos severos pueden derivar en eutanasias prematuras (Epstein et al., 2015).

En cuanto a los animales de compañía, en la especie canina esta enfermedad es un desorden común que puede afectar a perros de distintas edades y ocasiona claros signos de dolor y cojera (Aragon et al., 2007). Dentro de las principales articulaciones afectadas se incluyen las caderas, las rodillas, los hombros y los codos (Pettitt y

German, 2015). Respecto a su prevalencia, se ha estimado que alrededor del 20% de la población canina podría presentar la enfermedad (Johnston, 1997). Sin embargo, investigaciones posteriores han reportado valores diferentes. En el caso del estudio realizado por Anderson et al. (Anderson et al., 2018) se observaron prevalencias del 2.5% en los centros de atención primaria de Reino Unido. De manera similar, O'Neill et al. (O'Neill et al., 2014), estimaron frecuencias en torno al 6.6% de los casos. Si bien es cierto que la enfermedad puede desarrollarse a cualquier edad, los perros geriátricos parecen mostrar los valores más elevados. En concreto, se ha observado que la edad de diagnóstico más frecuente sería alrededor de los 8 años de edad (Anderson et al., 2018). En general, las razas grandes y algunas razas puras parecen desarrollar de manera más precoz y severa los signos clínicos de OA (Rychel, 2010). Sin embargo, es bastante frecuente que los primeros síntomas de la enfermedad pasen inadvertidos al propietario, por lo que la enfermedad articular normalmente es diagnosticada en estadios tardíos (Anderson et al., 2018).

En relación a la especie felina, también constituye una patología articular muy frecuente, sobre todo en gatos geriátricos, estimándose prevalencias del 61% en gatos alrededor de los 6 años de edad (Slingerland et al., 2011) y hasta del 90% en aquellos gatos de más de 12 años (Hardie et al., 2002). En un estudio reciente, se observó que en el 90.8% de los animales con OA, la enfermedad se presentaba de manera bilateral, de manera que la afectación simétrica parece ser una característica de la OA en felinos (Kimura et al., 2020). Las articulaciones de la cadera, rodilla y el codo son las más frecuentemente afectadas en esta especie (Lascelles, 2010), siendo ésta última la que presenta prevalencias más elevadas en la actualidad (Kimura et al., 2020). Aunque la OA en gatos se ha relacionado con cambios de comportamiento como la disminución de la movilidad y un menor acicalado (Slingerland et al., 2011), es importante destacar que un elevado porcentaje de animales son infradiagnosticados. Esto podría estar relacionado con la ausencia de cojera típica observada en otras especies, la dificultad a la hora de realizar el examen físico, así como la falta de identificación de la enfermedad mediante radiografías por parte de los clínicos (Bennett et al., 2012a). Adicionalmente, el manejo farmacológico en esta especie es realmente complejo, relacionado con una disponibilidad reducida de medicamentos aprobados para su uso en gatos, así como al aumento de los efectos adversos y de las complicaciones asociadas a la administración de los mismos (Bennett et al., 2012b).

Por otro lado, Arzi et al. (Arzi et al., 2012) realizaron un estudio retrospectivo en conejos domésticos observando evidencias radiográficas de OA a partir del año de edad, y prevalencias de la enfermedad en aproximadamente el 50% de los animales mayores de 6 años y >70% en los mayores de 9 años. En cuanto a las articulaciones más afectadas, los valores más altos se determinaron en la rodilla y la cadera.

Finalmente, además de la relación entre la OA y la edad, también se identificó una correlación positiva entre OA y la obesidad, de manera similar a lo observado en el hombre y otras especies animales domésticas.

Dentro de los grandes animales de compañía, la OA es una de las enfermedades más prevalentes e incapacitantes en los caballos de deporte, afectando fundamentalmente a la articulación metacarpofalangiana y ocasionando una cojera crónica y dolorosa, así como, una importante pérdida económica dentro del sector equino (Neundorf et al., 2010). Además, algunos autores han reportado prevalencias notables de OA cervical en caballos de salto. Específicamente, se ha observado la presencia de OA de moderada a severa a nivel de la articulación cervical C6-C7 en el 25% de la población evaluada (Espinosa-Mur et al., 2020).

2.2 ETIOPATOGENIA Y CLASIFICACIÓN

La OA se ha identificado como una enfermedad multifactorial asociada a numerosos factores de riesgo -como pueden ser factores de naturaleza genética, metabólica, bioquímica y biomecánica-, así como a factores relacionados con el paciente -como la edad, la obesidad, el sexo y los niveles hormonales-. En relación a esto, se ha observado un claro aumento de la prevalencia y de la gravedad de la enfermedad en los animales de edad avanzada (Poole et al., 2010). Asimismo, algunos animales han mostrado una importante influencia genética en el desarrollo de la OA, que a su vez puede exacerbarse en función del estilo de vida de cada individuo, observándose una gran asociación con el tipo de dieta y los niveles de actividad física (Anderson et al., 2018). En ese sentido, el efecto de la obesidad sobre el desarrollo de la OA ha sido ampliamente investigado en estudios previos, como el de Smith et al. (Smith et al., 2006), donde se observó que los perros alimentados *ad libitum*, y, por lo tanto, con mayores prevalencias de sobrepeso, tenían más probabilidades de desarrollar OA que aquellos que estaban recibiendo una dieta de ingesta controlada. Sin embargo, otros autores también defienden la posibilidad de que el propio aumento de peso sea secundario al desarrollo de la enfermedad articular, como consecuencia de la reducción de la actividad física del individuo y por lo tanto de su gasto energético (Anderson et al., 2018).

En relación a la influencia del sexo, sabemos que tiene una gran importancia en la patofisiología de muchas enfermedades, incluida la OA. En medicina humana, la incidencia de OA de rodilla, cadera y mano es más alta en mujeres que en hombres, y aumenta notablemente en mujeres menopáusicas (Neogi, 2013). En el caso de la especie canina, se han observado prevalencias más altas de OA en machos en comparación con las hembras, probablemente asociado a cierto efecto protector de

las hormonas sexuales femeninas (Hays et al., 2007). También se observó que los perros esterilizados presentaban mayor probabilidad de desarrollar OA asociada a displasia de cadera, codo y rotura de ligamento cruzado (Anderson et al., 2018). Por todo ello, algunos autores han investigado la influencia de los factores hormonales en el desarrollo de la enfermedad (Boyan et al., 2013). Sin embargo, la evidencia científica en este campo continúa siendo limitada y los resultados son contradictorios. Además, la mayoría de los estudios experimentales que investigan la influencia de estos factores en modelos animales de OA son escasos y utilizan mayoritariamente machos, por lo que existe una marcada falta de evidencia en dilucidar las diferencias específicas de esta patología en relación al sexo y sus mecanismos moleculares (Contartese et al., 2020).

En cuanto a la clasificación de la OA en función de la etiología de la patología, podemos clasificarla en primaria o idiopática y secundaria (Altman et al., 1986).

- La OA primaria es un fenómeno natural en la que se producen cambios degenerativos a nivel articular sin la presencia de otra enfermedad subyacente. Se trata de la forma de presentación más similar a la observada en el hombre y la más habitual en la especie felina, aunque también se han documentado causas congénitas, traumáticas, infecciosas, nutricionales e inmunomediadas en esta especie (Lascelles, 2010).
- La OA secundaria se asocia fundamentalmente a traumatismos, enfermedades congénitas, alteraciones metabólicas, infecciosas y nutricionales. En el perro constituye la forma de presentación más frecuente, observándose fundamentalmente tras el desarrollo de una alteración articular previa, como la rotura del ligamento cruzado craneal o la luxación de rótula. Sin embargo, en la actualidad se desconoce la proporción de perros que desarrollan la OA de manera secundaria a estas u otras condiciones predisponentes (Rychel, 2010).

2.3 EL DOLOR ASOCIADO A LA OSTEOARTRITIS EN LOS ANIMALES DE COMPAÑÍA: IMPLICACIONES Y REPERCUSIÓN

Los efectos negativos relacionados con el dolor crónico asociado a la OA y al deterioro de la movilidad articular dan lugar a una importante disminución de la calidad de vida de los pacientes afectados. Adicionalmente, el dolor crónico puede provocar cambios en el comportamiento de los animales, lo que supone un importante impacto emocional para los propietarios, así como un gasto económico considerable (Mathews et al., 2015; Belshaw et al., 2020). En algunas ocasiones, los efectos de esta enfermedad sobre la calidad de vida de las mascotas son tan acusados que algunos propietarios deciden llevar a cabo la eutanasia prematura del animal (Rychel, 2010).

Por el contrario, algunas veces el dolor crónico puede ser infradiagnosticado, asociando las alteraciones del comportamiento y la reducción de la movilidad de los animales a los propios efectos del envejecimiento.

Aunque todavía no conocemos los mecanismos concretos de la fisiopatología del dolor por OA, algunos autores señalan al hueso subcondral como elemento principal implicado en su desarrollo. Teniendo en cuenta que el cartílago articular es una estructura desprovista de vasos sanguíneos y tejido nervioso, se ha determinado que el dolor de esta patología está altamente relacionado con los tejidos periféricos, como el hueso subcondral, la membrana sinovial y los meniscos (Iadarola et al., 2018). Adicionalmente, se ha observado que la inflamación del espacio articular juega un papel fundamental en la patogénesis del dolor crónico. Los factores de crecimiento, citoquinas y demás mediadores inflamatorios participan en la generación del dolor por OA a través de la degradación del cartílago articular y la estimulación de nociceptores locales (Hu et al., 2021). Asimismo, la angiogénesis en la OA podría contribuir al desarrollo del dolor a través del aumento de la inflamación, la alteración de la unión osteocondral y la inervación sensorial inapropiada de las estructuras articulares vulnerables (Mapp y Walsh, 2012). Adicionalmente, la percepción nociceptiva continua por parte del sistema nervioso central puede dar lugar a cambios en el sistema somatosensorial y a la aparición de sensibilidad central en OA, lo que contribuye a la percepción del dolor, siendo esto especialmente frecuente en la especie felina (Guillot et al., 2013). Clínicamente, los pacientes desarrollarán hiperalgesia, es decir, una respuesta de dolor incrementada ante estímulos dolorosos, así como alodinia, que es la aparición del dolor ante estímulos que normalmente no son dolorosos (Mathews et al., 2015). Los efectos del dolor crónico en los pacientes afectados por OA, no solo implican a la articulación afectada, sino que producen un deterioro sistémico a nivel musculoesquelético que contribuye a una mayor alteración de la movilidad. Además, se ha observado que los efectos combinados del dolor articular, la sensibilización central y el deterioro de la actividad funcional podrían tener efectos negativos significativos sobre la calidad del sueño y el estado afectivo de los animales (Knazovicky et al., 2015).

En la actualidad, las opciones de tratamiento para el control del dolor a largo plazo en animales de compañía son realmente limitadas, debido fundamentalmente a la aparición de efectos adversos asociados. Por otra parte, parece que la efectividad de los analgésicos coadyuvantes es bastante impredecible según la especie y las características individuales de cada animal (KuKanich, 2013). Por todo ello, el dolor crónico asociado a la OA continúa siendo una entidad clínica difícil de tratar, existiendo una necesidad urgente de desarrollar tratamientos efectivos que permitan

su administración crónica de forma segura con objeto de mejorar la calidad de vida del paciente y disminuir su incapacidad funcional.

3 PATOGENIA DE LA OSTEOARTRITIS

La patogenia de la OA implica la participación e interacción de todos los tejidos que componen la articulación sinovial, incluyendo los meniscos, ligamentos, tendones y músculos que rodean la articulación (Loeser et al., 2012). Los principales rasgos patológicos que se producen en la OA incluyen la degradación del cartílago articular, el engrosamiento de la placa ósea subcondral, la formación de osteofitos, la inflamación sinovial, la degeneración de ligamentos y la hipertrofia capsular (Carballo et al., 2017).

Aunque inicialmente la OA fue considerada una enfermedad degenerativa asociada al envejecimiento y causada por factores biomecánicos de “desgaste”, posteriormente se descubrió que la mayoría de los casos presentaban una clara disposición multifactorial asociada a diversos factores, como la edad, obesidad, factores genéticos y traumatismos (Loeser et al., 2012). Actualmente, la comunidad científica coincide en aceptar a la OA como un proceso dinámico y complejo que involucra tanto factores mecánicos como inflamatorios y metabólicos (He et al., 2020).

3.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOARTRITIS

A pesar de que la OA se conoce desde hace décadas, los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad siguen generando confusión (Hu et al., 2021). Aunque inicialmente se consideró que la OA era una enfermedad producida por una alteración del cartílago articular, actualmente se sabe que es una enfermedad mucho más compleja en la que juegan un papel fundamental los mediadores inflamatorios liberados a nivel del cartílago, hueso subcondral y membrana sinovial (Berenbaum, 2013).

El inicio de la enfermedad se ha asociado a un desequilibrio entre el proceso de degradación y de reparación del cartílago (Goldring y Marcu, 2009). Sin embargo, la secuencia exacta de los eventos que desencadenan la enfermedad continúa siendo motivo de debate en la comunidad científica. Algunos autores sugieren que las alteraciones biomecánicas pueden ocasionar estrés articular, viéndose afectada tanto la integridad de la matriz extracelular como el metabolismo de los condrocitos. Cuando se produce una pérdida de homeostasis en la articulación, se produce un aumento de liberación de citoquinas proinflamatorias, como interleuquinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF- α), que a su vez favorecen la expresión de

otros factores catabólicos (MMPs, agreganasas, óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) y ciclooxigenasa 2 (COX-2)), que pueden estimular la apoptosis y necrosis de los condrocitos (Maldonado y Nam, 2013). Asimismo, mediante diferentes vías de señalización, se da lugar a la degradación de la matriz extracelular del cartílago lo que conduce a la aparición de fibrilación y erosión de la superficie articular, que puede llegar a la exposición del hueso subcondral. También se observan alteraciones a nivel de la microestructura y composición ósea, así como la presencia de inflamación de la membrana sinovial (Sharma et al., 2013). La pérdida progresiva de la arquitectura estructural del cartílago, junto con un aumento de la actividad de los osteoclastos en el hueso subcondral, favorecen el desarrollo de canales óseos en la placa subcondral que transportan mediadores inflamatorios y factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que favorece la neovascularización del cartílago (Mapp y Walsh, 2012). Adicionalmente, los condrocitos se hipertrofian y comienzan a depositar calcio en la matriz extracelular, dando lugar a la osificación endocondral del cartílago calcificado (Van der Kraan y Van den Berg, 2012). Todo ello contribuye al desarrollo de la esclerosis de la placa ósea subcondral, así como a otras alteraciones que son resultado de la remodelación ósea anormal (Felson y Neogi, 2004; Karsdal et al., 2008).

Adicionalmente, desde un punto de vista bioquímico se han investigado otros factores que puedan contribuir a la fisiopatología de la OA. En el caso del envejecimiento celular, se ha observado que en las personas de edad avanzada, se produce un aumento de los productos finales de glicación avanzada (AGE) en el cartílago articular. Estos AGE se unen a los condrocitos y favorecen la liberación de citoquinas proinflamatorias y de VEGF, lo que finalmente conduce a la degeneración del cartílago articular (DeGroot et al., 2004).

3.2 PRINCIPALES ESTRUCTURAS ARTICULARES Y SU PAPEL EN LA OSTEOARTRITIS

3.2.1 *El cartílago articular en la osteoartritis, metabolismo y propiedades biomecánicas*

El cartílago articular es un tipo de cartílago hialino especializado en el que destaca la ausencia de vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y tejido linfoide (He et al., 2020). En condiciones fisiológicas, su aspecto macroscópico es blanco, liso y brillante. Está compuesto principalmente, por dos elementos: la matriz extracelular y unas células altamente especializadas conocidas como condrocitos. La matriz extracelular es la responsable de las propiedades mecánicas del cartílago, transmitiendo y distribuyendo las cargas ejercidas sobre la articulación. Representa

aproximadamente el 95% de su estructura y está compuesta principalmente por agua, colágeno tipo II (Coll-II) y otros tipos de colágeno (VI, IX, X y XI), proteoglicanos (principalmente agrecanos) y glicoproteínas (Goldring, 2012; Carballo et al., 2017). Los condrocitos son unas células con baja actividad metabólica capaces de sobrevivir en condiciones hipóxicas y que juegan un papel clave en el metabolismo del cartílago, sintetizando colágeno, proteoglicanos y proteínas no colagenasas que conformarán la matriz extracelular. Cuando se localizan superficialmente, los condrocitos producen lubricina, proteína esencial para disminuir la fricción ocasionada en el movimiento articular (Goldring, 2012). La patogénesis de la OA parece estar fuertemente relacionada con cambios en la actividad de los condrocitos como los procesos de hipertrofia y apoptosis, y la producción de sustancias pro-inflamatorias (He et al., 2020).

El cartílago articular se divide en varias zonas: superficial, intermedia, profunda y calcificada, que a su vez presentan diferente composición de la matriz y la orientación celular así como diferente morfología y propiedades funcionales de los condrocitos (Bhosale y Richardson, 2008):

- La zona superficial o tangencial es la más delgada de todas las capas del cartílago. Está compuesta por condrocitos de pequeño tamaño que presentan una forma aplanada, se disponen paralelamente a la superficie articular y se encuentran rodeados de fibras de colágeno. Esta zona del cartílago, está cubierta por una fina película de líquido sinovial conocida como “lámina splendens” o “lubricina”, que juega un papel fundamental en la lubricación articular.
- La zona intermedia o de transición está formada por condrocitos predominantemente redondeados, distribuidos aleatoriamente e incrustados en una abundante matriz extracelular. Presenta una gran cantidad de proteoglicanos y agrecanos.
- La zona profunda o radial presenta condrocitos de forma redondeada dispuestos de manera perpendicular a la superficie articular. En cuanto al contenido de la matriz, en esta zona las fibras de colágeno presentan el mayor diámetro y se observa una mayor concentración de proteoglicanos que en el resto de las zonas. Sin embargo, su densidad celular es la más baja.
- La zona de cartílago calcificado corresponde a la capa más profunda del cartílago situado adyacente al hueso subcondral y separado de la zona profunda del cartílago no calcificado por el “tidemark” o línea basófila altamente calcificada. El cartílago calcificado contiene un pequeño volumen de células incrustadas en una matriz calcificada. Presenta una actividad metabólica muy baja y condrocitos hipertróficos capaces de sintetizar colágeno tipo X, responsable de la integridad articular y de favorecer la amortiguación mecánica junto con el hueso subcondral.

Dado que los condrocitos son el único componente celular del cartílago articular adulto, una gran parte de la investigación de la OA se ha centrado en el papel de estas células en la patogenia de la enfermedad. Los condrocitos son responsables de la homeostasis celular, y son capaces de responder a fuerzas mecánicas y cambios estructurales en la matriz del cartílago circundante (Goldring y Goldring, 2010). Sin embargo, su actividad metabólica puede verse afectada por múltiples factores bioquímicos y mecánicos. Los condrocitos sufren mayor estrés y alteraciones durante el envejecimiento, lo que ocasiona alteraciones en el contenido, composición y organización estructural de la matriz extracelular (Aigner et al., 2007). Se ha observado que en estadios iniciales de la enfermedad, se produce un aumento transitorio de la proliferación de condrocitos y de su actividad anabólica (Sandell, 2007). Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, se produce un aumento de la actividad catabólica asociada a una mayor producción de enzimas proteolíticas y colagenasas, ocasionando la pérdida gradual de proteoglicanos en la superficie del cartílago y la ruptura de las fibras de colágeno tipo II (Goldring y Goldring, 2010). Asimismo, se ha observado que los daños en la superficie articular aumentan la permeabilidad del cartílago favoreciendo el paso de agua al interior de la matriz. Esta tumefacción del cartílago disminuye su elasticidad, lo que, a su vez, favorece una mayor degeneración del mismo (Bhosale y Richardson, 2008).

Ante perturbaciones en la biomecánica articular, los condrocitos pueden responder mediante el aumento de su actividad anabólica o aumentando la producción de citoquinas inflamatorias. Estudios *in vitro* han demostrado que la compresión estática estimula la pérdida de proteoglicanos, daña la red de colágeno y reduce la síntesis de proteínas de la matriz del cartílago, mientras que la compresión dinámica favorece la actividad sintética de la matriz extracelular (Guilak et al., 2004). En relación a esto, se ha observado que el movimiento articular y la presencia de cargas dinámicas favorecen el correcto mantenimiento del metabolismo y estructura del cartílago, mientras que la inactividad potencia la degradación del mismo (Carrillo, 2020). Aunque es cierto que los condrocitos pueden modular su estado funcional en respuesta a la carga articular, su capacidad para reparar y modificar la matriz extracelular circundante es realmente limitada (Goldring y Goldring, 2010). Asimismo, la capacidad de reparación del cartílago está influenciada por diversos factores, como la vascularización del tejido, el tamaño y profundidad del defecto, el trauma repetitivo y la edad (Bhosale y Richardson, 2008). En la actualidad, aunque varios tratamientos han mostrado resultados prometedores en esta área, ninguno de ellos ha logrado demostrar la capacidad de regenerar un neocartílago con la misma estructura y funciones que el cartílago nativo (Huang et al., 2018b).

3.2.2 El rol del hueso subcondral en la patogenia de la osteoartritis

Aunque actualmente sabemos que esta enfermedad involucra a todos los tejidos de la articulación sinovial y no solo al cartílago articular, algunos autores han observado que tanto la capa articular como el hueso periarticular parecen mostrar el impacto más severo de la enfermedad (Wang et al., 2011). El hueso subcondral constituye la estructura encargada de dar soporte al cartílago articular, distribuir la carga mecánica y aportar nutrición a las capas profundas del cartílago, por lo que pequeños cambios en el microambiente óseo podrían afectar al metabolismo del cartílago de manera directa o indirecta (Hu et al., 2021). El hueso subcondral está compuesto fundamentalmente por colágeno tipo I y se divide anatómicamente en dos zonas diferenciadas: la placa ósea subcondral y el hueso trabecular subcondral (Burr, 2004). La placa ósea subcondral esta constituida por el cartílago calcificado y el hueso subcondral cortical. Se trata de una placa calcificada y compacta que presenta poros a través de los cuales discurren múltiples vasos y fibras nerviosas. Por su parte, el hueso trabecular presenta una estructura ósea esponjosa y experimenta una remodelación ósea continua (Hu et al., 2021). La unidad osteocondral articular incluye por lo tanto al cartílago no calcificado, el cartílago calcificado, el hueso cortical y el hueso trabecular subcondral (Goldring y Goldring, 2016).

En cuanto a los principales cambios observados a nivel óseo articular durante la progresión de la enfermedad se incluyen, entre otros, el aumento del recambio óseo, la modificación estructural del hueso trabecular, la esclerosis de la placa ósea subcondral y la formación de osteofitos y quistes óseos subcondrales (Felson y Neogi, 2004; Karsdal et al., 2008). Concretamente, se ha sugerido que el engrosamiento de la placa ósea, podría estar altamente relacionado con la progresión de la artrosis (Carlson et al., 1996). Por otro lado, la aparición de lesiones de la médula ósea (BML) se han asociado a la presencia de daño articular, especialmente en la meseta tibial, por lo que su detección en el diagnóstico de la enfermedad parece informar sobre el estado degenerativo de la unidad osteocondral al correlacionarse con la progresión y gravedad de la OA (Muratovic et al., 2019).

Durante el desarrollo de la OA, tanto la arquitectura como las propiedades del hueso periarticular se modifican a través de los procesos de remodelación. En este sentido, aunque sabemos que la renovación ósea del hueso subcondral es dependiente de la actividad osteoclástica, el rol específico de los osteoclastos en la patogénesis de la OA todavía requiere mucha atención dentro de la comunidad científica (Karsdal et al., 2008). Es posible que los cambios en el contenido mineral y en el grosor del cartílago calcificado jueguen un papel más importante en la patogenia de la OA de lo que se cree (Felson y Neogi, 2004). En los últimos años se ha sugerido que la integridad del cartílago articular podría estar altamente relacionada con el estado y calidad del

hueso subcondral (Felson y Neogi, 2004; Karsdal et al., 2008). Actualmente, se considera que el hueso subcondral juega un papel fundamental en el inicio y progresión de la enfermedad articular (Goldring y Goldring, 2010; Castañeda et al., 2012). En relación con esto, algunos autores ya han demostrado que existe una fuerte correlación entre la remodelación del hueso subcondral y la degeneración articular del cartílago desde las primeras etapas del desarrollo de la OA (Aho et al., 2017). Sin embargo, la relación exacta que existe entre ambos componentes y otros cambios patológicos todavía no está clara y existe una gran controversia en determinar si los cambios observados a nivel del hueso subcondral preceden, concurren o se desarrollan con posterioridad a la erosión del cartílago (Strassle et al., 2010). Algunas publicaciones actuales ya defienden la hipótesis de que la degeneración del cartílago articular se produce en paralelo a los cambios patológicos determinados a nivel óseo (Finnilä et al., 2017). Por otro lado, recientemente se ha observado que las lesiones óseas subcondrales y la angiogénesis podrían desarrollarse antes que la degeneración del cartílago (Hu et al., 2021).

Por todo ello, parece evidente que los cambios observados a nivel del hueso subcondral en la patofisiología de la OA no son meras manifestaciones secundarias de la enfermedad, sino que son componentes activos de la misma. El aumento de la vascularización y la formación de microfisuras en las articulaciones, podría facilitar el paso de moléculas del componente cartilaginoso al hueso y viceversa. Asimismo, la comunicación intercelular entre ambos tejidos, podría regular el comportamiento funcional de los condrocitos y los osteoblastos y alterar la fisiopatología de las articulaciones durante la OA (Sharma et al., 2013).

3.2.3 La membrana sinovial en la patofisiología y desarrollo de los signos clínicos de la osteoartritis

Durante años, la OA era considerada un proceso degenerativo y, por ello, la mayoría de las investigaciones se han concentrado en la evaluación del cartílago articular y en el estudio de los condrocitos. Actualmente, sabemos que existe una actividad inflamatoria a nivel de la membrana y la capsula sinovial que involucran a otros tejidos conectivos, incluyendo el cartílago y el hueso subcondral (Poole et al., 2010). Histopatológicamente, la sinovitis está caracterizada por la presencia del engrosamiento de la membrana sinovial, observándose tanto hipertrofia como hiperplasia, infiltrado de células inflamatorias y angiogénesis. Todo ello a su vez, favorece la producción de mediadores inflamatorios como citoquinas y factores de crecimiento, implicados en la inflamación, el catabolismo y el estrés oxidativo celular. Asimismo, se ha demostrado que la sinovitis se correlaciona con la gravedad y la

progresión de la OA y que constituye la primera causa de dolor en los pacientes afectados por la enfermedad (Ayrál et al., 2005). Además, estos pacientes pueden presentar tumefacción a nivel de la articulación afectada, relacionada con la inflamación intraarticular y la presencia de sinovitis y/o derrame articular (Berenbaum, 2013).

La membrana sinovial es la encargada de producir líquido sinovial, que está compuesto mayormente por lubricina y ácido hialurónico, ambos encargados de la lubricación y nutrición del cartílago. Los sinoviocitos de la membrana sinovial pueden ser de dos tipos: fibroblastos y macrófagos. Los fibroblastos sinoviales son los productores principales del líquido sinovial. En condiciones fisiológicas, los macrófagos sinoviales suelen estar inactivos, pero durante la inflamación de la membrana sinovial se activan (Scanzello y Goldring, 2012). La hipótesis más aceptada sobre el origen de la sinovitis apunta a que está estrechamente relacionada con la degradación del cartílago y los meniscos, que darían lugar al desprendimiento de pequeños fragmentos dentro de la articulación y que, en contacto con la membrana sinovial, serían considerados cuerpos extraños, estimulando la producción de mediadores catabólicos y pro-inflamatorios por parte de los sinoviocitos, como citoquinas, NO, PGE2 y neuropéptidos. Estos mediadores, a su vez, pueden activar a los condrocitos de la superficie articular, lo que conduce a la síntesis de MMPs, que favorecerán la degradación del cartílago articular. Además, los mediadores también pueden favorecer la angiogénesis sinovial y aumentar la síntesis de citoquinas y MMPs por las propias células sinoviales. Todo esta sucesión de acontecimientos se describe como parte de un círculo vicioso que perpetua la OA (Sellam y Berenbaum, 2010). Adicionalmente, se ha sugerido que el tejido sinovial podría contribuir a la remodelación del hueso subcondral observada en la OA, mediante la diferenciación de los macrófagos sinoviales en osteoclastos funcionales (Ogawa et al., 2007).

Las investigaciones actuales coinciden en la importancia de la implicación del componente inflamatorio en el inicio y desarrollo de la OA (Berenbaum, 2013). Todo ello, sitúa a la membrana sinovial en el centro del proceso fisiopatológico de la OA y convierte a la inflamación sinovial en una diana fundamental para el tratamiento de la enfermedad (Henrotin et al., 2014). Aunque en los últimos años la comunidad científica ha realizado importantes avances en esta área, lo cierto es que todavía existen muchas cuestiones en relación a la sinovitis y su papel en el desarrollo de la OA que precisan atención. Consecuentemente, se necesitan nuevas investigaciones experimentales que evalúen las vías de comunicación que se establecen entre el cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial (Sellam y Berenbaum, 2010).

4 LOS MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE LA OSTEOARTRITIS

Se han desarrollado ampliamente numerosos modelos animales con el objetivo de mejorar el conocimiento en la patofisiología y la evolución de la OA (Cope et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha ninguno de ellos ha sido capaz de reproducir al 100% las características patológicas desarrolladas en la enfermedad humana (Brandt, 2002). La OA es un patología muy compleja y heterogénea y, por lo tanto, ningún modelo animal de manera individual es capaz de representar todos los aspectos relacionados con el proceso patológico de la enfermedad (Little y Zaki, 2012). Uno de los desafíos en investigación de la OA radica en seleccionar el modelo más apropiado en función de la pregunta científica que pretendamos resolver, prestando especial atención a las diferencias fisiopatológicas en función de la especie animal, así como a sus características anatómicas e histológicas (McCoy, 2015).

Los modelos animales preclínicos juegan un papel fundamental en la evaluación de la eficacia terapéutica de numerosos fármacos anti-osteoartríticos, al permitirnos evaluar de manera directa los cambios producidos a nivel histológico en las articulaciones afectadas y en diferentes fases de la enfermedad (Poole et al., 2010; Kuyinu et al., 2016). Asimismo, los modelos *in vivo* permiten evaluar síntomas complejos relacionados con la enfermedad como el dolor, los cambios en el patrón de la marcha y los efectos a nivel comportamental (Cope et al., 2019). Sin embargo, también presentan algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora realizar el diseño experimental (Tabla 1) (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b).

Tabla 1. Beneficios y limitaciones del uso de modelos animales para el estudio de la osteoartritis.

Beneficios	Limitaciones
Estudio de la enfermedad en estadios iniciales	No existe un “modelo animal ideal” para el estudio de la OA
Control de las causas y determinantes ambientales	Desarrollo de lesiones similares pero sin reproducir 100% las observadas en la OA clínica
Reproducibilidad (respuestas similares a la misma intervención experimental)	Diferencias en la anatomía y biomecánica de las articulaciones entre las diferentes especies
Desarrollo de modelos genéticos (estudio de la influencia de genes específicos y mecanismos moleculares)	Diferencias en la composición, estructura y procesos de reparación del cartílago entre las diferentes especies
Recolección de muestras tisulares en todas las etapas de la enfermedad	Eficacia de las terapias evaluadas menor en modelos donde el desarrollo de la enfermedad es rápido Dificultad para comparar y evaluar los diferentes estudios debido a diseños con alta variabilidad experimental

Adaptado de Lampropoulou-Adamidou et al. (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b)

Independientemente del modelo animal utilizado, nuestro objetivo en investigación debería perseguir la consecución del equilibrio entre el uso de modelos *in vivo* y *ex vivo*, valorando siempre que sea posible el reemplazo del uso de animales cuando existan opciones alternativas y teniendo en cuenta que los aspectos éticos y el bienestar animal deben priorizar cualquier actuación experimental. La aplicación del “principio de las 3R” debe constituir la base fundamental de cualquier investigación preclínica, de manera que se reduzca el número de animales utilizados y se perfeccionen los protocolos y procedimientos, con objeto de minimizar el sufrimiento animal y maximizar el valor de los resultados (Poole et al., 2010; Little y Zaki, 2012; Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b).

4.1 TIPOS DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA OSTEOARTRITIS

Todos los modelos animales desarrollados en la investigación de la OA presentan ventajas y desventajas que deberemos conocer antes de diseñar el protocolo experimental, seleccionando el modelo más adecuado en función del propósito del estudio (Cope et al., 2019).

En cuanto a las diferentes especies animales disponibles para la investigación de la enfermedad osteoartétrica, las especies de pequeño tamaño, como el ratón, rata, conejo y cobaya, se han utilizado ampliamente en el estudio de la OA debido a su fácil manejo, disponibilidad y bajos costes en comparación con modelos animales más grandes, como caballos, cerdos y perros (Kuyinu et al., 2016). Sin embargo, su menor tamaño dificulta su manipulación quirúrgica y, consecuentemente, la cantidad de tejido disponible para su evaluación posterior también será menor. Asimismo, se han determinado importantes diferencias tanto en la anatomía como en la biomecánica con respecto a las observadas en especies de mayor tamaño y en el hombre (McCoy, 2015). En ese sentido, los modelos animales más grandes como el perro, oveja, cabra y caballo parecen proporcionar datos clínicamente más relevantes que las especies de pequeño tamaño y permiten la realización de múltiples técnicas quirúrgicas y de diagnóstico, como extracciones repetidas de líquido sinovial, realización de biopsias y/o artroscopias. Además, tienen un tiempo de vida media más largo por lo que es posible realizar estudios de manera prolongada. Sin embargo, su mantenimiento y manejo es más costoso y, además, existen mayores consideraciones éticas en torno a su uso como animales de experimentación, especialmente en el caso de perros, caballos y primates no-humanos (Teeple et al., 2013).

En relación al origen de la OA, los modelos de experimentación animal se dividen de manera genérica en dos grandes grupos (Kuyinu et al., 2016; Cope et al., 2019):

- Modelos de inducción de OA, que a su vez se dividen en modelos invasivos (de inducción quirúrgica o química) y modelos de inducción post-traumática no invasiva.
- Modelos espontáneos, que se subcategorizan en modelos naturales o de aparición espontánea y genéticamente modificados.

La clasificación de los principales modelos de OA en función de la etiología de la enfermedad se resume en la Figura 1.

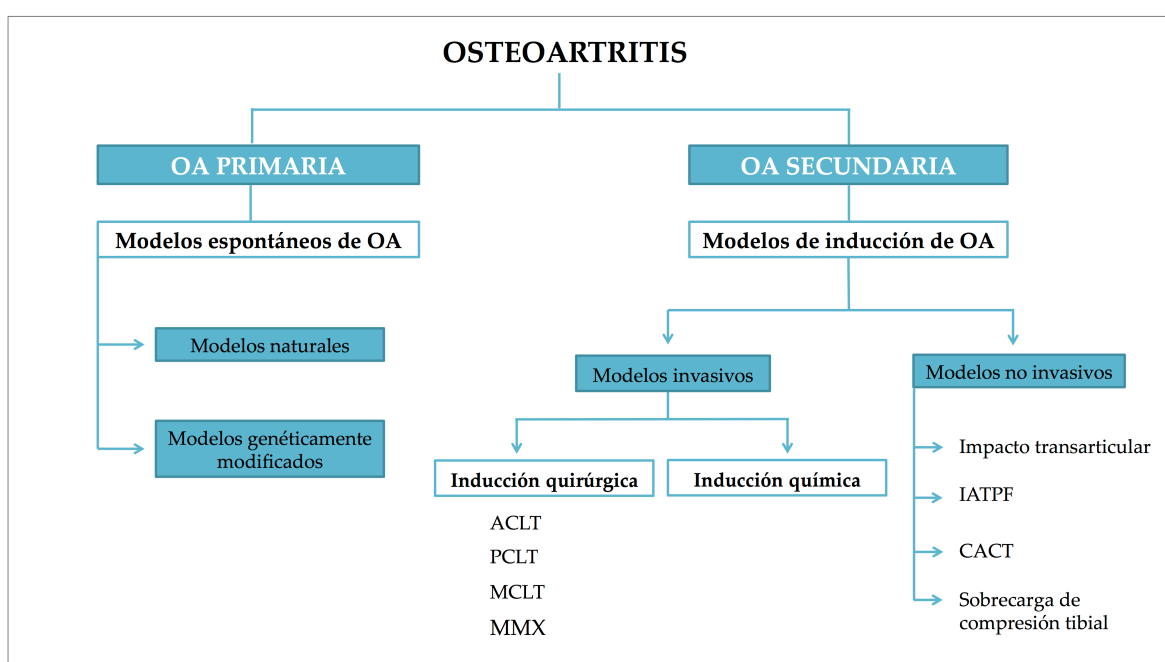


Figura 1. Clasificación de los modelos de osteoartritis. ACLT, sección del ligamento cruzado anterior; CACT, compresión cíclica del cartílago articular tibial; IATPF, fractura intraarticular de la meseta tibial; MCLT, sección del ligamento colateral medial; MMX, menisectomía medial; PCLT, sección del ligamento cruzado posterior.

Los modelos de inducción de la OA han sido estudiados en numerosas especies animales. En cuanto a la localización anatómica de preferencia, la articulación de la rodilla constituye la articulación sinovial más evaluada en estos modelos (Bendele, 2001; McCoy, 2015). Existen algunas excepciones, como el modelo equino, donde también destaca el uso de la articulación metacarpofalángiana, observándose grandes similitudes de ésta con la articulación de la rodilla humana (McIlwraith et al., 2010). Estos modelos, también llamados modelos de desestabilización quirúrgica, persiguen

imitar la artrosis post-traumática observada en el hombre y los animales (Bendele, 2001), basándose en una combinación de inestabilidad articular, cambios en el patrón de la marcha y la presencia de inflamación, con el objeto de inducir cambios osteoartríticos (Kim et al., 2018). Esta inestabilidad a nivel articular ocasiona cambios en el patrón de carga de los animales, lo que se ha asociado al desarrollo de erosiones y alteraciones a nivel articular y óseo de manera rápida y severa (Bendele, 2001). Algunas de las ventajas de los modelos de inducción quirúrgica serían el rápido desarrollo de la enfermedad, su reproducibilidad y menores costes comparado con los modelos espontáneos (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b). Sin embargo, se ha observado una posible menor respuesta terapéutica asociada a una progresión demasiado rápida de la enfermedad, que debe ser tenida en cuenta a la hora del desarrollo del experimento (Bendele, 2001). Además, no se consideran estudios totalmente apropiados para la investigación de la OA primaria, puesto que se inician tras una agresión traumática (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b).

Dentro de las diferentes técnicas de inducción quirúrgica, uno de los primeros modelos desarrollados para inducción de la OA fue el modelo mediante sección del ligamento cruzado anterior (ACLT). En la actualidad, este modelo continúa siendo uno de los más utilizado para el estudio de esta enfermedad (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b). En relación al modelo de meniscectomía parcial, se ha observado que provoca una degeneración más rápida y severa de OA que la ACLT, y en cuanto a su localización, medial o lateral, ésta dependerá de la especie animal seleccionada y su patrón de carga fisiológico (Kuyinu et al., 2016). Otros modelos de inducción quirúrgica de la OA serían la sección del ligamento colateral medial o lateral y la sección del ligamento cruzado posterior, aunque su uso en investigación es menos habitual.

En cuanto a los modelos de inducción química, se basan fundamentalmente en la inyección de un compuesto tóxico o inflamatorio en la articulación de la rodilla. Se trata de modelos fáciles de ejecutar, con costes menores y tasas de infecciones más bajas al tratarse de técnicas menos invasivas que las quirúrgicas. Sin embargo, no permiten evaluar la progresión de la enfermedad (Kim et al., 2018). Además, estos modelos presentan una fisiopatología única no comparable a la observada en la OA espontánea ni en la post-traumática, por lo que se utilizan principalmente para evaluar el mecanismo del dolor en la enfermedad y su respuesta ante determinados fármacos (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b). Algunas de las sustancias administradas más frecuentemente de manera intraarticular son el ácido monoyodoacético (MIA), la papaína y la colagenasa (Kuyinu et al., 2016). En el caso concreto del MIA, se trata de un inhibidor de la glucólisis aerobia que provoca la apoptosis de los condrocitos. Esta agresión química da lugar a una pérdida progresiva

de proteoglicanos y a la atrofia de la matriz extracelular con la consecuente degradación del cartílago articular (Bendele, 2001).

También se han desarrollado modelos de inducción no invasivos. Estos modelos se basan en la utilización de máquinas que producen lesiones articulares por impacto transarticular mecánico o por compresión cíclica o por sobrecarga, pero sin provocar alteración en la integridad de la piel. Además de que el riesgo de infección es mínimo, los resultados son altamente reproducibles y permiten el estudio de la enfermedad en fases tempranas. Sin embargo, la evidencia de su aplicación es mucho menor que en otros modelos de OA, las variaciones en la angulación de la rodilla pueden afectar los resultados del estudio, los equipos necesarios no siempre están disponibles y se necesita personal capacitado para su utilización (Christiansen et al., 2015; Kuyinu et al., 2016). Algunos estudios también han evaluado el modelo de inducción de OA tras ovariectomía. Este modelo ha demostrado ser adecuado en la investigación de la OA humana asociada al climaterio (Kim et al., 2018). Sin embargo, no es capaz de reproducir todos los cambios observados en la OA secundaria, que constituye la forma de presentación más frecuente en la especie canina (Rychel, 2010).

Otro de los grandes grupos de modelos de OA son los modelos de aparición espontánea. Estos modelos han demostrado una progresión más lenta en el desarrollo de la enfermedad, de manera similar a lo observado en la enfermedad primaria, permitiendo, además, el estudio de la progresión de la OA en todas sus fases. Sin embargo, esto da lugar al desarrollo de experimentos más largos y costosos y, además, se ha observado que suelen presentar una mayor heterogeneidad de resultados (McCoy, 2015). Este tipo de modelos, se ha desarrollado y caracterizado en ratones, hámsteres y cobayas, siendo la cobaya la especie más investigada por sus similitudes con la OA humana (Bendele, 2001). Un ejemplo es el modelo Dunkin-Hartley de OA espontánea en cobaya, en el que se observan aumentos considerables de alteración histológica osteoartítica a los 9 meses y medio, siendo estas alteraciones similares a las observadas en el modelo de inducción química en el mismo modelo a la misma edad (Kim et al., 2018).

Además de los modelos de aparición espontánea, se han desarrollado varios modelos genéticamente modificados en ratón que tienen la capacidad de desarrollar la OA sin requerir ningún tipo de intervención (Kuyinu et al., 2016). Estos modelos, permiten investigar los efectos de un solo gen en la patogénesis de la OA (Little y Zaki, 2012). Sin embargo, como la naturaleza de la OA es poligénica, el uso de este tipo de modelos animales podría simplificar demasiado el proceso de la enfermedad, por lo que la extrapolación de sus resultados a otras especies animales o al ser humano no es siempre posible. Además, su coste es bastante elevado y las modificaciones genéticas

pueden dar lugar a otras anomalías del cartílago o deleciones letales durante el periodo embrionario (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b).

4.2 EL CONEJO COMO MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITIS

Entre los diferentes modelos animales desarrollados en la investigación de la OA, el conejo ha sido una de las especies más estudiadas durante décadas. En cuanto a los métodos de inducción quirúrgica más utilizados en esta especie, se incluyen la ACLT con o sin meniscectomía medial total o parcial (Lavery et al., 2010; Cope et al., 2019). La ACLT en conejos esqueléticamente maduros ha demostrado ser un técnica reproducible y eficaz. Uno de los motivos de su alta selección en investigación preclínica, es que las lesiones que se producen en el cartílago, hueso y membrana sinovial tras los procedimientos de inducción quirúrgica, son muy similares a las observadas en la osteoartritis humana (Yoshioka et al., 1996; Lavery et al., 2010). En ambas especies, se puede observar un aumento de rugosidad en la superficie del cartílago articular, que con el paso del tiempo puede evolucionar a fisuras, erosiones e incluso ulceraciones en todo el espesor de la capa cartilaginosa (Yoshioka et al., 1996; Lavery et al., 2010). Asimismo, en la articulación de la rodilla existen algunas similitudes anatómicas entre ambas especies, como la existencia del ligamento patelar, la presencia de dos meniscos y el receso suprapatelar sinovial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que también existen notables diferencias en la marcha, así como en la estructura y composición del cartílago (Lavery et al., 2010; Poole et al., 2010; Pedersen et al., 2013; Cope et al., 2019). El cartílago de conejo es aproximadamente 10 veces mas delgado que el del hombre y presenta una densidad de condrocitos mayor (Poole et al., 2010). Además, en algunos estudios se ha observado cierta capacidad de regeneración espontánea del cartílago en esta especie, especialmente en ejemplares jóvenes (hasta 20 semanas de edad) (Cook et al., 2014). Por lo que la edad será uno de los factores que deberemos considerar a la hora de diseñar nuestro protocolo experimental. Por otro lado, debemos tener en cuenta en el caso de realizar meniscectomía, que el conejo también parece presentar capacidad de regeneración del menisco seccionado, observándose aparición de tejido fibroso a las 6 semanas post-cirugía, lo que puede hacernos pensar que el menisco no fue intervenido con anterioridad. En esos casos, deberemos evaluar la presencia de otros cambios osteoarttríticos en el resto de estructuras articulares, como la esclerosis del hueso subcondral (Bendele, 2001).

Adicionalmente, es importante conocer el patrón de carga de la especie animal seleccionada, ya que existen notables diferencias entre los modelos animales. A diferencia de otras especies como roedores, cobayas y humanos que presentan mayores patrones de carga en los compartimentos mediales, los conejos parecen

mostrar una carga superior en los compartimentos laterales (Bendele, 2001). En este sentido, se ha observado que los procedimientos quirúrgicos a nivel del compartimento interno, como la meniscectomía medial, produce cambios degenerativos menos graves y de manera más prolongada que los procedimientos laterales, por lo que probablemente las intervenciones mediales constituyen una mejor opción para la evaluación terapéutica en esta especie (Moskowitz et al., 1973; Colombo et al., 1983; Bendele, 2001).

En relación al sexo de los animales para su uso como modelos en investigación de OA, se ha descrito la preferencia de la utilización de machos con objeto de evitar posibles interferencias hormonales en el desarrollo de la enfermedad (Laverty et al., 2010). Sin embargo, en la actualidad existe una falta de evidencia científica en evaluar la influencia de los mecanismos moleculares relacionados con el sexo en esta especie animal (Contartese et al., 2020).

4.3 DESAFÍOS EN LOS MODELOS ANIMALES ACTUALES

Como comentamos previamente, no existe un modelo animal en investigación de la OA que sea capaz de recrear al 100% el proceso natural *in-vivo* de la enfermedad. Por otro lado, los datos disponibles nos indican que los mecanismos moleculares a nivel estructural y de generación de dolor, son distintos entre los diferentes modelos animales, lo que nos sugiere la necesidad de seguir utilizando múltiples modelos animales experimentales en lugar de enfocarnos en la consecución de un único modelo ideal. (Little y Zaki, 2012). Sin embargo, las diferencias en el tamaño, anatomía, histología (sobretudo el espesor del cartílago) y la biomecánica, hacen difícil la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes estudios preclínicos y la extrapolación a la situación clínica real (Cook et al., 2014). Además, aparte de estas diferencias específicas de especie, también destaca la utilización de numerosos métodos de inducción de la OA, así como diferentes etapas y estadios de evaluación de la enfermedad. Por tanto, uno de los objetivos en investigación de la OA sería reducir la variabilidad experimental permitiendo la comparación de los hallazgos de los estudios (Cope et al., 2019).

En este sentido, la comunidad científica está trabajando en la estandarización de los estudios preclínicos con modelos animales. Un ejemplo es la publicación por parte de la Sociedad Internacional de Investigación de Osteoartritis (OARSI) de una guía de evaluación histológica con sistemas de puntuación estandarizados entre las diferentes especies más utilizadas, para poder hacer comparables los resultados entre diferentes estudios (Aigner et al., 2010). Por otro lado, recientemente se acaba de publicar la nueva edición de las directrices ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) (Percie du Sert et al., 2020). Estas directrices se desarrollaron en

2010 como parte de una iniciativa del Centro Nacional para la Sustitución el Refinamiento y la Reducción de Animales en la Investigación (NC3Rs) con objeto de mejorar la actividad experimental con animales, mejorando la calidad de la información publicada y minimizando la realización de estudios innecesarios. La implementación de estos listados de verificación en la actividad investigadora disminuye la variabilidad y la falta de información y favorece la transparencia y la reproducibilidad de los estudios. Sin embargo, una gran parte de los estudios que utilizan animales de experimentación continúan sin reportar toda la información requerida, por lo que la inclusión de estas guías como parte fundamental del trabajo experimental, todavía es una asignatura pendiente dentro de la comunidad científica (Leung et al., 2018).

A medida que aumenta nuestra comprensión de la fisiopatología de la OA, algunas de las limitaciones que actualmente presentan los modelos animales podrían ir perfeccionándose. Adicionalmente, el desarrollo y validación de nuevos métodos de evaluación de los resultados experimentales, la inclusión de técnicas avanzadas de imagen y de biomarcadores de la enfermedad, así como los nuevos estudios de análisis de la marcha, favorecen la investigación de la OA contribuyendo a una mejor capacidad por parte de los investigadores de entender esta compleja enfermedad (Teeple et al., 2013).

5 MÉTODOS DE EVALUACIÓN EN ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE OSTEOARTRITIS

Los objetivos principales de la investigación de la OA con modelos animales son estudiar la patofisiología de la enfermedad y evaluar la eficacia de diversos tratamientos y terapias. La evaluación del cartílago articular en estudios preclínicos nos ofrece la oportunidad de detectar los principales cambios osteoarthríticos en la articulación afectada desde etapas muy tempranas de la enfermedad. Sin embargo, existe un claro consenso en la necesidad de analizar esos cambios a nivel global, incluyendo la evaluación de la membrana sinovial, los meniscos y el hueso subcondral. La evaluación de la articulación al completo nos permite conocer la contribución de cada elemento estructural en el desarrollo y progresión de la OA (Poole et al., 2010). Entre los principales métodos de evaluación en los estudios experimentales de OA, podemos encontrar las técnicas de histología, técnicas avanzadas de imagen, la medición de diversos biomarcadores locales y/o sistémicos, así como la evaluación del dolor y de la biomecánica de los animales (Kuyinu et al., 2016).

5.1 HISTOLOGÍA

Las técnicas histológicas continúan conformando el “gold standard” en el estudio y evaluación de la progresión de la enfermedad y de la gravedad de las alteraciones producidas a nivel articular en modelos animales. Estas técnicas, permiten visualizar directamente lesiones producidas a nivel del cartílago articular y de otras estructuras involucradas en la patofisiología de la OA (Batiste et al., 2004a). A lo largo de los años, se han implementado diversas escalas, basadas en sistemas de puntuación, que permiten clasificar la enfermedad en función de su grado de desarrollo. Sin embargo, la utilización de diferentes escalas de medición del grado de OA entre los distintos estudios preclínicos, ha dificultado la comparación de los resultados (McCoy, 2015). Adicionalmente, este tipo de evaluaciones pueden estar parcialmente influenciadas por la subjetividad de los observadores. Además, estas técnicas únicamente proporcionan datos cualitativos o parcialmente cuantitativos (Pastoureau et al., 2010). En líneas generales, se establece que la escala de gradación histológica ideal para la evaluación del cartílago en la patología oteoartrítica debería incluir las siguientes características: simplicidad, utilidad, adaptabilidad, extensibilidad y compatibilidad (Pritzker et al., 2006).

Dentro de los numerosos sistemas de clasificación de la OA utilizados podemos encontrar la clasificación de O’Driscoll y colaboradores, que fue una de las primeras escalas diseñada específicamente para evaluación de la reparación del cartílago (O’Driscoll et al., 1986), la escala histológica de Pineda et al. (Pineda et al., 1992), de Wakitani et al. (Wakitani et al., 1994), de Sellers et al. (Sellers et al., 1997) y la escala de Fortier y colaboradores (Fortier et al., 2002), siendo probablemente la escala de Mankin (Mankin, 1974) y las desarrolladas por la OARSI, unas de las más populares dentro de la investigación y evaluación histológica de la OA.

El sistema de puntuación de Mankin esta basado fundamentalmente en el análisis microscópico de la OA en fases avanzadas (Mankin, 1974). Este sistema y sus modificaciones posteriores han sido ampliamente utilizados durante años. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones sobretodo en la evaluación de la enfermedad en estadios iniciales y, además, sólo realiza la valoración a nivel del cartílago articular sin incluir al resto de tejidos involucrados en la patofisiología de la OA (Poole et al., 2010). Por todo ello, y con objeto de mejorar la reproducibilidad de los resultados y disminuir las variaciones intra- e inter-observador, la OARSI estableció un grupo de trabajo en 1998 para desarrollar un nuevo sistema de evaluación que fue publicado en 2006 (Pritzker et al., 2006). Este sistema fue validado en animales (Custers et al., 2007) y en el hombre (Pearson et al., 2011), estableciéndose una guías estandarizadas de gradación universal de las especies animales más utilizadas (Aigner et al., 2010), así como sistemas estandarizados individuales para la

evaluación histopatológica de modelos experimentales de OA en conejo (Lavery et al., 2010), perro (Cook et al., 2010), rata (Gerwin et al., 2010), ratón (Glasson et al., 2010) y caballo (McIlwraith et al., 2010), entre otros.

Estudios posteriores han evaluado la fiabilidad y reproducibilidad de las principales escalas histológicas, concluyendo que, cuando son utilizadas por personal entrenado, todas muestran una alta confiabilidad intra- e inter-observador, independientemente de su complejidad. Sin embargo, en términos de repetibilidad, parece que la clasificación O'Driscoll muestra valores más fiables que otras escalas para la evaluación de la reparación del cartílago en modelos animales *in vivo* (Bonasia et al., 2015). Por otro lado, aunque el sistema de clasificación OARSI está ampliamente aceptado en la evaluación y diagnóstico de la OA, su evaluación a nivel de los cambios que se producen en el compartimento óseo es realmente escasa, especialmente en los animales con patología más leve. En relación a esto, algunos autores destacan la necesidad de la elaboración de una escala que permita la evaluación histológica del hueso subcondral de manera sistemática y estandarizada y que relacione los cambios observados a este nivel con los producidos a nivel del cartílago articular (Aho et al., 2017).

Los avances tecnológicos relacionados con los sistemas de análisis histológicos de imágenes bidimensionales (2D), permiten cuantificar los principales parámetros histológicos de manera objetiva, precisa y reproducible, de manera que pueden determinarse cambios osteoartroíticos a nivel de todos los tejidos de la articulación sinovial, incluyendo el hueso subcondral (Pastoureau et al., 2010; Poole et al., 2010). En este sentido, la histomorfometría permite evaluar de una manera más amplia y precisa el componente óseo, al poder realizarse sobre muestras no descalcificadas. Numeroso autores han cuantificado los principales parámetros histológicos asociados a la OA en la articulación sinovial de diversos modelos de experimentación animal mediante técnicas histomorfométricas 2D (Hwa et al., 2001; Pastoureau et al., 2003; Daubs et al., 2006; Pinamont et al., 2020). Sin embargo, todavía son necesarios estudios que desarrollen protocolos detallados y estandarizados que permitan realizar una evaluación más eficiente y reproducible de los parámetros entre los diferentes estudios de OA (Pinamont et al., 2020).

5.2 TÉCNICAS DE IMAGEN

Tradicionalmente, la radiografía constituía la principal técnica de imagen en el diagnóstico de la OA. Los principales cambios que se observan en esta patología incluyen el estrechamiento del espacio articular, la presencia de osteofitos y de quistes subcondrales, así como la esclerosis del hueso subcondral (Braun y Gold, 2012). Se trata de una técnica rápida, no invasiva y económica. Sin embargo, su

eficacia en el diagnóstico de la enfermedad es limitada, al carecer de sensibilidad para evaluar algunas estructuras involucradas en la patogenia de la OA, como los meniscos, la membrana sinovial y el cartílago articular. Otra limitación es que solo nos permite realizar una evaluación 2D de las estructuras; consecuentemente, en los casos de superposición estructural favorecería una mala interpretación de los resultados, requiriendo la realización de múltiples proyecciones para compensar esa limitación. Asimismo, tampoco permite la identificación de la enfermedad en estadios leves o iniciales. En cuanto a la correlación con los signos clínicos, algunos estudios han observado una fuerte correlación entre la presencia de cambios estructurales y de síntomas de OA de rodilla. En particular, el estrechamiento del espacio articular parece relacionarse muy frecuentemente con la existencia de dolor articular (Neogi et al., 2009). Por el contrario, otros autores han sugerido que los síntomas de la OA de rodilla están débilmente asociados con los hallazgos radiográficos y viceversa (Bedson y Croft, 2008).

Las nuevas técnicas de imagen no invasivas ofrecen la oportunidad de evaluar los cambios osteoartroticos en modelos animales de manera específica y sensible, mejorando nuestro conocimiento de la enfermedad. Tanto la resonancia magnética (RM) como la microtomografía computerizada (micro-CT) han demostrado ser herramientas precisas y adecuadas en el estudio de las características patológicas de la enfermedad (Batiste et al., 2004a). En el caso de la RM, presenta la gran ventaja de permitir la visualización precisa de todos los componentes articulares, incluyendo aquellos no observables mediante radiografía convencional, como los meniscos, ligamentos, membrana sinovial. En estudios experimentales con modelos animales, la RM proporciona información estructural de alta resolución sobre los cambios articulares tempranos y tardíos desarrollados en la OA. Todas estas ventajas, han contribuido a que, en la actualidad, la RM tenga un papel cada vez más importante en la investigación de la enfermedad articular (Wang, 2008).

La microtomografía computerizada (micro-CT) nos permite obtener imágenes seccionales de toda la articulación. Fundamentalmente, esta técnica ha demostrado numerosas ventajas en el análisis del componente óseo a nivel microestructural, permitiendo la observación con gran resolución todos los tejidos mineralizados (Batiste et al., 2004a). En este sentido, la micro-CT ha sido ampliamente utilizada en diferentes modelos animales para el estudio de los cambios producidos en el hueso periarticular asociados a la OA (Dedrick et al., 1993; Boyd et al., 2000b; a; Florea et al., 2015). En cuanto a sus limitaciones, esta técnica no permite examinar con precisión las alteraciones producidas en los tejidos blandos como el cartílago articular, al presentar una menor capacidad de resolución a estos niveles. Sin embargo, varios estudios han investigado la utilización de contrastes que mejoran significativamente la visualización de estos tejidos no mineralizados. Una de las técnicas más evaluadas y

que ha demostrado buenos resultados, es la técnica de equilibrio iónico conocida como “Equilibrium Partitioning of an Ionic Contrast Agent based micro-computed tomography” (EPIC- μ CT). En el estudio de Willett et al. (Willett et al., 2016), se demostró que el análisis cuantitativo tridimensional (3D) EPIC- μ CT presentaba una alta sensibilidad en la medición estructural y de composición del cartílago y del hueso subcondral. Además, utilizado en combinación con técnicas de histología proporciona un análisis muy completo de la articulación, permitiendo evaluar de manera precisa la eficacia terapéutica de posibles fármacos modificadores de la enfermedad osteoartítica. Algunos países, han evidenciado problemas a la hora de obtener el contraste iónico requerido para esta técnica (Hexabrix; Mallincrodt). Por este motivo, se están desarrollando métodos alternativos utilizando contrastes no iónicos como el iopamidol, que también han mostrado resultados prometedores mejorando la visualización del cartílago articular en la micro-CT (Sugasawa et al., 2020).

Además de las técnicas de imagen previamente descritas, no debemos olvidar el uso de la artroscopia, como técnica mínimamente invasiva que va a permitirnos la visualización directa del cartílago articular y resto de estructuras de la cavidad sinovial. En medicina humana se trata de uno de los procedimientos ortopédicos más comunes a nivel mundial y recientemente, se ha prestado especial atención a su papel como herramienta de diagnóstico de la OA, especialmente en aquellos casos en los que no es posible realizar otras técnicas de imagen avanzadas o cuando el diagnóstico no está claro (Khan et al., 2018). Aunque la artroscopia ha logrado importantes avances tecnológicos y científicos en los últimos años, en investigación preclínica su utilidad continúa siendo limitada en algunas especies como roedores y lagomorfos, ya que sus articulaciones no son lo suficientemente grandes para permitir el examen artroscópico (Lavery et al., 2010). Por el contrario, en el caso de modelos animales de mayor tamaño ésta técnica constituye un método eficaz en la evaluación histológica de los cambios producidos en el cartílago articular (Cook et al., 2010). Asimismo, en el caso de la medicina veterinaria clínica, la artroscopia constituye una importante técnica diagnóstica y terapéutica en el manejo de las enfermedades osteoarticulares tanto en la especie canina (Rochat, 2001) como en la equina (Adrian et al., 2017).

5.3 BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS

Los biomarcadores de OA permiten evaluar la progresión y severidad de la enfermedad y tienen un papel primordial en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Asimismo, estas moléculas han sido ampliamente investigadas en el desarrollo de fármacos anti-osteoartríticos al permitir evaluar su respuesta terapéutica de una manera más rápida y durante todo el desarrollo de la OA (Kraus et al., 2011, 2015). Es

importante diferenciar los biomarcadores diagnósticos de aquellos que predicen la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento, y que por lo tanto deberían cuantificarse (Bauer et al., 2006). Los biomarcadores se producen como resultado del metabolismo celular, por lo que deberían evaluarse tanto marcadores anabólicos como catabólicos, así como marcadores específicos de la inflamación de las diversas estructuras articulares. Se localizan fundamentalmente, en el líquido sinovial, sangre y orina y sus niveles se correlacionan con diferentes cambios osteoartrotríticos a nivel de las estructuras de la articulación sinovial (Kuyinu et al., 2016). Aunque es probable que ningún biomarcador de manera individual sea capaz de diagnosticar la enfermedad o predecir su evolución, es posible que la determinación de una combinación de biomarcadores nos permita reflejar la situación metabólica (catabolismo/anabolismo) e inflamatoria de una manera más precisa, mejorando nuestro conocimiento sobre el estado actual de la enfermedad (Poole et al., 2010; Teeple et al., 2013).

En cuanto a su utilización en estudios preclínicos, se han observado mejores resultados en las determinaciones a nivel del líquido sinovial. Sin embargo, esto no siempre es posible en todas las especies animales, resultando especialmente difícil en las de menor tamaño como el ratón, donde la cantidad obtenida en el aspirado sinovial es realmente escasa (McCoy, 2015). Aunque los biomarcadores podrían evaluarse en otras muestras orgánicas (sangre u orina), lo cierto es que los resultados se consideran menos específicos, y podrían verse influenciados por otras alteraciones sistémicas no relacionadas con la articulación de interés (Poole et al., 2010; Kuyinu et al., 2016).

La mayoría de los biomarcadores que se determinan en la OA son componentes del cartílago articular, como el condroitín sulfato, el colágeno tipo II, el queratán sulfato (KS) y el HA (Kuyinu et al., 2016). El HA es un componente importante del líquido sinovial y de la matriz extracelular del cartílago, sintetizado en los condrocitos y en los fibroblastos sinoviales. Algunos autores han observado que durante el proceso inflamatorio de la membrana sinovial se produce un aumento de la producción de biomarcador de HA por parte de los sinoviocitos que puede ser determinado a nivel serológico (Poole et al., 2010). En medicina humana, los pacientes con OA mostraron niveles serológicos aumentados de HA, determinándolo como un biomarcador fiable y capaz de reflejar la erosión del cartílago y la inflamación sinovial (Ishijima et al., 2011). Curiosamente, en el caso de la especie canina, algunos autores han observado el efecto contrario, registrando niveles de HA más bajos en los animales afectados por OA en comparación con los sanos. Asimismo, estos valores parecían aumentar cuando los animales mejoraban tras la administración de tratamientos como células madre y factores de crecimiento (Vilar et al., 2016b). En relación a esto, se ha sugerido la posibilidad de que se produzca un aumento inicial de HA en las primeras fases de la

OA asociado a la inflamación de la membrana sinovial, para posteriormente disminuir cuando la síntesis de HA se ve superada por su degradación y pérdida (Venable et al., 2008).

En cuanto al metabolismo del cartílago, el colágeno tipo II constituye la principal proteína estructural, representando el 50% de la matriz extracelular, debido a que la degradación del colágeno es una de las principales características de erosión en la OA. En los últimos años, los productos de degradación del colágeno tipo II han sido uno de los biomarcadores más investigados como posibles indicadores de remodelación del cartílago en la OA (Garnero y Delmas, 2003). En concreto, algunos de los más publicados tanto en estudios preclínicos con modelos animales como en ensayos clínicos, son: el telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo II (CTX-II) (Duclos et al., 2010), el neo-epítipo C2C (Vilar et al., 2016b), y el epítipo desnaturalizado Coll2-1 y su forma nitrogenada Coll2-1 NO₂ (Henrotin et al., 2012a). Otros biomarcadores especialmente útiles en el diagnóstico precoz de la OA y en la evaluación de los cambios asociados a la enfermedad serían la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), que se ha determinado como un biomarcador fundamental en investigación de la OA (Kraus et al., 2011), y las metaloproteasas de matriz, que participan en la degradación y remodelación de la matriz extracelular, así como las enzimas inhibitoras de las mismas (TIMPs) (Alam et al., 2011; Malek et al., 2020).

Los modelos animales han contribuido significativamente a la investigación de biomarcadores de OA. Asimismo, cabe destacar que durante los últimos años el número de biomarcadores identificados ha aumentado notablemente, relacionado en gran parte con los importantes avances que se han realizado en el área de la proteómica. Actualmente, sabemos que los cambios metabólicos de los tejidos articulares involucrados en la OA comienzan mucho antes que el inicio de alteraciones estructurales. En consecuencia, la identificación de biomarcadores tempranos de OA es crucial para el diagnóstico temprano de la enfermedad, así como para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Sin embargo, actualmente todavía no se han validado biomarcadores de la enfermedad para su utilización en la práctica clínica (Saberri Hosnijeh et al., 2019).

6 MANEJO FARMACOLÓGICO DE LA OSTEOARTRITIS EN MEDICINA VETERINARIA

El manejo clínico de la OA engloba varios enfoques terapéuticos con los que se pretende abordar esta compleja enfermedad, incluyendo terapias no farmacológicas (pérdida de peso, ejercicio, fisioterapia), farmacológicas (administración de fármacos sistémicos e intraarticulares), así como diferentes técnicas quirúrgicas. El tratamiento

multimodal de la OA mediante la combinación de las terapias disponibles ha logrado buenos resultados en la consecución de una mejor calidad de vida de los pacientes, al lograr una disminución de los síntomas y una mejor movilidad. Sin embargo, ninguno de ellos de manera individual ha demostrado ser capaz de frenar la progresión de la enfermedad (Carrillo, 2020). Adicionalmente, la falta de comprensión de los mecanismos etiopatogénicos ha dificultado el desarrollo de fármacos modificadores de la OA.

La falta de tratamientos farmacológicos eficaces y seguros en el manejo de la OA en animales, continúa siendo un reto en el ámbito de la medicina. En este sentido, en la especie felina este problema es aún mayor, relacionado con su menor tolerancia a ciertos fármacos, siendo esto especialmente notable en animales geriátricos, donde los efectos adversos constituyen un problema asociado a la presencia de enfermedades comórbidas (Bennett et al., 2012b).

Durante muchos años, las opciones farmacológicas para el manejo de la OA se centraron en el control de la inflamación y del dolor. Básicamente, estas terapias se restringieron al uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y analgésicos como el paracetamol. Estos fármacos producen un rápido alivio de los síntomas; sin embargo, su administración prolongada se ha asociado a la aparición de importantes efectos secundarios (Brandt y Slowman-Kovacs, 1986). Puesto que el manejo y control de esta patología requiere de la administración de tratamientos de manera continuada, la comunidad científica lleva años investigando diferentes opciones terapéuticas que puedan detener o modificar el avance de la enfermedad y que presenten un buen perfil de seguridad. Con este propósito, se han evaluado numerosos agentes, obteniéndose diferentes niveles de eficacia (Apostu et al., 2019). Sin embargo, los avances en esta área todavía son limitados y, actualmente, no se dispone de fármacos modificadores de la enfermedad de la OA aprobados para su uso en pacientes con OA (He et al., 2020).

Los fármacos sintomáticos de acción lenta de la artrosis constituyen uno de los grupos terapéuticos que ha suscitado mayor interés en investigación de la OA en los últimos años. Estos fármacos han demostrado presentar efectos analgésicos y antiinflamatorios eficaces tanto en estudios clínicos como preclínicos. Además, se muestran seguros tras su administración a largo plazo con incidencias de aparición de efectos adversos asociados realmente bajas (Bruyère et al., 2008). No obstante, resultados contradictorios entre los diferentes estudios hacen que su eficacia y recomendación para el manejo de la OA siga siendo un tema controvertido. Adicionalmente, algunas terapias antirresortivas, entre las que destaca el uso de bifosfonatos, han sido propuestas por sus posibles efectos modificadores de la OA a nivel de cartílago y hueso subcondral (Castañeda et al., 2012; Karsdal et al., 2014). Sin

embargo, actualmente todavía no se ha esclarecido su nivel de efectividad en el tratamiento de esta enfermedad.

Entre las principales opciones farmacológicas utilizadas en el manejo de la OA en animales de compañía destacan los AINEs, analgésicos, corticoesteroides, condroprotectores y las nuevas terapias regenerativas, aunque, como comentamos anteriormente, en la actualidad numerosos grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevos fármacos sintomáticos y fármacos modificadores de la enfermedad. En este sentido, recientemente se han aprobado algunos tratamientos analgésicos como el gapiprant y algunos anticuerpos monoclonales que están mostrando resultados muy prometedores en el manejo del dolor asociado a OA en medicina veterinaria.

6.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

6.1.1 *Antiinflamatorios no esteroideos con acción inhibidora de la ciclooxigenasa*

Los AINEs constituyen la primera opción farmacológica en el manejo de la OA en medicina veterinaria. En concreto, algunos autores han reflejado que el 97% de los tratamientos analgésicos pautados en atención primaria para el manejo de la OA canina, corresponden a este grupo terapéutico (Anderson et al., 2018). Si bien es cierto que los AINEs han demostrado ser eficaces en el control del dolor y la inflamación en los pacientes con OA, su administración de manera prolongada se ha relacionado con la aparición de efectos adversos a nivel gastrointestinal, como el desarrollo de úlceras de tracto gastrointestinal, así como alteraciones a nivel hepático y renal (Monteiro-Steagall et al., 2013). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2, que convierten el ácido araquidónico en prostaglandinas, dando lugar a una reducción de la concentración de PGs proinflamatorias pero también de aquellas con funciones homeostáticas a nivel de la mucosa gástrica, el riñón y las plaquetas (Figura 2). En este sentido, parece que la COX-1 juega un papel fundamental en la producción basal de PGs implicadas en la función renal, la producción de moco gástrico y la función plaquetaria, mientras que la COX-2 se asocia fundamentalmente al proceso inflamatorio (Khan y McLean, 2012). Debido al elevado número de efectos adversos asociados a la inhibición de la COX-1 se desarrollaron AINEs con acción selectiva inhibidora de la COX-2. El desarrollo de estos fármacos, comúnmente conocidos como coxib, suponía un gran avance en el manejo del dolor en la OA, demostrando buenas eficacias comparables a las de otros AINEs y presentando incidencias de efectos adversos gastrointestinales graves significativamente menores que los AINEs clásicos. Sin embargo, posteriormente se observó que sus efectos adversos en otros sistemas e interacciones podían ser similares a los AINEs convencionales y que, por lo tanto, estos efectos indeseados

debían ser considerados antes de iniciar una pauta de tratamiento, sobre todo en pacientes de riesgo (Rausch - Derra et al., 2016).

Los principales AINEs utilizados para el tratamiento de la OA en medicina veterinaria son: meloxicam, carprofeno, ketoprofeno, firocoxib, robenacoxib y mavacoxib. Aunque todos ellos han sido ampliamente investigados, el meloxicam continúa siendo uno de los fármacos más utilizados en el manejo de la OA, tanto en la especie canina (Aragon et al., 2007) como en la felina (Guillot et al., 2013). Varios estudios han evaluado los efectos de la administración de meloxicam en la especie canina, sugiriendo que, tanto por su eficacia como por su tolerabilidad y fácil administración, el meloxicam parece ser un tratamiento adecuado para el manejo de la OA crónica en el perro (Doig et al., 2000). Moreau et al. (Moreau et al., 2003) por su parte, evaluaron el efecto de la administración de meloxicam, carprofeno y un nutracéutico en el tratamiento de la OA en perros, observando que el meloxicam constituía el tratamiento más apropiado y efectivo, seguido por el tratamiento con carprofeno, mientras que los animales tratados con el nutracéutico no mostraron mejorías significativas. Con el objetivo de disminuir la aparición de efectos adversos relacionados con su administración a largo plazo, algunos autores han sugerido cambiar las pautas habituales de tratamiento por pautas a dosis reducidas, obteniendo resultados variables dependientes de respuestas individuales del animal (Wernham et al., 2011).

En relación con la administración de AINEs en la especie felina, el meloxicam es uno de los pocos fármacos aprobado por la Agencia Europea del Medicamento para su uso a largo plazo en el manejo de trastornos musculoesqueléticos en gatos. Sin embargo, se estima que entre el 5 y el 10% de los pacientes deben interrumpir el tratamiento por aparición de efectos adversos, como vómitos, diarrea, desarrollo de úlceras gastrointestinales, nefropatías o hepatopatías. Adicionalmente, hasta el 12% de los animales parecen no responder a la terapia. Además, debemos tener en cuenta que existen múltiples contraindicaciones para su administración en la especie felina, como la presencia de enfermedad renal subyacente, enfermedad hepática y la administración de corticoesteroides previos, etc. Por todo ello, es importante conocer posibles terapias farmacológicas alternativas y seguras para el manejo de la OA felina (KuKanich, 2013). En este sentido, se están evaluando nuevas formas de presentación farmacológica para el tratamiento en esta especie, como el meloxicam transmucosa oral en spray (Monteiro et al., 2016). Los resultados de algunos estudios mostraron incidencias muy bajas de efectos adversos y, además, se obtuvieron resultados positivos en el manejo del dolor, similares a los observados en estudios con tratamientos orales en gatos con OA (Guillot et al., 2013). Esta nueva presentación farmacéutica podría suponer una opción terapéutica muy interesante para su uso en ésta y otras especies. Sin embargo, se requieren estudios que investiguen su efecto a

largo plazo, así como la evaluación de su administración conjunta con otros tratamientos.

Dentro de los AINEs utilizados en el manejo del dolor en gatos, el robenacoxib constituye otro de los fármacos aprobados para su uso en la especie felina. Aunque en Europa los comprimidos de robenacoxib están indicados para tratamientos a corto plazo, algunos estudios han evaluado los efectos de su administración a largo plazo en gatos con OA. En este sentido, la administración diaria de robenacoxib durante un mes de tratamiento fue bien tolerada por los animales, no observándose daño a nivel del tracto gastrointestinal, riñón y/o hígado, incluso en gatos con enfermedad renal crónica concomitante. No obstante, los autores son cautelosos con estos resultados y recomiendan la realización de más estudios que incluyan una población mayor de gatos con enfermedad renal (King et al., 2016).

6.1.2 Antiinflamatorios no esteroideos de la clase piprant: gapiprant

Los fármacos piprant constituyen un nuevo grupo de AINEs que actúan de forma diferente a los AINEs convencionales. La alta incidencia de efectos adversos asociada a la inhibición de la COX, llevó a la búsqueda de fármacos con modos de acción diferentes. En relación a esto, recientemente se desarrolla una nueva molécula, gapiprant, un AINE que actúa selectivamente sobre el receptor EP4 de la PGE2 sin inhibir las COX y por lo tanto, reduciendo la aparición de efectos adversos asociados (Figura 2). La PGE2, ha sido reconocida como un mediador fundamental del dolor y la inflamación. A su vez, sus acciones se producen por interacción con cuatro receptores acoplados a la proteína G (EP1, EP2, EP3, EP4). Los estudios han comprobado que el receptor EP4 es uno de los principales receptores que intervienen en la mediación del dolor asociado en la artritis reumatoide, la osteoartritis y otras patologías inflamatorias articulares (Giorgi, 2015). Aunque el receptor EP4 no es el único involucrado en la inflamación y el dolor, su inhibición ha demostrado notables efectos analgésicos y mediadores de la sensibilización central (Nakao et al., 2007).

En estudios preclínicos recientes, se observó que la administración crónica de gapiprant durante 9 meses en perros sanos con dosis de hasta 50 mg/kg causaba mínimos efectos secundarios (Rausch-Derra et al., 2015). Asimismo, se realizaron estudios en cuanto a su farmacocinética y farmacodinámica en varios modelos animales. En la especie canina, se evaluaron los efectos de la administración de dosis aproximadamente 15 veces superiores a las dosis terapéuticas confirmando el alto margen de seguridad del fármaco (Rausch - Derra et al., 2016). También se realizaron estudios en conejos como modelo experimental, observándose varias similitudes de los parámetros farmacocinéticos en comparación con los obtenidos en los perros. Asimismo, gapiprant parece ser una opción atractiva para la

antinocicepción en lagomorfos, debido a su inicio rápido de acción y su efecto de larga duración. Sin embargo, se necesitan estudios que evalúen sus efectos a largo plazo, así como su biodisponibilidad oral y la bioseguridad del fármaco en esta especie (De Vito et al., 2017).

La efectividad y seguridad del gapirant también ha sido investigada en varios ensayos clínicos en perros con OA, obteniéndose resultados muy positivos y prometedores. Los animales tratados con gapirant, a una dosis de 2mg/kg cada 24 horas durante 28 días, mostraron descensos significativos de dolor asociado a OA en comparación con los animales del grupo placebo, tanto en las evaluaciones del propietario como las del veterinario. En general, el tratamiento fue bien tolerado, identificándose en algunos casos esporádicos efectos secundarios leves a nivel gastrointestinal (Rausch-Derra et al., 2016). Por el contrario, en un estudio clínico posterior realizado en perros con dolor moderado asociado a OA espontánea (Robertson-Plouch et al., 2019), el tratamiento con un fármaco antagonista del receptor EP4 no demostró eficacia constante en comparación con el grupo placebo.

La eficacia analgésica del gapirant también ha sido evaluada en un modelo de sinovitis aguda en perros en comparación con la administración firocoxib (De Salazar Alcalá et al., 2019). Los resultados mostraron una mayor eficacia analgésica tras la administración del AINE, en comparación al gapirant, cuyos resultados no fueron significativamente diferentes a los obtenidos en los animales tratados con placebo. Los autores sugieren que esto puede deberse a la intensidad del dolor que se genera en este tipo de modelo animal, por lo que probablemente con otro tipo de modelo experimental y con administraciones repetidas del tratamiento podrían alcanzarse resultados más positivos. No obstante, en las mismas condiciones experimentales, el firocoxib sí que mostró una alta potencia analgésica.

En cuanto a la especie felina, actualmente se dispone de estudios de seguridad y de perfiles de toxicidad asociados a la administración oral de gapirant. Al igual que en la especie canina, la administración diaria de gapirant, fue bien tolerada por los gatos incluidos en el estudio a dosis de hasta 15 mg/kg. Sin embargo, sigue siendo necesario el desarrollo de ensayos clínicos adicionales para evaluar la seguridad y la eficacia de gapirant en gatos con OA (Rausch-Derra y Rhodes, 2016).

6.2 CORTICOESTEROIDES

Los corticoesteroides son potentes agentes antiinflamatorios que han sido ampliamente utilizados durante años en el tratamiento de la OA tanto en medicina humana como veterinaria. En cuanto a su mecanismo de acción, actúan inhibiendo la fosfolipasa A2, de manera que se reduce la producción de ácido araquidónico

precursor de cicloxigenasa y lipooxigenasa (Figura 2). Estos fármacos se reservan frecuentemente a etapas terminales y severas de la OA o para aquellos casos refractarios a otros tratamientos. Su administración más habitual y que ha demostrado resultados más favorables corresponde al tratamiento local mediante inyección intraarticular (IA) (Henrotin et al., 2005).

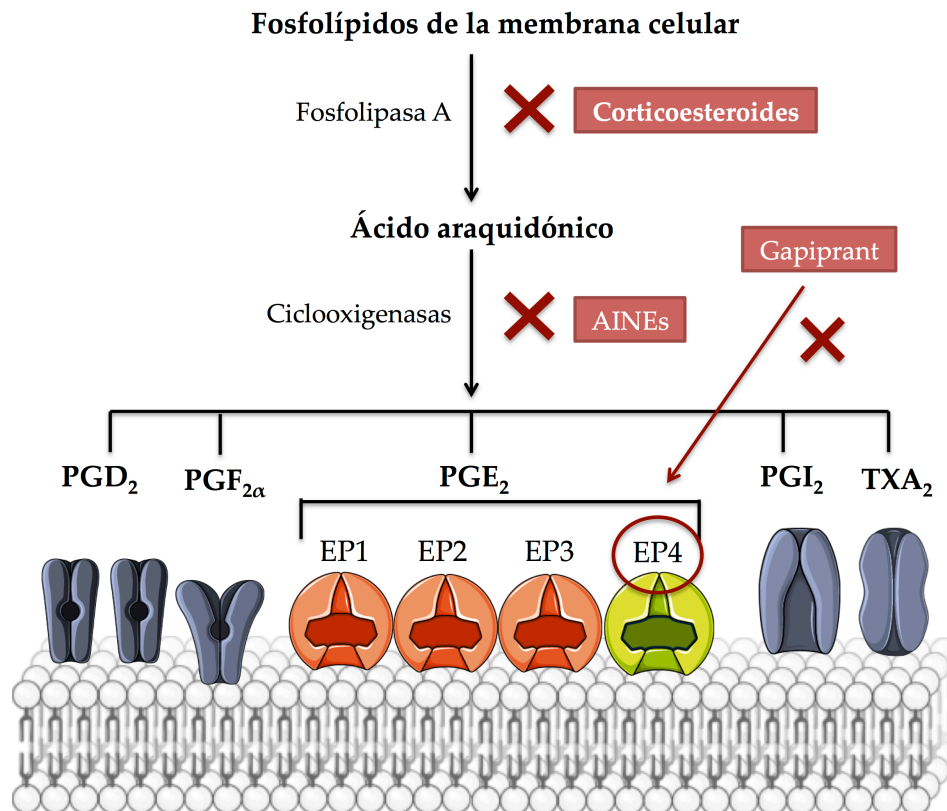


Figura 2. Mecanismo de acción de los corticoesteroides, antiinflamatorios no esteroideos y gapiprant en la cascada de la inflamación. PG, prostaglandina; TXA, tromboxano A2.

A pesar de los posibles efectos no deseados que se les achacan, la administración IA con corticoesteroides es una de las prácticas más comúnmente utilizadas en el manejo de las enfermedades articulares en la especie equina, siendo la metilprednisolona y la triamcinolona los fármacos más empleados, seguidos con menor frecuencia por la betametasona (Souza, 2016). La mayoría de los estudios realizados coinciden en determinar que la administración IA de corticoides conduce a una mejoría de la cojera de los animales. En cuanto a la combinación con otros fármacos, su administración conjunta con ácido hialurónico ha sido ampliamente

utilizada en el tratamiento de la sinovitis no infecciosa y de la OA, con objeto de alcanzar una eficacia clínica superior. Sin embargo, algunos autores refieren haber obtenido menores tasas de éxito clínico a corto plazo, con la combinación de ambos tratamientos en comparación con el tratamiento corticoesteroideo en solitario (de Grauw et al., 2016).

Por otro lado, aunque el tratamiento IA con corticoides se ha asociado a un rápido y efectivo alivio de los síntomas, su respuesta es relativamente breve, incluso tras la administración de corticoesteroides de larga duración. Como consecuencia, en la mayoría de los casos es necesario realizar administraciones repetidas del fármaco. En este sentido, se deben extremar las precauciones, puesto que tanto la administración de dosis altas como la exposición prolongada al tratamiento corticoesteroideo se ha asociado al desarrollo de erosión del cartílago y toxicidad de los condrocitos (Pettitt y German, 2015; Wernecke et al., 2015), e incluso se ha demostrado que pueden acelerar la progresión de la OA (McAlindon et al., 2017). En líneas generales, parece que los efectos de los corticoides sobre los condrocitos y el cartílago son dependientes del tiempo y de la dosis, reportándose efectos positivos a dosis bajas, y efectos perjudiciales a concentraciones altas o tratamientos prolongados (Di Salvo et al., 2021). Por todo ello, su utilización en medicina veterinaria debe realizarse con precaución, evaluando los posibles riesgos-beneficios de cada animal en particular.

6.3 ANALGÉSICOS

6.3.1 *Paracetamol*

El paracetamol constituye el tratamiento de primera elección para el manejo del dolor medio a moderado por OA en el hombre. Su utilización en medicina veterinaria se restringe fundamentalmente a la especie canina, estando contraindicado su uso en el manejo del dolor en gatos debido a la toxicidad observada en esta especie. En cuanto a su posología en perros, se recomienda su administración en periodos no superiores a 5 días y nunca en combinación con otros AINEs (Pettitt y German, 2015). En algunos países, existen preparaciones orales de paracetamol autorizadas para su uso en la especie canina y que incluyen dosis bajas de codeína en su presentación. Algunos autores han evaluado su eficacia en el periodo postoperatorio en perros, observándose efectos analgésicos similares a los determinados tras la administración de meloxicam (Pacheco et al., 2020). Sin embargo, son necesarios ensayos clínicos que evalúen su seguridad y eficacia a largo plazo, así como en el manejo del dolor asociado a OA.

6.3.2 Tramadol

El tramadol es un analgésico opioide ampliamente utilizado en el tratamiento del dolor relacionado con la OA en el hombre, debido a sus efectos positivos y su alta tolerabilidad. Asimismo, constituye uno de los opiáceos más empleados en el manejo del dolor por OA en medicina veterinaria. Sin embargo, los resultados de su efectividad en animales son bastantes erráticos a lo largo de los diferentes estudios publicados y, por ello, es necesario el seguimiento del paciente para garantizar que se están proporcionando los niveles de analgesia adecuados (Pettitt y German, 2015). Asimismo, su falta de propiedades antiinflamatorias y la presencia de efectos adversos asociados pueden limitar su eficacia.

En la especie felina, es frecuente que los animales con OA muestren signos clínicos de sensibilidad central expresados en forma de hipersensibilidad al dolor que parece no responder al tratamiento con AINEs como el meloxicam (Guillot et al., 2013). En relación a eso, se ha observado que este fenómeno puede ser potencialmente reversible con el uso de tramadol (Monteiro et al., 2016). Estudios recientes en gatos geriátricos con OA evaluaron la eficacia del uso de tramadol en el manejo del dolor y aumento del nivel de actividad física. En el estudio de Monteiro et al. (Monteiro et al., 2017), los autores evaluaron el uso del tramadol vía oral a una dosis de 3 mg/kg durante 19 días, observándose efectos beneficiosos en la movilidad y en el manejo de la sensibilidad central. De manera similar, en el estudio de Guedes et al. (Guedes et al., 2018a), los resultados sugirieron un efecto beneficioso tras la administración oral a una dosis de 2 mg/kg dos veces al día, posiblemente asociado a la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Sin embargo, también se observó un aumento de los animales que presentaban euforia tras la administración del fármaco, así como signos de disforia o sedación, lo que podría dar lugar a efectos variables sobre su nivel de actividad. Por todo ello, en aquellos casos en los que no se logre alcanzar un equilibrio entre la eficacia y la tolerabilidad mediante ajustes de la dosis del fármaco, será necesario considerar un tratamiento analgésico alternativo (Guedes et al., 2018a). En cuanto a los efectos adversos del tramadol en gatos, se observó una asociación dosis-dependiente, siendo los más frecuentemente observados los que afectaban al tracto gastrointestinal y sistema nervioso central (Monteiro et al., 2016).

En relación a su efectividad en el manejo de la OA canina, existe una clara falta de evidencia científica en su administración a largo plazo. Asimismo, algunos estudios han evidenciado su falta de eficacia en el manejo del dolor cuando se administra como única modalidad de tratamiento en perros (Malek et al., 2012; Budberg et al., 2018). En concreto, se observó que la administración de tramadol a 5 mg/kg cada 8 horas, no mostraba diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo

placebo en el tratamiento del dolor y la disfunción articular (Budsberg et al., 2018). Por el contrario, en otro estudio se evaluó el efecto de la administración de ketoprofeno a dosis reducidas (0.25 mg/kg cada 24 horas) en combinación con tramadol vía oral durante 28 días. Además de segura, la combinación del AINE y el opiáceo parece ser efectiva en el manejo del dolor osteoartítico en esta especie, observándose incluso efectos positivos hasta 120 días tras la interrupción del tratamiento (Monteiro et al., 2019). En cuanto a los efectos adversos relacionados con la administración de tramadol, se han notificado efectos a nivel gastrointestinal como náuseas y anorexia, así como diferentes grados de sedación y somnolencia (KuKanich, 2013).

6.3.3 *Amantadina*

La amantadina es un antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). Su potencial uso en el manejo de la OA está relacionado con una posible disminución del síndrome de sensibilidad central observado en algunos pacientes, y, por lo tanto, mejorando el manejo del dolor crónico. Aunque todavía no se conoce el papel de los receptores NMDA en la OA, se ha observado que desempeña un importante papel en el procesamiento de estímulos nocivos en modelos de OA en roedores (Li y Neugebauer, 2004). Si bien es cierto que la amantadina como terapia única no parece proporcionar los efectos analgésicos requeridos en estos pacientes, sí que parece potenciar los efectos analgésicos de AINEs, opioides y otros fármacos como la gabapentina y la pregabalina (KuKanich, 2013). En este sentido, algunos estudios clínicos en perros ya han demostrado efectos positivos en el manejo del dolor osteoartítico refractario a meloxicam, por lo que podría considerarse una opción terapéutica complementaria útil (Lascelles et al., 2008). En cuanto a su administración en gatos, actualmente parece que no hay datos que apoyen su uso en esta especie, por lo que se requieren más estudios que evalúen su efecto (KuKanich, 2013). Recientemente, se ha publicado un estudio en gatos en el que se sugiere el potencial beneficio y seguridad de la amantadina en la OA (Shipley et al., 2020). A pesar de la mejora de la calidad de vida referida por el propietario, en el estudio se determinaron disminuciones significativas de la movilidad en los animales tratados con amantadina en comparación a los tratados con placebo, pudiendo atribuirse este hecho a un potencial efecto sedante no deseado asociado a la administración del fármaco.

6.3.4 Gabapentina

La gabapentina es un análogo estructural del ácido γ -aminobutírico (GABA) originalmente desarrollado como antiepiléptico y que se utiliza frecuentemente en el manejo del dolor neuropático en el hombre. La evidencia de su uso en perros y gatos como analgésico es baja y pocos estudios clínicos han evaluado su efecto en animales de compañía con OA. En el caso de la especie felina, un estudio clínico en gatos geriátricos con OA mostró una mejoría significativa de la movilidad alterada percibida por parte de los propietarios. Sin embargo, no se determinaron asociaciones significativas entre el tratamiento con gabapentina y la percepción de una mejoría en la calidad de vida de los pacientes (Guedes et al., 2018b). Esto podría estar relacionado con la alta proporción de gatos que desarrollaron efectos adversos tras la administración de gabapentina, siendo los más frecuentemente reportados la sedación y la ataxia. A su vez, parece que la aparición de estos efectos indeseables es más habitual cuando se administran dosis altas del fármaco o cuando se combinan con otros medicamentos que producen efectos adversos similares. Por todo ello, sería necesario establecer pautas iniciales a dosis bajas e ir ajustándolas en función de la tolerabilidad del paciente, hasta que logremos un equilibrio entre la sedación y su efecto analgésico (KuKanich, 2013; Guedes et al., 2018b).

6.4 FÁRMACOS DE ACCIÓN SINTOMÁTICA LENTA

Los SYSADOAs han sido ampliamente investigados en el tratamiento de la OA. Dentro de ellos, los efectos de los fármacos precursores de la matriz del cartílago, comúnmente conocidos como condroprotectores, han sido estudiados en distintos modelos animales (Mével et al., 2014). Aunque algunos estudios preclínicos han evidenciado efectos condroprotectores a nivel macroscópico y bioquímico (Wen et al., 2010; Terencio et al., 2016; Abdul Kadir et al., 2019), la heterogeneidad de resultados obtenida entre los diversos estudios dificulta su evidencia científica. Otro SYSADOA que ha sido ampliamente evaluado en investigación preclínica es la diacereína, un fármaco modulador de citoquinas con efecto antiinflamatorio, antipirético y analgésico desarrollado específicamente para el tratamiento de la OA. Aunque su administración se ha relacionado con la consecución de un mejor estado del cartílago articular y del hueso subcondral (Permuy et al., 2015a), en otros estudios se observó que el tratamiento con diacereína no lograba prevenir los cambios asociados a la OA (Hwa et al., 2001).

En cuanto a su uso clínico en animales, los tratamientos con glucosamina, condroitín sulfato y ácido hialurónico han sido probablemente los más utilizados en medicina veterinaria (Rychel, 2010). Estos tratamientos son ampliamente aceptados y recomendados por la mayor parte del colectivo veterinario que los considera seguros

y eficaces en el manejo de la OA (Elrod y Hofmeister, 2019). Sin embargo, en el momento actual existe gran controversia en cuanto a la utilización clínica de estos tratamientos y la mayoría de los resultados se consideran inciertos (Mantovani et al., 2016). Asimismo, la falta de estandarización en algunos diseños experimentales y la variabilidad de presentaciones terapéuticas dificultan aún más su evaluación en investigación biomédica (Bruyère et al., 2016).

6.4.1 *Glucosamina*

La glucosamina es un importante precursor de los proteoglicanos que son componentes clave de la matriz extracelular. Asimismo, inhibe la síntesis de enzimas encargadas de la degradación del cartílago, como MMPs, y presenta efectos antiinflamatorios a nivel local y sistémico (Jerosch, 2011). Las principales formas de presentación para su tratamiento en OA son: la glucosamina sulfato (GS) , glucosamina hidrocloreto (GH) y N-acetil-glucosamina (Henrotin et al., 2014). En cuanto a la formulación de los compuestos y sus efectos sobre la OA, la mayoría de los resultados positivos identificados en investigación biomédica se han obtenido con los preparados regulados como fármacos, no pudiendo extrapolar sus resultados a los potenciales efectos de los suplementos alimenticios comercializados, cuyo contenido, farmacodinámica y farmacocinética no están garantizados (Henrotin et al., 2005).

Con respecto a su efectividad en el manejo de la OA en animales, los resultados de los estudios clínicos y preclínicos muestran resultados muy heterogéneos. Algunos estudios en modelos animales han evidenciado efectos condroprotectores relacionados con un descenso de la secreción de mediadores inflamatorios (Taniguchi et al., 2012; Wang y Cai, 2018; Salman et al., 2019). Mientras que en otros estudios, el tratamiento con glucosamina no fue capaz de prevenir la degeneración articular ni la fibrilación del cartílago (Tiralocche et al., 2005; Permuy et al., 2015b). En medicina humana, los estudios clínicos sobre el efecto de la glucosamina para el manejo OA también presentan resultados contradictorios. En relación a esto, algunos autores evaluaron el efecto de la administración de glucosamina en ensayos clínicos en los que se realizaba una correcta ocultación de los tratamientos evidenciando que los pacientes no mostraban diferencias significativas sobre el placebo en el alivio del dolor y la mejoría funcional, poniendo en duda la eficacia de la glucosamina (Towheed et al., 2009). En este sentido, en medicina veterinaria el efecto placebo relacionado con el propietario es un problema importante que debe abordarse en los estudios que evalúan la eficacia de los analgésicos en animales con enfermedades que provocan dolor crónico (Malek et al., 2012). Por todo ello, aunque algunos autores han reportado efectos beneficiosos en el manejo del dolor asociado a la OA canina tras la administración de estos compuestos (McCarthy et al., 2007), no podemos

descartar un posible efecto placebo. Especialmente, en aquellos estudios en los que se incluyen escalas subjetivas para clasificación del grado de dolor.

En la actualidad, existe una gran disponibilidad de productos comercializados para su uso en la especie canina, los cuales difieren tanto en la formulación y dosificación de la glucosamina, como en composición y presencia de sustancias activas adicionales. Según Bhathal et al. (Bhathal et al., 2017), parece que la mayoría de estos suplementos veterinarios contienen GH. En relación a esto, es importante señalar que algunos autores han sugerido que este tipo de glucosamina, parece presentar menores efectos beneficiosos en la mejora sintomática de los pacientes, así como una menor biodisponibilidad oral (Towheed et al., 2005). Sin embargo, estudios preclínicos en conejo como modelo animal de OA han mostrado efectos condroprotectores tras su administración oral (Ohnishi et al., 2013; Jeong et al., 2017), así como reducciones significativas de las alteraciones producidas a nivel del hueso subcondral (Wang et al., 2007). Por otro lado, en una revisión sistemática que evaluó el uso de glucosamina en la OA humana, los autores determinaron que, debido a la gran heterogeneidad de resultados observada entre los estudios disponibles, identificar qué formulación podría ser más eficaz en el manejo de la OA continúa siendo realmente complicado (Henrotin et al., 2012b).

En cuanto a la dosis empleada en el tratamiento de la OA, algunos autores han evaluado la dependencia dosis-efecto de la glucosamina en modelos animales concluyendo que la eficacia de este fármaco depende de la dosis y de la concentración, sugiriendo tras la extrapolación de los resultados obtenidos, que dosis superiores a las aprobadas en medicina humana (1500 mg/kg/día), podrían proporcionar mayores efectos beneficiosos en los pacientes afectados por OA (Aghazadeh-Habashi et al., 2014). Sin embargo, se necesitan estudios que evalúen la farmacocinética y toxicidad asociadas a la administración de dosis más elevadas de glucosamina (McCarty et al., 2019). Por otro lado, aunque la glucosamina presenta un alto perfil de seguridad, se han reportado efectos secundarios gastrointestinales leves asociados a su administración, aunque también se han descrito efectos secundarios alérgicos relacionados con la sal de algunos tipos de formulaciones (Henrotin et al., 2012b).

6.4.2 Condroitín sulfato

El sulfato de condroitina es un componente esencial de la matriz extracelular de los tejidos conectivos. A nivel del cartílago presenta varios mecanismos de acción, reduce los niveles de MMPs (MMP-3, MMP-13), agreganasas (ADAMTS-4, ADAMTS-5) y la expresión de interleuquinas (IL-1 β), así como la apoptosis de condrocitos. Por otro lado, favorece la producción de ácido hialurónico, de proteoglicanos y de colágeno

tipo II (Jerosch, 2011). Sin embargo, sus efectos biológicos pueden variar en función de su origen, producción y purificación (Martel-Pelletier et al., 2015).

Los efectos clínicos de este SYSADOA han sido objeto de estudio durante años en medicina humana. Algunas revisiones de la literatura concluyen que su administración presenta efectos beneficiosos en el control del dolor y otros síntomas, así como en la progresión radiológica de la enfermedad (Leeb et al., 2000; Schneider, 2012). Por el contrario, otros estudios refieren no observar beneficios tras su administración (Reichenbach et al., 2007). En relación a los resultados de los estudios preclínicos, la administración de condroitín sulfato redujo los parámetros histológicos de sinovitis, la degradación del cartílago y el edema en un modelo de inducción química en ratón (Omata et al., 2000). Por el contrario, en un estudio en conejos a los que se indujo la OA mediante inmovilización física, se observó que el tratamiento con condroitín sulfato durante 12 semanas no fue capaz de detener el daño articular (Torelli et al., 2005).

Numerosas investigaciones han evaluado el posible efecto sinérgico de su administración conjunta con glucosamina, evidenciándose una amplia variedad de resultados. En el estudio de Terencio et al. (Terencio et al., 2016), la combinación de CS y GH mostró menor daño histológico en el cartílago articular tras su administración en un modelo ACLT en rata. Por otro lado, Roman-Blast et al. (Roman-Blast et al., 2017) evaluaron los efectos de la asociación de CS con glucosamina hidrocloreto o sulfato en un modelo quirúrgico en conejo. Los resultados de este estudio mostraron que ninguno de los tratamientos fue capaz de modificar el daño del cartílago o la inflamación sinovial. En cuanto a los ensayos clínicos en medicina veterinaria, la administración de condroitín sulfato y glucosamina en perros con OA, no mostró diferencias significativas sobre el placebo en la evaluación de la movilidad medida mediante monitor de actividad. Sin embargo, los propietarios reportaron mejorías clínicas significativas en ambos grupos, lo que sugiere un posible efecto placebo del cuidador (Scott et al., 2017). En este sentido, la inclusión de monitores de actividad en la evaluación de la eficacia de los tratamientos en los perros con OA, permite obtener datos más objetivos y en el entorno cotidiano del animal (Brown et al., 2010).

6.4.3 *Ácido hialurónico*

El HA es un mucopolisacárido que se encuentra en el líquido sinovial y es el responsable de su viscosidad, aumentando la lubricación articular y reduciendo la fricción de las superficies articulares. Además, reduce los niveles de MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5, IL-1 β , IL-6 y aumenta la producción de proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Altman et al., 2015). A medida que la OA avanza, la

concentración natural del HA dentro de la articulación disminuye. Asimismo, las moléculas tienden a presentar una disminución en su peso molecular, de manera que disminuyen sus propiedades biomecánicas y viscoelásticas. La administración de intraarticular HA tiene como objetivo la restauración de estos cambios, aumentando su concentración y distribución dentro de la articulación sinovial (Band et al., 2015). Sin embargo, pocos estudios han evaluado sus efectos vía oral por lo que su evidencia mediante esa vía de administración continúa siendo insuficiente.

El tratamiento con HA para manejo de la OA, solo o combinado con otras terapias, ha sido ampliamente investigado en estudios *in vivo* con modelos animales, obteniéndose resultados condroprotectores muy positivos (Amiel et al., 2003; Fonsi et al., 2020). Asimismo, en medicina humana se ha evaluado la efectividad de su administración intraarticular, comparándolo con la administración de corticoesteroides. Los resultados sugieren un mayor efecto de la terapia con glucocorticoide hasta las 4 semanas de duración; sin embargo el tratamiento con HA demostró mayor eficacia a largo plazo (4 a 26 semanas). Por todo ello, parece que la coadministración de ambos agentes presentaría un efecto sinérgico realmente útil para el manejo de la OA en la clínica (Bannuru et al., 2009). En la especie canina, recientemente se ha publicado un estudio que evaluó la administración intraarticular de HA y/o triamcinolona en perros de trabajo con OA de cadera. Los resultados mostraron efectos beneficiosos tras la administración de los tratamientos, especialmente, tras su administración conjunta, evidenciando mejoras significativas en las escalas de dolor evaluadas (Alves et al., 2020). Sin embargo, sería recomendable la realización de más estudios con un número mayor de pacientes, así como la inclusión de métodos de evaluación más objetivos. En medicina equina, la administración de HA ha demostrado ser eficaz en la reducción de la cojera asociada a la OA en caballos. En cuanto a su combinación con otros fármacos, no hay evidencia científica de que su administración conjunta con otros fármacos antiinflamatorios sea más eficaz para reducir la cojera que su administración de manera individual (da Silva Xavier et al., 2021).

Actualmente, cada vez más estudios preclínicos y clínicos defienden su actividad modificadora de la enfermedad, además de su probada eficacia y seguridad en el tratamiento del dolor asociado a OA (Altman et al., 2015).

6.5 BIFOSFONATOS

Los bifosfonatos (BPs) son análogos sintéticos de los pirofosfatos inorgánicos que inhiben la función de los osteoclastos para reducir la resorción ósea. Su uso principal está relacionado con el tratamiento de patologías en las que se observa un aumento considerable de la tasa de recambio óseo como la osteoporosis, neoplasias óseas y la

enfermedad de Paget. Adicionalmente, los BPs han sido propuestos como posibles DMOADs, debido a su posible impacto positivo sobre el cartílago articular asociado a una mejor calidad en el hueso subcondral (Castañeda et al., 2012; Karsdal et al., 2014). Sin embargo, los estudios clínicos realizados en medicina humana han mostrado resultados inconsistentes (Spector et al., 2005; Bingham et al., 2006; Buckland-Wright et al., 2007). En relación a esto, como un intento de aclarar su efectividad en el manejo de la OA, se publicaron algunas revisiones sistemáticas en las que se evaluó el efecto de estos fármacos en pacientes afectados por OA de rodilla. Los BPs parecen mostrar limitados efectos en el control del dolor y la capacidad funcional, así como ninguna mejoría a nivel radiográfico (Davis et al., 2013; Vaysbrot et al., 2018).

Numerosos estudios preclínicos, han analizado el posible efecto beneficioso de las terapias antirresortivas, inhibiendo la remodelación del hueso subcondral y mejorando la mineralización y estructura del hueso trabecular, lo que, consecuentemente, se ha relacionado con un descenso del daño a nivel del cartílago articular. Específicamente, se han observado respuestas positivas en los compartimentos cartilaginosa y ósea en varios estudios experimentales tras la administración de alendronato (Hayami et al., 2004; Jones et al., 2010; Sniekers et al., 2010; Shirai et al., 2011; Zhang et al., 2011), ácido zoledrónico (Strassle et al., 2010; She et al., 2017), pamidronato (Koh et al., 2010) y risedronato (MacNeil et al., 2008; Jones et al., 2010; Permuy et al., 2014). Por el contrario, en otros estudios preclínicos no se han observado efectos modificadores de la enfermedad, al no ser capaces de prevenir la erosión articular (Ding et al., 2008a; Moreau et al., 2011; Thomsen et al., 2013; Bagi et al., 2015a) ni la formación de osteofitos (Doschak et al., 2004; Moreau et al., 2011; Bagi et al., 2015a; Khorasani et al., 2015).

Aunque el efecto de los bifosfonatos ha sido ampliamente evaluado en las últimas dos décadas, la evidencia de su eficacia continúa siendo deficiente. Asimismo, las diferencias entre estudios preclínicos y entre estos y algunos ensayos clínicos continúan estando presentes. Por todo ello, su mecanismo de acción y efectividad en la OA no están claros todavía. Además, existe una evidente falta de evidencia científica en la evaluación de la efectividad de estos fármacos a largo plazo, y solo algunos estudios preclínicos han investigado sus efectos por encima de los 6 meses de tratamiento (Thomsen et al., 2013; Dearmin et al., 2014).

En cuanto a su uso medicina veterinaria, su aplicabilidad clínica es limitada. Algunos autores han reportado su uso en la especie canina y felina, en el manejo del dolor asociado a algunas neoplasias óseas como el osteosarcoma y otros tumores óseos invasivos (Wypij y Heller, 2014; Hoddinott et al., 2019), y en el tratamiento de la hipercalcemia no neoplásica (Daniels y Sakakeeny, 2015). En la actualidad no hay

estudios clínicos que evalúen su efectividad en el manejo de la OA en animales de compañía. Sin embargo, estudios experimentales con perros han evidenciado efectos positivos en la disminución de los signos clínicos y de los cambios estructurales asociados a la OA (Moreau et al., 2011; Pelletier et al., 2011).

6.5.1 Risedronato

El risedronato (RIS) es un bifosfonato nitrogenado que presenta un efecto inhibitorio de la resorción ósea osteoclástica. Se trata de uno de los BPs más estudiados en medicina humana y su uso principal es el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica, la osteoporosis inducida por esteroides y la enfermedad de Paget (Buckland-Wright et al., 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha producido un creciente interés en evaluar su aplicación en la OA, potenciado por los hallazgos de las implicaciones del hueso subcondral en la patogénesis de la enfermedad articular (Karsdal et al., 2014).

Los efectos del RIS han sido ampliamente evaluados en investigación preclínica con modelos animales. En relación a esto, en algunos estudios experimentales se ha observado que su administración en etapas tempranas de la enfermedad favorece la conservación del cartílago articular al reducir los cambios en el hueso subcondral (MacNeil et al., 2008; Jones et al., 2010; Permy et al., 2014). Por el contrario, en el estudio de Thomsen et al., (Thomsen et al., 2013), el tratamiento con RIS durante 6 meses no logró reducir el daño del cartílago articular en la evaluación histológica, ni la esclerosis de la placa ósea subcondral, pero disminuyó los niveles serológicos de CTX-II. En otros casos, la administración de RIS en conejo como modelo quirúrgico de OA, no evidenció efectos condroprotectores ni redujo la formación de osteofitos, pero mostró una mayor conservación de las propiedades estructurales del hueso periarticular (Doschak et al., 2004, 2005).

En cuanto a los estudios clínicos realizados en el hombre, ninguno ha demostrado un claro efecto modificador de la enfermedad, aunque se han descrito mejorías leves de los síntomas clínicos, descenso de marcadores serológicos de degradación del cartílago (Spector et al., 2005; Bingham et al., 2006) y una mejor conservación de la estructura del hueso subcondral y trabecular (Buckland-Wright et al., 2007; Iwamoto et al., 2010). Sin embargo, los resultados observados entre los diferentes estudios mostraron valores muy heterogéneos, y su actual función como posible DMOAD continúa siendo controvertida.

Entre sus principales efectos secundarios se han descrito dolor abdominal, ostealgia y artralgia. Asimismo, su administración a largo plazo se ha relacionado con una mayor fragilidad ósea asociada a la inhibición del recambio óseo y la posible acumulación de

microdaños. En relación a esto, un estudio experimental en perros mostró que el tratamiento con risedronato durante un año, suprimió significativamente la remodelación intracortical ósea, aumentó la acumulación de microdaños y redujo algunas propiedades biomecánicas del hueso (Mashiba et al., 2000). Sin embargo en otro estudio posterior, se observó que la administración a dosis clínicas durante un año de risedronato o alendronato, favoreció la acumulación significativa de microdaños a nivel vertebral, pero esto se vio compensado por el aumento del volumen óseo y la mineralización, de modo que no hubo un deterioro significativo de las propiedades mecánicas a nivel óseo (Allen et al., 2006).

6.6 DERIVADOS CANNABINOIDES

Actualmente, se han empezado a investigar los efectos del uso de derivados cannabinoides para el manejo del dolor en medicina humana y veterinaria. El cannabidiol (CBD) es un cannabinoide no psicotrópico que ejerce efectos inmunomoduladores, antihiperalgésicos, antinociceptivos y antiinflamatorios, actuando como un antagonista alostérico no competitivo de los receptores cannabinoides (Zhornitsky y Potvin, 2012). Los receptores cannabinoides se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central y periférico y están también presentes en la membrana sinovial (Richardson et al., 2008). Aunque actualmente su interés comercial y su uso en animales de compañía ha experimentado una creciente popularidad, lo cierto es que existe poca evidencia científica sobre su dosificación oral segura y eficaz. En relación con esto, sus efectos clínicos y su farmacocinética han sido evaluados en perros con OA a una dosis de 2 mg/kg cada 12 horas. Los resultados mostraron una disminución significativa del dolor tras el tratamiento, así como un aumento de la actividad física en comparación con el placebo. Aunque los propietarios no identificaron ningún efecto secundario, la bioquímica sanguínea evidenció un aumento de la fosfatasa alcalina durante el tratamiento con CBD. Asimismo, su vida media tras administración oral fue solo de 4-5 horas como máximo (Gamble et al., 2018).

La administración transmucosa oral de estos tratamientos, ha demostrado presentar ciertas ventajas respecto a otras formas habituales de administración farmacológica, relacionadas con su facilidad de uso, rápida absorción y evitación del primer paso hepático o la degradación intestinal (Messenger et al., 2016). En relación a esto y con objeto de aumentar la biodisponibilidad del CBD, un estudio clínico en perros con OA, evaluó el efecto de su administración transmucosa oral como terapia coadyuvante en el manejo del dolor asociado a la OA (Brioschi et al., 2020). Los resultados obtenidos mostraron que los animales que recibieron el cannabidiol adicionalmente al tratamiento multimodal evaluado (AINE + gabapentina + amitriptilina) mostraron

mejorías significativas en las escalas del dolor comparado con los animales que no fueron tratados con el CBD. La coadministración de CBD con otras terapias farmacológicas parece resultar útil en el manejo de la OA, al permitir disminuir las dosis de los fármacos empleados y por lo tanto, disminuir la gravedad e incidencia de aparición de efectos secundarios indeseables. Asimismo, se ha observado que los perros presentan una alta tolerancia a su administración, lo que unido a su facilidad de uso, lo convierte en una alternativa muy interesante para el manejo a largo plazo de esta enfermedad (Gamble et al., 2018; Brioschi et al., 2020).

6.7 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN OSTEOARTRITIS

En la actualidad, se están evaluando una gran cantidad de agentes terapéuticamente prometedores en la investigación experimental con OA. El objetivo fundamental continúa siendo el desarrollo de terapias capaces de revertir el daño articular asociado a la OA y prevenir su progresión (Schulze-Tanzil, 2021). En este sentido, las terapias regenerativas han demostrado ser una de las opciones terapéuticas más prometedoras de los últimos años, participando en fenómenos de reparación y remodelación y mostrando efectos muy positivos a nivel del mantenimiento de la estructura y mejora de la función articular (Carrillo, 2020). Estas terapias han sido ampliamente investigadas tanto en medicina humana como veterinaria, e incluyen diversas técnicas de implantación de tejidos como los injertos de periostio, pericondrio y los trasplantes de condrocitos, así como el uso de terapias celulares con capacidad condrogénica como el plasma rico en plaquetas (PRP) y las células madre mesenquimales (MSC) (Cuervo et al., 2014).

Otras de las terapias innovadoras que se están investigando en la actualidad incluyen el desarrollo de nuevos tratamientos de viscosuplementación, como formulaciones de ácido hialurónico con mayor contenido en HA y mayor estabilidad, con objeto de lograr mayores efectos a largo plazo (Oliveira et al., 2018). También se han identificado nuevos factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos y compuestos nanoparticulares capaces de inhibir la actividad inflamatoria dentro de la articulación. Por otro lado, existe un creciente interés en el desarrollo de terapias génicas y el estudio de diversos inhibidores y reguladores genéticos implicados en la patogénesis de la OA (Schulze-Tanzil, 2021).

Todos estos nuevos enfoques terapéuticos suponen una esperanza para el tratamiento de la OA debido a su creciente potencial en términos de seguridad, alivio del dolor y mejora de la funcionalidad articular, así como a sus efectos positivos en la regeneración del cartílago. Sin embargo, se precisan estudios experimentales que permitan responder muchas de las incógnitas que todavía existen en relación a su farmacodinamia y sus efectos a largo plazo (Roseti et al., 2019).

6.7.1 *Plasma rico en plaquetas*

El PRP es un hemoderivado autólogo que contiene plaquetas altamente concentradas y varios tipos de factores de crecimiento, así como citoquinas, quimiocinas y proteasas, capaces de activar diferentes vías de señalización celular que promueven la reparación tisular. En el caso de su efecto sobre el cartílago articular, se ha observado que la administración de PRP puede modular la regeneración del cartílago y retardar la progresión de la OA, al estimular la migración, proliferación y diferenciación de células madre, la homeostasis articular y su lubricación (Sakata y Reddi, 2016). En función de sus diferentes características, existen numerosas variantes de PRP, siendo una de las más utilizadas el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), que se caracteriza por presentar una concentración plaquetaria moderada y ausencia de leucocitos (Anitua et al., 2005).

En medicina humana, se ha demostrado que la administración intraarticular de PRP alivió el dolor por OA de los pacientes y además, redujo las respuestas inmunitarias humorales y celulares, que condujeron a efectos beneficiosos sobre los parámetros histológicos. Estos resultados sugirieron que el PRP puede ser un agente terapéutico potencial para la OA de rodilla (Huang et al., 2018a).

En relación a los estudios preclínicos, sus efectos han sido evaluados en varias especies. En el caso de la especie canina, un estudio preclínico en perros a los que se les realizó la inducción quirúrgica de la OA mostró que la inyección intraarticular de PRP tenía efectos beneficiosos sobre la enfermedad a nivel clínico e histológico, y que esto se veía potenciado tras la administración conjunta con células madre mesenquimales (Yun et al., 2016). Del mismo modo, un ensayo clínico en perros con displasia bilateral de cadera demostró que una única administración intraarticular de PRGF fue eficaz aliviando el dolor asociado a la OA y mejorando la función articular de los animales. Adicionalmente, se observó que cuando se combinaba la infiltración de PRGF con ejercicios de rehabilitación, los efectos positivos podían mantenerse hasta 180 días después de la administración del tratamiento (Cuervo et al., 2020). No obstante, en la actualidad no hay consenso en cuanto a la duración de los efectos observados y los resultados obtenidos entre los diferentes estudios continúan siendo muy heterogéneos, estando esto probablemente relacionado con la alta variabilidad de protocolos de obtención de los PRP y métodos de evaluación (Ha et al., 2019), por lo que son necesarios estudios que evalúen la eficacia de estos tratamientos en diferentes especies a lo largo del tiempo.

6.7.2 Células madre mesenquimales

En los últimos años las MSC han demostrado diversos efectos beneficiosos en el tratamiento de la OA, generando una posible esperanza en la mejora del manejo de esta compleja enfermedad, conformando una nueva área de investigación en rápido crecimiento. Se ha demostrado que las células madre tienen afinidad por el tejido articular dañado y que tienen capacidad de participar en la reparación tisular articular (Agung et al., 2006). Sin embargo, los resultados en relación a la duración de sus efectos continúan siendo controvertidos. En el caso de la especie canina, algunos autores han referenciado una duración máxima de su efecto menor a tres meses (Vilar et al., 2014) y menor a seis meses (Vilar et al., 2016a).

Asimismo, uno de los objetos de investigación más actuales ha sido evaluar el uso de células madre de tejido adiposo alogénico, es decir, células madre que provienen de seres vivos de la misma especie. En investigación preclínica, la inyección IA de células madre alogénicas adiposas en un modelo experimental en rata, dio lugar a la atenuación de la degeneración del cartílago articular sin producir ningún efecto secundario (Mei et al., 2017). Asimismo, se evaluó la utilización de células madre alogénicas derivadas de la médula ósea tras su administración intraarticular en combinación con HA en un modelo ACLT en conejo. Los resultados mostraron efectos condroprotectores y una reducción de la progresión de la OA en el modelo *in vivo* (Chiang et al., 2016). Indudablemente, la posibilidad de utilización de células madre alógenicas, disponibles en bancos celulares, ha potenciado su uso, al reducirse sus tiempos de obtención. Además, supone una importante ventaja para el propio paciente puesto que ya no debe someterse a un procedimiento quirúrgico previo con objeto de obtener tejido adiposo para su cultivo celular (Carrillo, 2020).

Aunque la inyección intraarticular de MSC es el método de administración más estudiado, algunos estudios han referido la presencia de efectos citotóxicos del líquido sinovial sobre las células madre en pacientes con OA (Kiefer et al., 2015). Por todo ello, en la actualidad se están investigando nuevas vías de administración, como la intravenosa y la intraperitoneal, aunque el número de estudios realizados todavía es muy limitado y los resultados todavía están lejos de ser claros (Zhang et al., 2015). Por todo ello, aunque las MSC constituyen un tratamiento terapéutico prometedor en el manejo de la OA, todavía existen cuestiones como su seguridad a largo plazo, la duración de su efecto, el volumen necesario para lograr resultados o su efecto tras la administración por vía sistémica, que deben resolverse (Torres-Torrillas et al., 2019).

6.7.3 *Anticuerpos monoclonales anti-factor de crecimiento nervioso*

Se ha demostrado que, en las articulaciones afectadas por OA, las células sinoviales y condrocitos, liberan factor de crecimiento nervioso (NFG), que parece inducir dolor articular a través de la sensibilización directa de los nociceptores (Ashraf et al., 2014). Por todo ello, durante los últimos años los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-NFG han sido objeto de estudio e interés entre los miembros de la comunidad científica, debido a su gran potencial en el manejo del dolor asociado a OA. Dentro de este grupo farmacológico, el tanezumab fue el primer mAb anti-NFG que se evaluó en un ensayo clínico en el tratamiento del dolor en pacientes con OA de rodilla (Lane et al., 2010), mostrando resultados muy positivos. Sin embargo, también se observaron efectos adversos como dolor de cabeza (9% de los pacientes), enfermedades del tracto respiratorio superior (7%) y parestesia (7%), por lo que la necesidad de nuevos estudios que ayudasen a comprender los problemas de tolerabilidad y seguridad del fármaco eran claramente imprescindibles. Asimismo, paradójicamente la administración de estos fármacos también se relacionó con la aparición de efectos perjudiciales en la integridad articular, observándose en algunos casos descripciones de fenómenos de evolución rápida de OA y de osteonecrosis, por lo que la Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) decide en 2010 suspender la realización de ensayos clínicos con estos fármacos (Mullard, 2015). Tras la evaluación por parte de un comité de expertos de los eventos adversos reportados en los ensayos clínicos en humanos con tanezumab y fulranumab, se determinó una relación dosis-respuesta y una clara asociación de dichos efectos secundarios y la administración concomitante de AINEs (Hochberg, 2015).

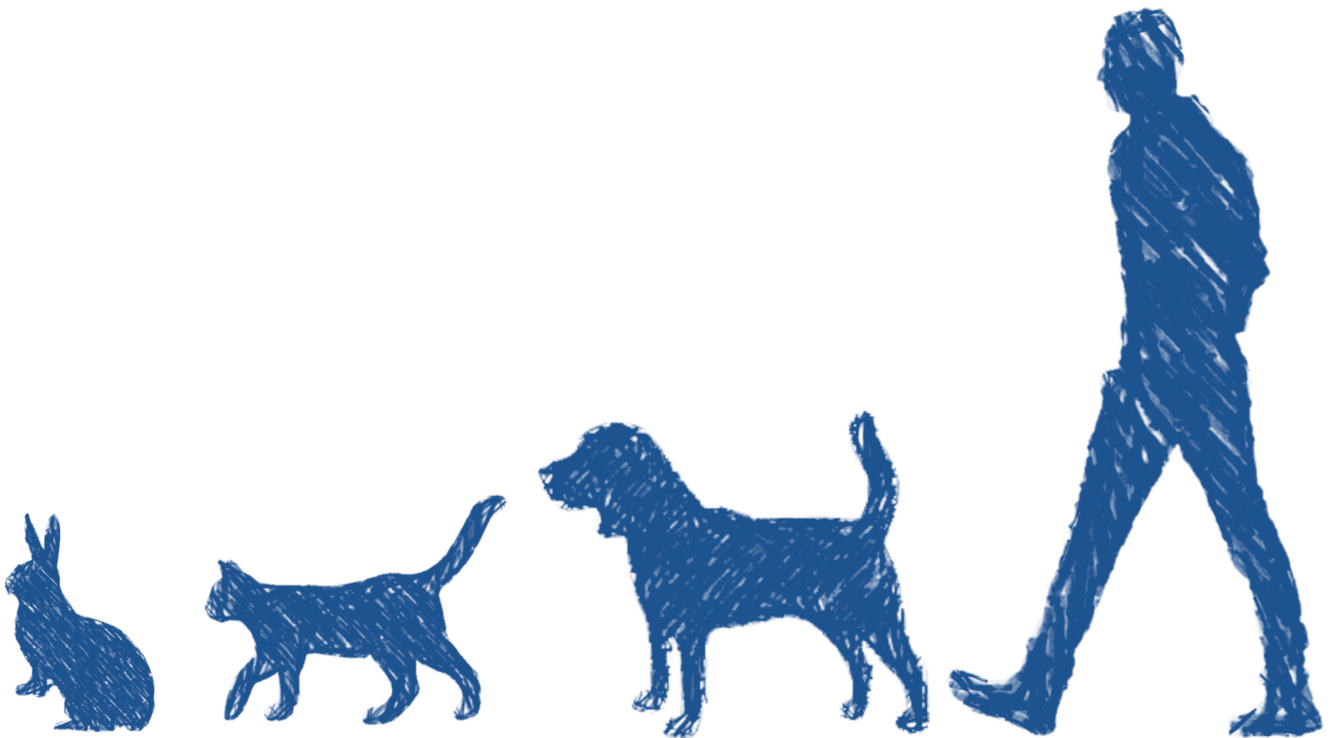
En cuanto a los estudios preclínicos, estos fármacos habían demostrado una gran eficacia analgésica y mejoras en la funcionalidad articular en los pacientes con OA; sin embargo, algunos resultados sugerían un posible daño del sistema nervioso autónomo observado en roedores y primates no humanos tras su administración, por lo que preventivamente la suspensión de ensayos clínicos se alargó hasta finales de 2015, donde se inician de nuevo los estudios dirigidos al manejo del dolor refractario de OA de rodilla y cadera con mAb anti-NFG, pero con la exclusión de pacientes en los que existía una coadministración con AINEs (Mullard, 2015; Miller et al., 2017). En base a los resultados prometedores observados en medicina humana, el interés por parte de la comunidad veterinaria en relación a este nuevo grupo terapéutico aumentó considerablemente. Por todo ello, se han desarrollado versiones adaptadas de mAb anti-NFG en la especie canina (Lascelles et al., 2015) y felina (Gruen et al., 2016). En el estudio de Lascelles et al. (Lascelles et al., 2015), se observó que el tratamiento con el mAb anti-NFG canino, disminuyó significativamente los índices de dolor y movilidad evaluados por el propietario. También se determinaron aumentos significativos del nivel de actividad medido objetivamente con acelerómetro. En

cuanto a su administración en gatos, la administración de un mAb anti-NFG felino presentó efectos beneficiosos, tanto en la movilidad de los animales como en el manejo del dolor crónico asociado (Gruen et al., 2016).

En líneas generales, parece que la justificación para usar fármacos anti-NFG en el manejo del dolor es bastante sólida. La evidencia actual indica que la terapia con mAb anti-NGF presenta efectos analgésicos positivos y es bien tolerada, tanto por perros como por gatos que padecen dolor asociado a la patología osteoartrítica. Adicionalmente, la eficacia de una inyección única parece durar al menos de cuatro a seis semanas. Por todo ello, la terapia con mAb anti-NGF podría constituir una alternativa a las opciones de tratamiento farmacológico disponibles actualmente (Enomoto et al., 2019). En cuanto a si podrían utilizarse como terapia complementaria a los AINEs, en lugar de utilizarse como alternativa en la OA canina y felina, continúa siendo incierto y se necesitarían más estudios evaluando esta circunstancia, así como su administración junto otras terapias farmacológicas y no farmacológicas (Epstein, 2019).

Recientemente se han aprobado los primeros anticuerpos monoclonales inyectables autorizados para su comercialización en perros y en gatos. En el caso de la especie canina, el bendinvetmab (Librella, Zoetis), ha demostrado resultados muy positivos en el manejo del dolor en perros con OA y presenta un buen perfil de seguridad. En el caso de la especie felina, el frunevetmab (Solensia, Zoetis) constituye el primer anticuerpo monoclonal felinizado aprobado para el manejo del dolor asociado a la OA en esta especie. No obstante, en ambos casos es necesarios el desarrollo de estudios clínicos de farmacovigilancia post-comercialización que permitan evaluar sus efectos a largo plazo.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

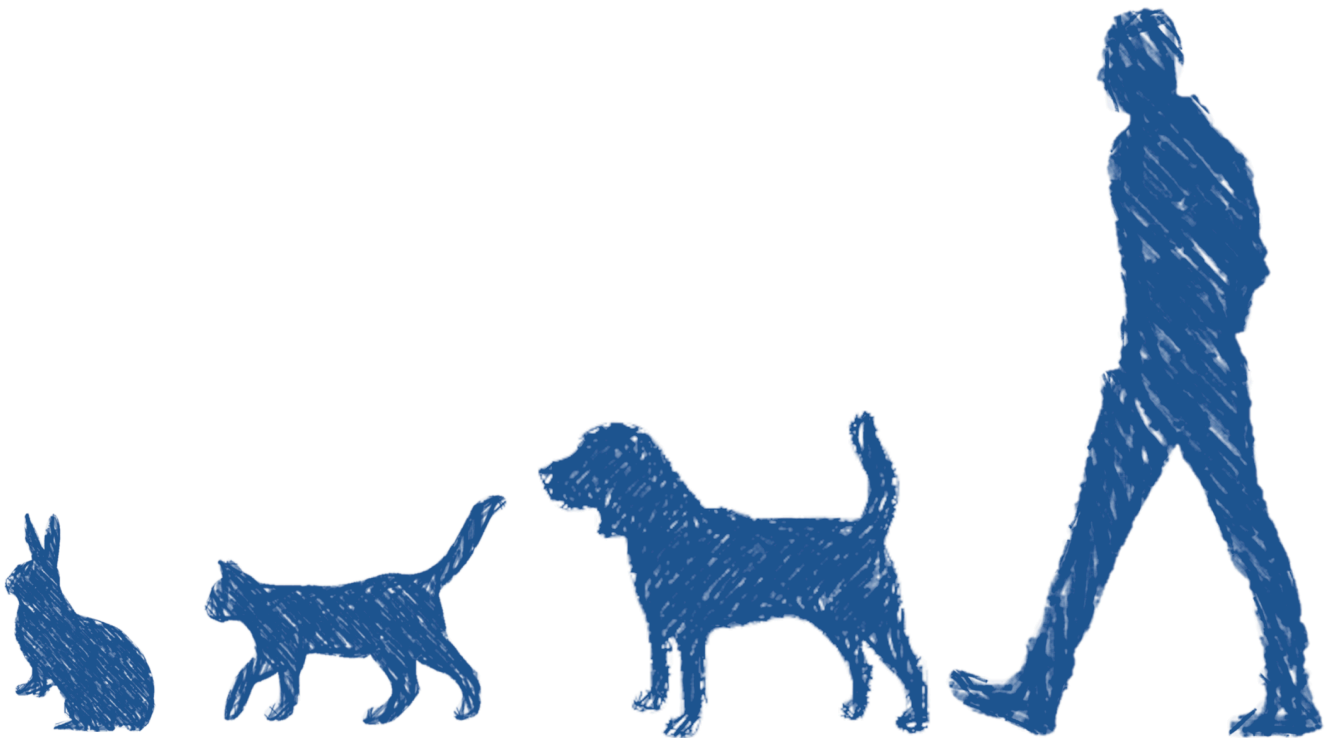
El objetivo principal de la presente tesis doctoral es evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento con bifosfonatos y fármacos sintomáticos de acción lenta sobre la estructura del cartílago y el hueso subcondral en un modelo de osteoartritis experimental en conejo. Para el desarrollo de este proyecto, se fijaron una serie de objetivos concretos que corresponden a cada uno de los cinco capítulos que componen esta tesis doctoral:

- I. Analizar la eficacia de los principales bifosfonatos utilizados en el tratamiento de la osteoartritis en estudios preclínicos con modelos animales a través de una revisión sistemática de la literatura científica actual.
- II. Evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento con risedronato oral en los diferentes tejidos articulares del modelo animal mediante la evaluación morfológica macroscópica de las rodillas, histología cualitativa de las muestras descalcificadas y el análisis microtomográfico del hueso periarticular.
- III. Determinar mediante histomorfometría cuantitativa el efecto a largo plazo del tratamiento con risedronato en el cartílago y hueso subcondral y realizar la caracterización anatómica precisa en el conejo como modelo experimental de osteoartritis en una fase avanzada de la enfermedad.
- IV. Analizar la eficacia de los principales fármacos de acción lenta utilizados en el tratamiento de la osteoartritis en estudios preclínicos con modelos animales a través de una revisión sistemática de la literatura científica actual.

- V. Evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento con fármacos de acción lenta en los diferentes tejidos articulares del modelo animal mediante la evaluación morfológica macroscópica, histología cualitativa y cuantitativa y análisis microtomográfico y comparar los resultados con los efectos del tratamiento con risedronato.



MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELO ANIMAL Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 32 conejos machos albinos de raza Nueva Zelanda (Granja San Bernardo, Navarra, España) de 6-7 meses de edad y con un peso medio de 4.5 Kg. Todos los procedimientos *in vivo* fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela (Número de referencia: 01/16/LU-002, aprobado el 18 de Marzo de 2016) como un ensayo controlado aleatorio con dos controles intersujeto para la comparación de dos opciones de tratamiento. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la normativa española y de la Unión Europea sobre el cuidado y uso de animales de investigación (Ley 14/2007 y al Real Decreto 53/2013, y directrices de las normas UNE-EN ISO 10993-3:2014 y 10993-2:2006). Además, para la realización de este trabajo se han seguido las directrices ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). Los animales se alojaron en el Animalario de Experimentación de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo, España) en jaulas enriquecidas para conejos (R-suite, Tecniplast, Varese, Italia) bajo condiciones ambientales controladas. Los animales dispusieron de agua y comida *ad libitum*. El enriquecimiento ambiental incluyó el suministro de heno, fruta fresca, rollos de papel y palos de madera. Todos los animales fueron evaluados diariamente por personal formado y acreditado en el manejo de animales de experimentación. Para la realización de los experimentos se establecieron todas las medidas posibles para disminuir el dolor, malestar y estrés de los animales.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico, los animales fueron premedicados con una combinación de medetomidina (50 µg/Kg IM, Domtor, Esteve, Barcelona, España), ketamina (25 mg/Kg IM, Imalgène 1000, Merial, Toulouse, Francia) y buprenorfina (0,03 mg/Kg IM, Buprex, RB Pharmaceuticals, Berkshire, Reino Unido). La inducción y el mantenimiento anestésico se llevó a cabo con isoflurano (fracción inspiratoria ISO 2,5-4%, Isova-vet, Schering-Plow, Madrid, España) utilizando una mascarilla facial. Para la profilaxis antibiótica se administró enrofloxacin (5 mg/Kg

SC Ganadexil 5%, Invesa, Barcelona, España) y para el control del dolor, meloxicam (0,2 mg/Kg SC, Metacam, Boehringer Ingelheim España, Barcelona, España), durante 7 días.

Tras un periodo de cuarentena controlada de tres semanas de duración, en 24 de los animales se procedió a la inducción de OA quirúrgicamente mediante ACLT y meniscectomía medial parcial, consiguiendo con ello la desestabilización de la articulación de la rodilla y el desarrollo de la OA (Figura 3). Este procedimiento se realizó de manera aleatoria en una de las rodillas, utilizando la articulación contralateral como control sano. A los 8 animales restantes se les realizó la apertura de la articulación sinovial pero sin realizar la ACLT ni la meniscectomía medial parcial, conformando el grupo SHAM o de cirugía simulada. En el post-operatorio, se permitió a los animales libertad de movimientos sin llevar a cabo la inmovilización de las articulaciones.

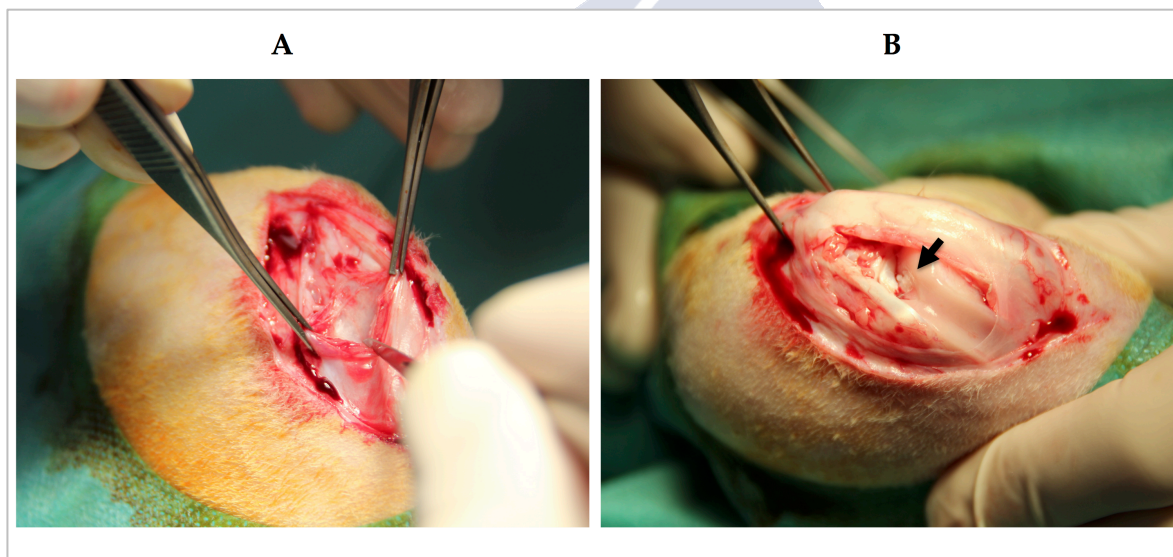


Figura 2. Procedimiento quirúrgico. (A) Apertura de la cápsula articular sinovial; (B) Sección del ligamento cruzado anterior (flecha negra).

3. TRATAMIENTOS

Los tratamientos se administraron por vía oral a partir de la tercera semana tras la cirugía y durante 24 semanas. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los cuatro grupos ($n=8$ animales en cada uno). Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

- Grupo de cirugía simulada (SHAM), tratado con 2 ml de solución salina como vehículo (NaCl 0.9%).

- Grupo control (CONT), tratado con 2 ml de solución salina como vehículo (NaCl 0.9%).
- Grupo de tratamiento con risedronato (RIS), tratado con 2.5 mg/semana de risedronato oral.
- Grupo de tratamiento con una combinación de fármacos de acción lenta (SYSADOA), en concreto los animales recibieron 250 mg/kg/día de glucosamina hidrocloreto, 150 mg/kg/día de condroitín sulfato y 6.25 mg de ácido hialurónico).

Además, las articulaciones operadas conformaron los grupos de osteoartritis (OA) y las articulaciones contralaterales no operadas, los grupos sanos (HT).

El tipo de bifosfonato y la dosis se seleccionaron basándonos en los resultados de un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Permuy et al., 2014). Esta dosis de RIS, corresponde a la dosis relativa utilizada actualmente para el tratamiento de la osteoporosis humana, y se basa en la dosis clínica de 35 mg/semana asumiendo 60 Kg de peso, y considerando una biodisponibilidad oral del 0.6% (Allen et al., 2011). En cuanto al tratamiento con la combinación de SYSADOAs, la dosis administrada corresponde a la indicada para el manejo de la OA canina en animales de hasta 10 Kg de peso.

4. NECROPSIA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la sedación con ketamina (25 mg/Kg IM, Imalgène 1000, Merial, Toulouse, Francia), y medetomidina (50 µg/Kg IM, Domtor, Esteve, Barcelona, España), los animales fueron sacrificados a las 27 semanas post-cirugía mediante una inyección de pentobarbital sódico en la vena auricular lateral (100 mg/Kg IV, Dolethal, Vétoquinol, Madrid, España). Inmediatamente después de la eutanasia, se extrajeron las articulaciones de las rodillas disecando el fémur y la tibia, libres de músculo y tejido blando. Todas las muestras se conservaron en formal tamponado al 10%.

Las rodillas se clasificaron en 8 grupos: (1) rodillas operadas-grupo de cirugía simulada tratadas con placebo (SHAM-OA, $n=8$), (2) rodillas no operadas-grupo de cirugía simulada tratadas con placebo (SHAM-HT, $n=8$), (3) rodillas operadas-grupo control tratadas con placebo (CONT-OA, $n=8$), (4) rodillas no operadas-grupo control tratadas con placebo (CONT-HT, $n=8$), (5) rodillas operadas con tratamiento con risedronato (RIS-OA, $n=8$), (6) rodillas no operadas con tratamiento con risedronato (RIS-HT, $n=8$), (7) rodillas operadas con tratamiento con fármacos de acción lenta (SYSADOA-OA, $n=8$), (8) rodillas no operadas con tratamiento con fármacos de acción lenta (SYSADOA-HT, $n=8$) (Figura 4).

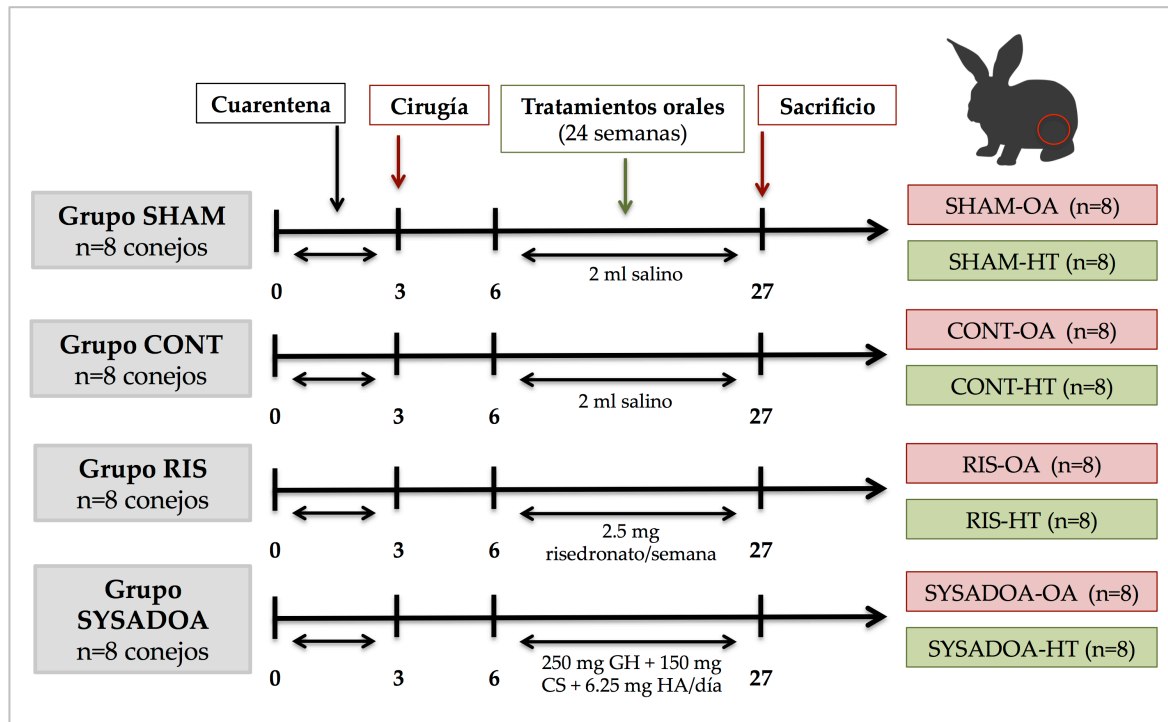


Figura 4. Diseño experimental. SHAM, grupo control de cirugía; CONT, grupo tratado con placebo; RIS, grupo tratado con risedronato; SYSADOA, grupo tratado con una combinación de fármacos de acción lenta; OA, rodillas operadas; HT, rodilla contralateral sana.

5. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS

5.1 MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

Todas las articulaciones femorotibiales, fueron escaneadas antes de ser procesadas para histología utilizando un micro-CT de alta resolución (Skyscan 1172, Bruker microCT NV, Kontich, Bélgica). La fuente de rayos X se ajustó a 100 kV y 100 μ A con un tamaño de vóxel de 12,85 μ m y un filtro de aluminio/cobre (Al/Cu). La captura se realizó con una rotación de 360° con adquisición de imágenes cada 0,4°. Las imágenes posteriores se reconstruyeron con el software NRecon® (Bruker microCT NV, Kontich, Bélgica) utilizando el algoritmo descrito por Feldkamp (Feldkamp et al., 1984). Las imágenes reconstruidas se evaluaron con el software CTAn (Bruker microCT NV, Kontich, Bélgica).

5.1.1 Formación de osteofitos

Para el estudio del desarrollo de osteofitos, se midió el volumen total (TV, mm³), la fracción de volumétrica ósea (BV/TV, %) y la densidad mineral ósea volumétrica (vBMD, mg/cm³), utilizando como volumen de interés (VOI) una delineación manual de todos los osteofitos localizados a nivel femoral (Figura 5).

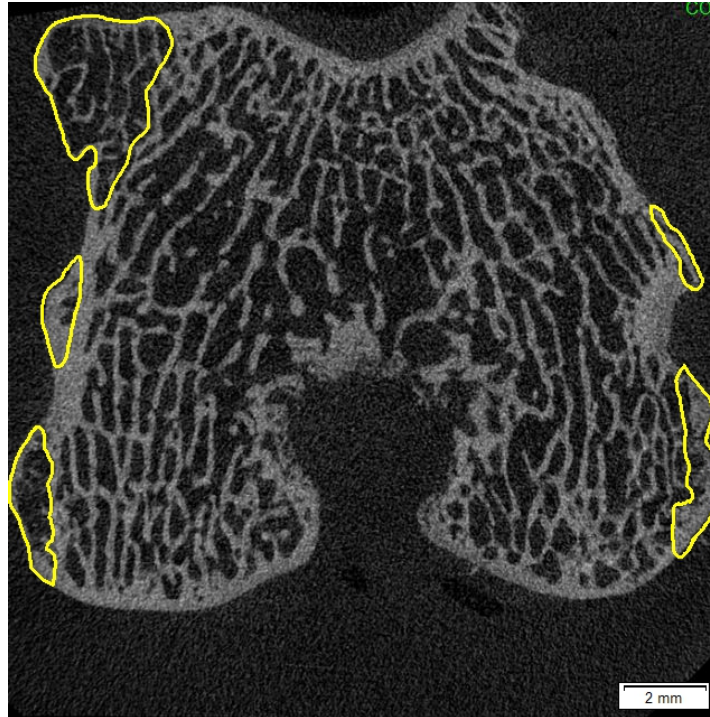


Figura 5. Corte transversal de micro-CT indicando el VOI seleccionado manualmente (color amarillo) para representar la formación de osteofitos en los cóndilos femorales.

5.1.2 Microestructura del hueso trabecular

El VOI seleccionado incluyó 200 cortes de tejido óseo del fémur y 100 cortes de la tibia. Los parámetros del hueso trabecular se obtuvieron utilizando el software CTAn y dibujando un VOI manual que incluía únicamente hueso trabecular. Los valores de umbral para el hueso se establecieron finalmente entre 55 y 255. Los valores de vBMD del hueso trabecular se obtuvieron comparando dos patrones de hidroxiapatita escaneados en las mismas condiciones que las muestras. Se determinaron parámetros morfométricos estándar para describir la microestructura trabecular subcondral (Pastoureau et al., 2010), incluyendo la fracción volumétrica ósea (BV/TV, %), el grosor trabecular (Tb.Th, mm), la separación trabecular (Tb.Sp, mm), el número de trabeculas (Tb.N, mm⁻¹) y el patrón óseo trabecular (Tb.Pf, mm⁻¹).

5.2 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

La evaluación macroscópica de cada muestra se llevó a cabo utilizando las guías de valoración de la OARSI (Lavery et al., 2010). Tras la apertura de la cavidad articular, se obtuvieron imágenes digitales utilizando un estereomicroscopio acoplado a una cámara digital (SZX12, DP71; Olympus, Japón). Se realizó una descripción en profundidad de los cambios asociados a la OA observados alrededor del cartílago

articular en los cóndilos femorales lateral y medial (CFL y CFM), la meseta tibial lateral y medial (MTL y MTM), ambos meniscos y la presencia de osteofitos. Los cambios observados se clasificaron de la siguiente manera: la evaluación del cartílago oscilaba entre 0 (superficie lisa) y 4 (erosión completa del cartílago); los cambios observados en los meniscos de 0 (normal) a 5 (presencia de fisuras completas) y, por último, la presencia de osteofitos de 0 (ausente) a 3 (grave).

5.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Una vez realizado el estudio tomográfico de la articulación femorotibial y la evaluación morfológica macroscópica, se procedió a realizar la extracción de las muestras en los 4 compartimentos articulares (CFL, CFM, MTL, MTM). Para ello, se practicaron varias secciones paralelas obteniendo dos cortes histológicos por compartimento. Además, se disecó un fragmento de membrana sinovial adyacente al ligamento rotuliano de cada articulación (Huang et al., 2015). La mitad de las secciones se procesaron para la realización de histología cualitativa en muestras descalcificadas e incluidas en parafina y la otra mitad se procesó sin descalcificar con inclusión en metacrilato y realización de lámina delgada para la evaluación cuantitativa (Figura 6).

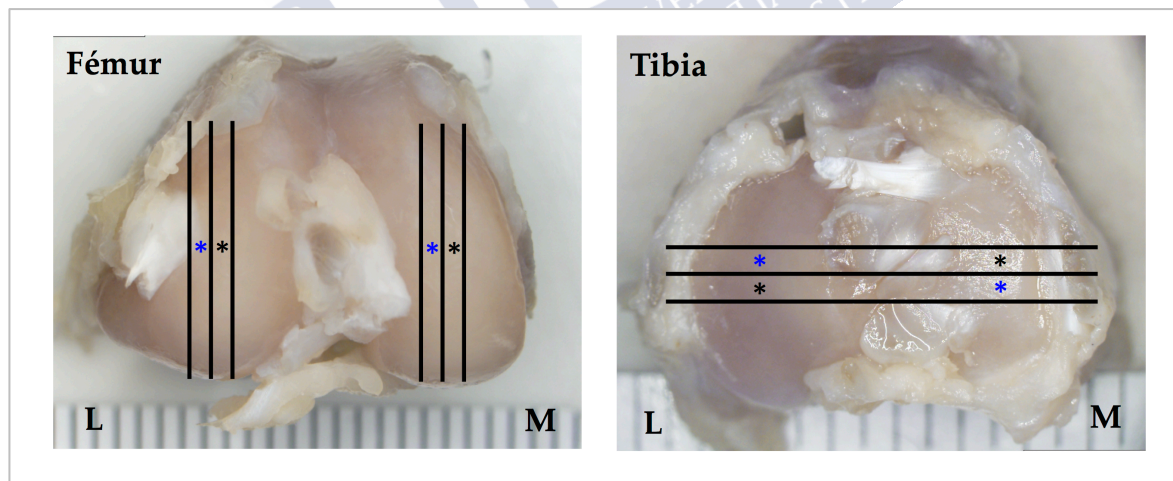


Figura 6. Representación de los cortes histológicos en los cóndilos femorales y mesetas tibial lateral y medial. De cada compartimento se obtuvieron dos secciones centrales paralelas para evaluación histológica cualitativa (*) y cuantitativa (*) (Las secciones histológicas (* o *) se alternaron de manera aleatoria). M, medial; L, lateral.

5.3.1 Histología cualitativa

Las secciones de cartílago y hueso obtenidas se descalcificaron (Osteodec, Bio-Optica, Milán, Italia), junto con las secciones de membrana sinovial, se incluyeron en parafina

y se realizaron secciones de aproximadamente 6 μm con un micrótomo (Leica RM 2255, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E). Todas las secciones histológicas fueron capturadas utilizando un microscopio óptico motorizado y un equipo digital de captura de imágenes (BX51, DP71, Olympus Corporation, Japón). La gravedad de las lesiones de OA se clasificó histológicamente utilizando una escala de gradación adaptada de la OARSI (Cook et al., 2010; Laverty et al., 2010) (Tabla 2). La evaluación histológica fue llevada a cabo de manera ciega por dos personas experimentadas.

Tabla 2. Evaluación histológica del cartílago articular y la membrana sinovial

CARTÍLAGO	
Severidad de la patología del cartílago	
Volumen normal, superficie lisa e intacta	0
Ondulaciones en la superficie, fisuras en la zona superficial	1
Fisuras hasta la zona media y/o erosiones superficiales	2
Fisuras en la zona profunda y/o erosiones a través de la zona media	3
Pérdida completa del espesor del cartílago	4
Severidad de la patología de los condrocitos	
Normal	0
Pérdida de células superficiales o densidad ligeramente incrementada con "clusters" ocasionales	1
Predominancia de pequeños "clusters" (2-4 células)	2
Predominancia de "clusters" grandes (≥ 5 células)	3
Predominancia de pérdida celular (necrosis/apoptosis)	4
"Tidemark"	
Intacto y distinguible	0
Pérdida y duplicación pero distinguible	1
Pérdida de "Tidemark", cruzado por vasos sanguíneos	2
Total	10
MEMBRANA SINOVIAl	
Características de las células superficiales	
1-2 capas de células	0
3-6 capas de células	1
> 6 capas de células	2
Hiperplasia	
Ausencia de hiperplasia	0
Pequeñas vellosidades	1
Hiperplasia en forma de dedos	2
Características de los infiltrados inflamatorios	
No infiltración celular	0
Infiltración inflamatoria de leve a moderada, pequeños folículos linfoides	1
Infiltración inflamatoria marcada y difusa, grandes folículos linfoides	2
Total	6

Parámetros evaluados en la evaluación de cambios histopatológicos en las muestras incluidas en parafina.

5.3.2 Histología cuantitativa

La otra mitad de las secciones histológicas fueron procesadas según el método descrito por Donath (Donath, 1985). Las muestras fueron deshidratadas en grados ascendentes de etanol, para posteriormente ser infiltradas e incluidas en una resina de metacrilato fotopolimerizable (Technovit 7200-VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Werheim, Alemania). Las secciones se cortaron y pulieron con una máquina pulidora (EXAKT Apparatebau, Norderstedt, Alemania) hasta aproximadamente $40\mu\text{m}$ de espesor y se tiñeron con la tinción Lévai-Laczkó (Laczkó y Levai, 1975).

Las secciones histológicas fueron también capturadas utilizando un microscopio óptico motorizado y un equipo digital de captura de imágenes (BX51, DP71, Olympus Corporation, Japón). Para la realización de la evaluación histomorfométrica microscópica se utilizaron los siguientes programas de análisis de imágenes: Cell-sens 1.5 (Olympus Corporation, Japón) e Image-Pro Premier 9.0.4 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Todas las muestras fueron procesadas y evaluadas en orden aleatorio por dos observadores experimentados, ciegos al tratamiento recibido.

Se realizaron las siguientes mediciones del grosor del cartílago y el hueso cortical subcondral de cada compartimento de la articulación femorotibial lateral y medial, expresándolas como distancias medias (Figura 7) :

- Grosor del cartílago no calcificado (nCg.Th, μm): definida como la distancia media entre la superficie del cartílago articular y el “tidemark”.
- Grosor del cartílago calcificado (cCg.Th, μm): definida como la distancia media entre el “tidemark” y la placa ósea subcondral.
- Grosor total del cartílago (CgTh, μm): definida como la suma del espesor de la capa no calcificada y de la calcificada.
- Grosor del hueso cortical subcondral (SB.Th, μm): definida como la distancia media entre el inicio de la placa ósea subcondral y el inicio del hueso trabecular.

Además, se cuantificó el grado de fibrilación de la superficie del cartílago. Este índice de fibrilación (FI) se evaluó y calculó como la diferencia entre la longitud de la superficie del cartílago (L) y una recta paralela con la misma línea de anchura (W).

Para la evaluación del hueso trabecular, se definió una región de interés (ROI) en un punto central incluyendo hueso trabecular subcondral subyacente al cartílago articular con un tamaño de $2.5 \times 1.5 \text{ mm}$ en el fémur y $1.5 \times 1.5 \text{ mm}$ en la tibia. Los parámetros de hueso trabecular subcondral evaluados fueron: Área trabecular subcondral (Tb.A, %), grosor trabecular (Tb.Th, mm), separación trabecular (Tb.S, mm) y número de trabeculas (Tb.N, mm^{-1}).

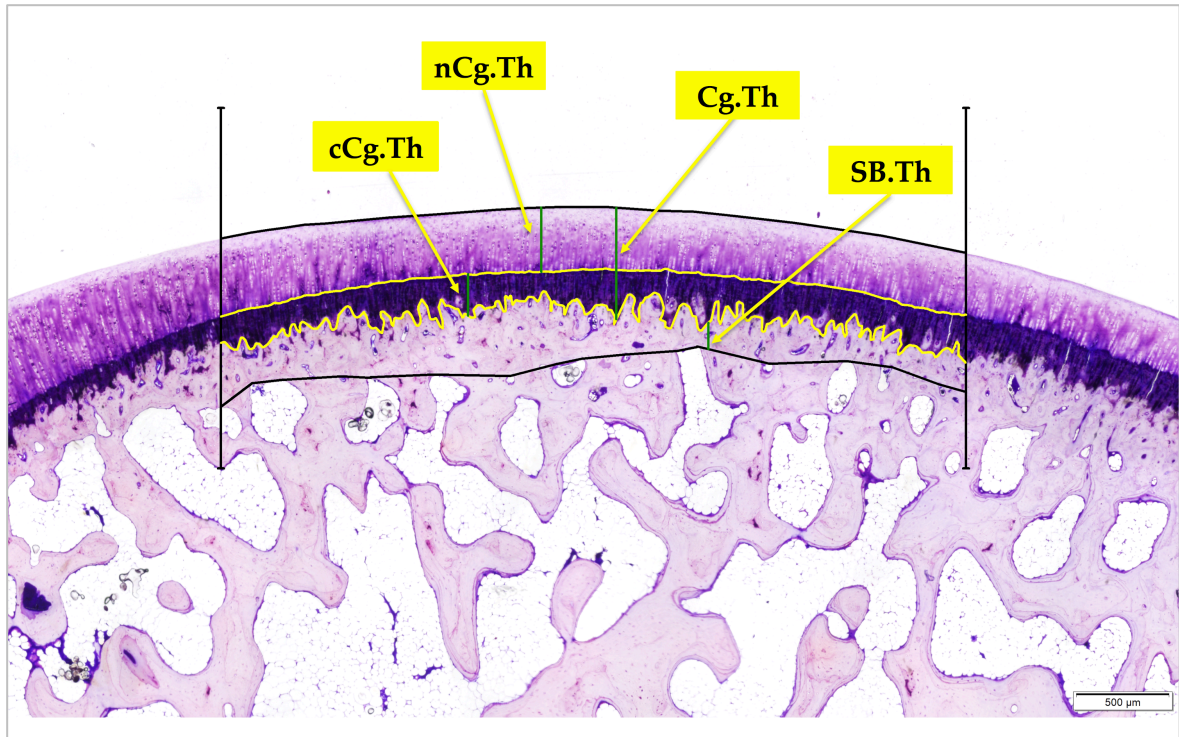


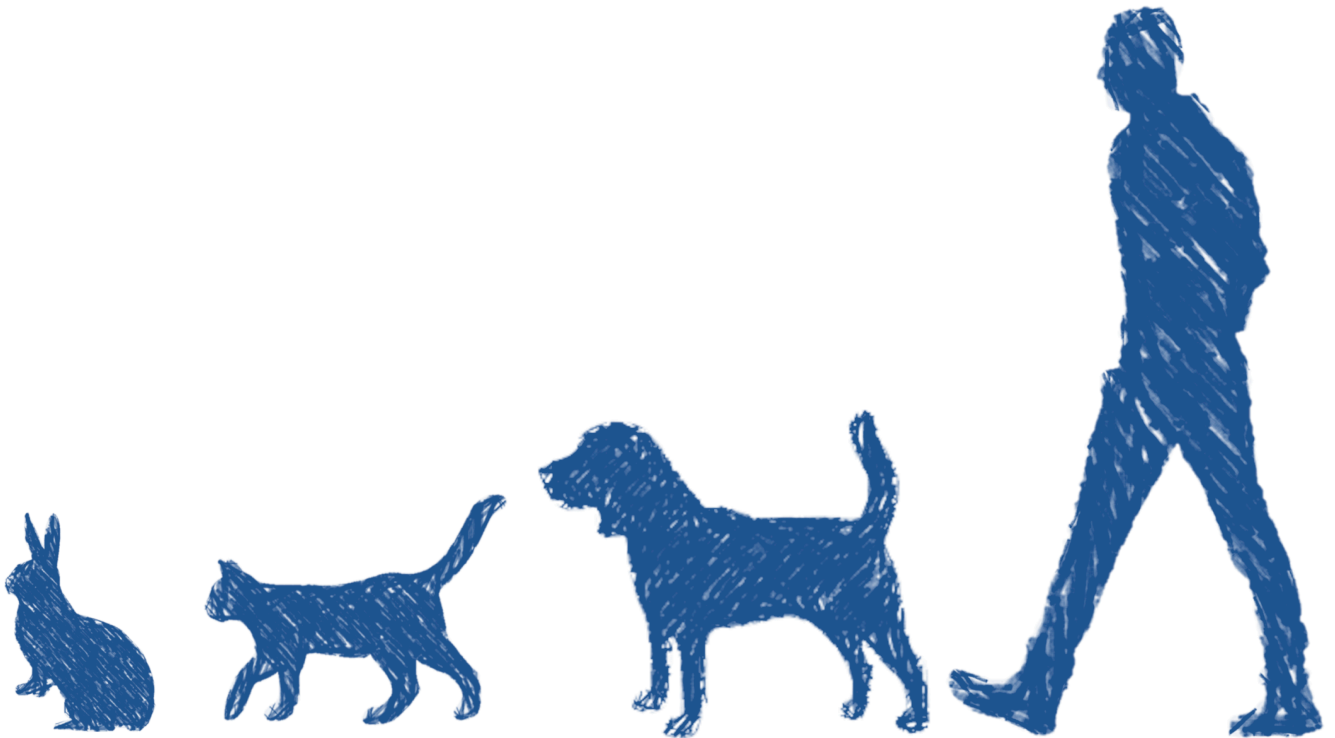
Figura 7. Evaluación histomorfométrica de las muestras calcificadas. nCg.Th, grosor del cartílago no calcificado; cCg.Th, grosor del cartílago calcificado, Cg.Th, grosor total del cartílago; SB.Th, grosor del hueso cortical subcondral.

6. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Durante el periodo de administración de los tratamientos dos de los animales fallecieron de manera inesperada, por lo que la evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo en los siguientes animales: grupo SHAM ($n=7$), grupo CONT ($n=8$), grupo RIS ($n=8$), grupo SYSADOA ($n=7$).

El tamaño muestral y el análisis estadístico se llevaron a cabo utilizando el software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Todos los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de Levene se utilizó para evaluar la igualdad de las varianzas de las variables normales y la comparación estadística se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). El análisis *post-hoc* se llevó a cabo aplicando el método de Holm-Sidak. En el caso de las variables no normales, la comparación estadística se realizó mediante la prueba H de Kruskal-Wallis y el análisis *post hoc* mediante la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS



CAPÍTULO I

Fernández-Martín, S., López-Peña, M., Muñoz, F., Permuy, M. y González-Cantalapiedra, A. 2021. Bisphosphonates as disease-modifying drugs in osteoarthritis preclinical studies: a systematic review from 2000 to 2020. *Arthritis Research & Therapy*. 23 (1):60.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02446-6>

Factor de impacto: 4.103

Clasificación por categoría: Rheumatology Q1 (8/32)

Contribución doctorando: La doctoranda realizó la búsqueda de las publicaciones científicas, la extracción e interpretación de los datos y la redacción del artículo. Se puede consultar en el propio artículo la contribución de los autores.

Autorización revista: Los autores de la publicación poseen lo derechos de *copyright* para el uso y reproducción de los contenidos del artículo.

© The Author(s). 2121. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

CAPÍTULO II

Fernández-Martín, S., Permuy, M., López-Peña, M., Muñoz, F., y González-Cantalapiedra, A. 2020. No effect of long-term risedronate use on cartilage and subchondral bone in an experimental rabbit model of osteoarthritis. *Frontiers in veterinary science*, 7:576212

DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.576212>

Factor de impacto: 2.245

Clasificación por categoría: Veterinary Sciences Q1 (19/141)

Contribución doctorando: La doctoranda fue una de las responsables principales del desarrollo del trabajo experimental y realizó la redacción del artículo. Se puede consultar en el propio artículo la contribución de los autores.

Autorización revista: Los autores de la publicación poseen lo derechos de *copyright* para el uso y reproducción de los contenidos del artículo.

Copyright © 2020 Fernández-Martín, Permuy, López-Peña, Muñoz and González-Cantalapiedra This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO III

Fernández-Martín, S., González-Cantalapiedra, A., Permuy, M., García-González, M., López-Peña, M. y Muñoz, F. 2021. Histomorphometric Quantitative Evaluation of Long-Term Risedronate Use in a Knee Osteoarthritis Rabbit Model. *Frontiers in Veterinary Science*. 8: 669815.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.669815>

Factor de impacto: 2.245

Clasificación por categoría: Veterinary Sciences Q1 (19/141)

Contribución doctorando: La doctoranda fue una de las responsables principales del desarrollo del trabajo experimental y realizó la redacción del artículo. Se puede consultar en el propio artículo la contribución de los autores.

Autorización revista: Los autores de la publicación poseen lo derechos de *copyright* para el uso y reproducción de los contenidos del artículo.

Copyright © 2021 Fernández-Martín, González-Cantalapiedra, Permuy, García-González, López-Peña, and Muñoz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO IV

Fernández-Martín, S., González-Cantalapiedra, A., Muñoz, F., García-González, M., Permuy, M., y López-Peña, M. 2021. Glucosamine and Chondroitin Sulfate: Is There Any Scientific Evidence for Their Effectiveness as Disease-Modifying Drugs in Knee Osteoarthritis Preclinical Studies?-A Systematic Review from 2000 to 2021. *Animals*. 11 (6):1608.

DOI: [https:// doi:10.3390/ani11061608](https://doi.org/10.3390/ani11061608)

Factor de impacto: 2.323

Clasificación por categoría: Veterinary Sciences Q1 (14/141)

Contribución doctorando: La doctoranda realizó la búsqueda de las publicaciones científicas, la extracción e interpretación de los datos y la redacción del artículo. Se puede consultar en el propio artículo la contribución de los autores.

Autorización revista: Los autores de la publicación poseen lo derechos de *copyright* para el uso y reproducción de los contenidos del artículo.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel; Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO V

Los resultados del capítulo V titulado **“Comparación de los efectos de la administración a largo plazo de una combinación de fármacos de acción lenta y risedronato sobre la articulación sinovial en un modelo experimental de osteoartritis”**, no se encuentran actualmente publicados.



Capítulo V. Comparación de los efectos de la administración a largo plazo de una combinación de fármacos de acción lenta y risedronato sobre la articulación sinovial en un modelo experimental de osteoartritis.

5.1 ANIMALES

Durante el procedimiento no se observaron cambios en el comportamiento, peso ni el estado general de los animales. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron sin complicaciones y los tratamientos fueron bien tolerados. Dentro de los 32 animales incluidos en el estudio, un conejo perteneciente al grupo SHAM y otro del grupo SYSADOA, fallecieron de manera inesperada.

5.2 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA

La evaluación morfológica macroscópica de las rodillas operadas evidenció que el modelo quirúrgico indujo cambios articulares degenerativos, incluyendo la presencia de erosiones y/o ulceraciones en la superficie del cartílago articular, erosión meniscal y formación de osteofitos. En cuanto al análisis estadístico de las rodillas operadas se determinaron cambios significativos entre el grupo de cirugía simulada (SHAM-OA) y el resto de los grupos evaluados (CONT-OA, RIS-OA y SYSADOA-OA). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con placebo (CONT-OA) y los que recibieron el tratamiento oral con risedronato o la combinación de SYSADOAs (RIS-OA y SYSADOA-OA), con excepción de los valores obtenidos en el cóndilo femoral medial, donde el grupo tratado con risedronato presentó un aumento significativo de las lesiones macroscópicas en comparación con el grupo de control. Sorprendentemente, los grados más altos de OA se determinaron en los grupos de tratamiento (RIS-OA y SYSADOA-OA) en todos los parámetros evaluados. En general, los cambios observados fueron ligeramente más pronunciados en el compartimento medial, donde se realizó la cirugía, que en el compartimento lateral, aunque no se determinaron diferencias significativas. En la Figura 1 se muestran los resultados de la evaluación macroscópica de las rodillas operadas.

En cuanto a las articulaciones sanas (HT), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados. Todas las articulaciones se clasificaron como normales o sanas mostrando una superficie articular lisa, blanquecina y brillante, sin presencia de osteofitos ni daño a nivel de los meniscos.

Los resultados del análisis macroscópico de las rodillas sanas (HT) y enfermas (OA) se recogen en la Tabla Suplementaria 1 (Anexos).

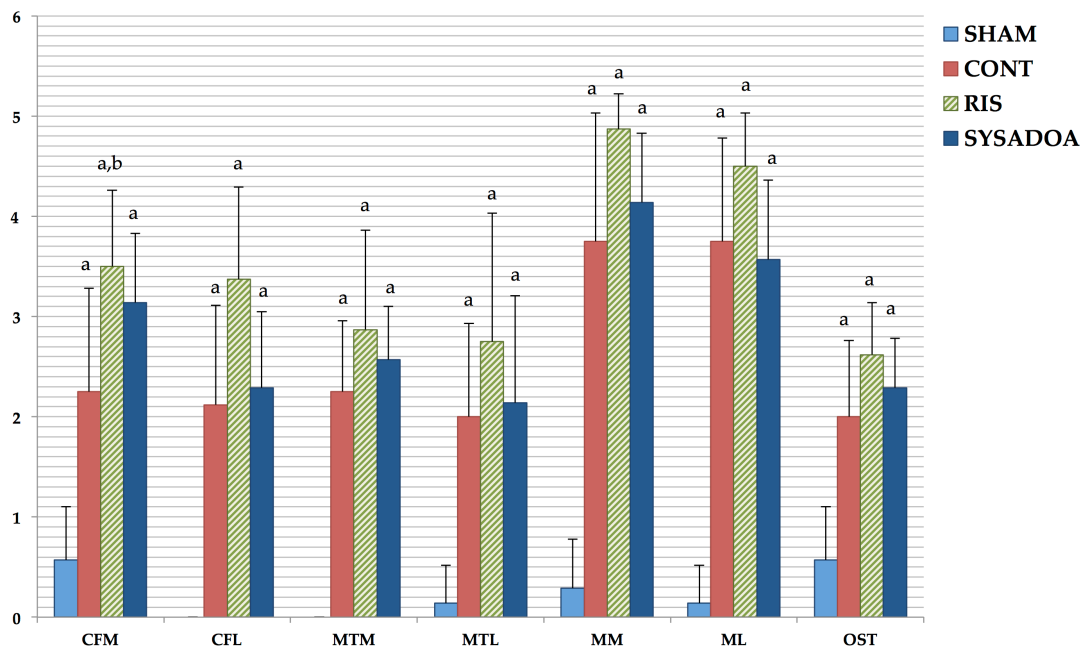


Figura 1. Evaluación macroscópica de las rodillas con OA. CFM, cóndilo femoral medial; CFL, cóndilo femoral lateral; MTM, meseta tibial medial; MTL, meseta tibial lateral; MM, menisco medial; ML, menisco lateral; OST, osteofitos. Valores expresados en medias \pm DS. Significación estadística $p < 0.05$: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT.

5.3 HISTOLOGÍA CUALITATIVA: EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR Y DE LA MEMBRANA SINOVIAL.

Los resultados de la evaluación histológica de las alteraciones microscópicas del cartílago articular y la membrana sinovial se muestran en la Tabla Suplementaria 2 (Anexos).

La evaluación microscópica del cartílago articular mostró grados significativamente más severos de daño articular en los grupos CONT-OA, RIS-OA y SYSADOA-OA que en el grupo SHAM-OA, en los cuatro compartimentos evaluados. Sin embargo, al igual que en la evaluación macroscópica, no se determinaron diferencias significativas al comparar el grupo tratado con placebo (CONT-OA) y los dos grupos de tratamiento (RIS-OA y SYSADOA-OA), presentando incluso valores ligeramente más elevados que el grupo control. En la Figura 2 se recogen los resultados de los parámetros evaluados a nivel del cartílago determinados en las rodillas OA y expresados como medias \pm DS.

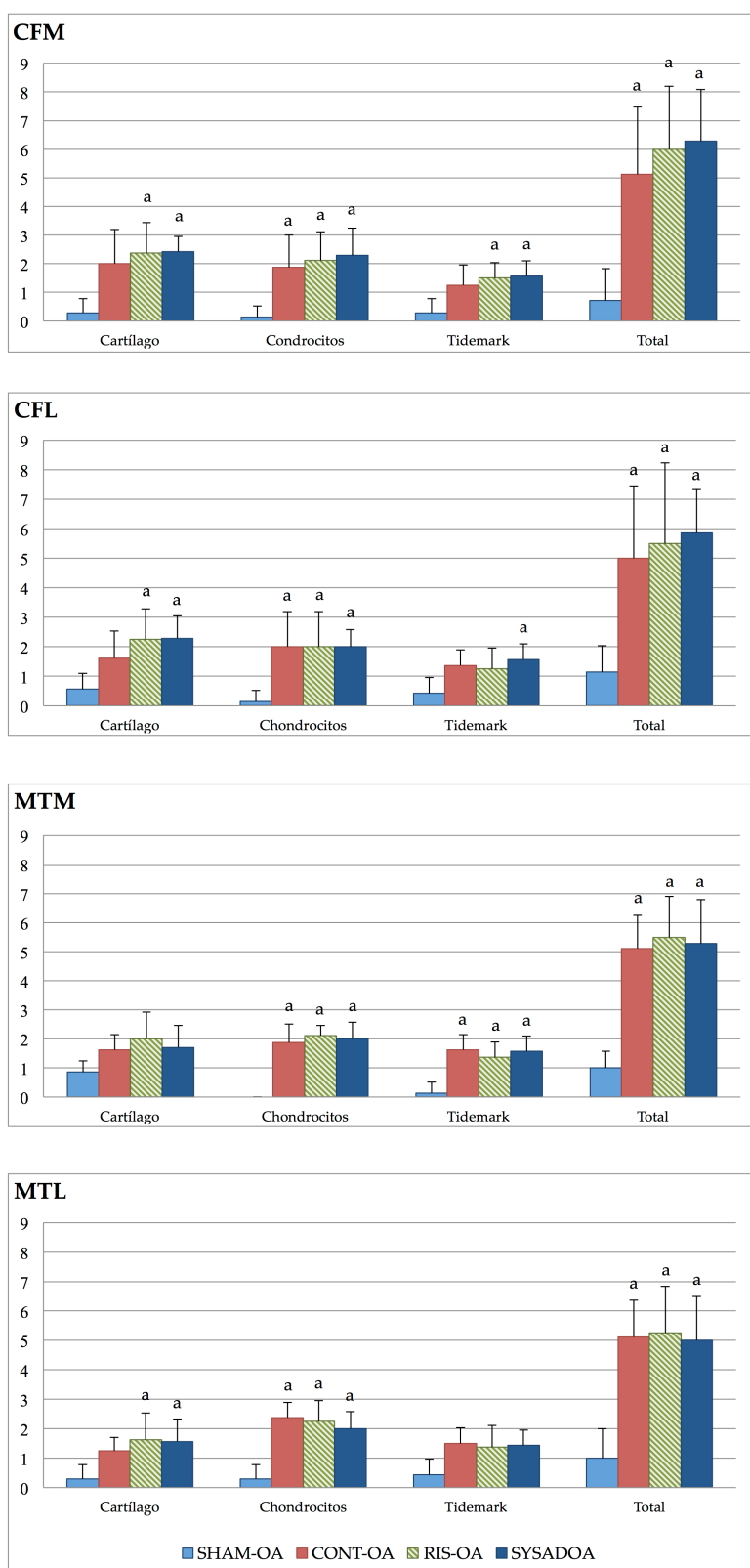


Figura 2. Evaluación histológica de las alteraciones microscópicas observadas en el cartílago articular de las rodillas OA. CFM, cóndilo femoral medial; CFL, cóndilo femoral lateral; MTM, meseta tibial medial; MTL, meseta tibial lateral. Valores expresados en medias \pm DS. Significación estadística $p < 0.05$: ^a vs. SHAM.

En relación a la evaluación de las articulaciones no operadas, en el análisis histológico de las muestras se observó una superficie del cartílago lisa, celularidad condrocitaria de apariencia normal e integridad del “tidemark”. Con excepción del grupo SHAM-HT que no presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con SHAM-OA, el resto de grupos (CONT-HT, RIS-HT y SYSADOA-HT) presentan valores significativamente más bajos de patología del cartílago que los observados en la articulación contralateral (OA).

En cuanto a la evaluación histológica de la membrana sinovial (Figura 3), los animales tratados con placebo (CONT-OA) mostraron los valores más altos de alteraciones a nivel sinovial en todos los parámetros evaluados, siendo estadísticamente significativos al compararlos con los resultados del grupo SHAM-OA. A diferencia de los resultados determinados a nivel del cartílago, en este caso los animales tratados con risedronato y SYSADOAs mostraron grados menos severos de OA. De los dos grupos de tratamiento, los animales tratados con la combinación de SYSADOAs fueron los que presentaron mayor actividad antiinflamatoria, observándose incluso significación estadística en los resultados totales en comparación con los animales tratados con placebo, así como valores cercanos a los determinados en el grupo de cirugía simulada.

En cuanto a los resultados observados en las rodillas no operadas (HT), al comparar cada grupo con su rodilla contralateral (OA), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre CONT-HT vs. CONT-OA y entre RIS-HT vs. RIS-OA, pero no entre SHAM-HT y OA, ni entre SYSADOA-HT y OA. El tratamiento con SYSADOAs mostró efectos antiinflamatorios en el manejo de la sinovitis en las rodillas con OA.

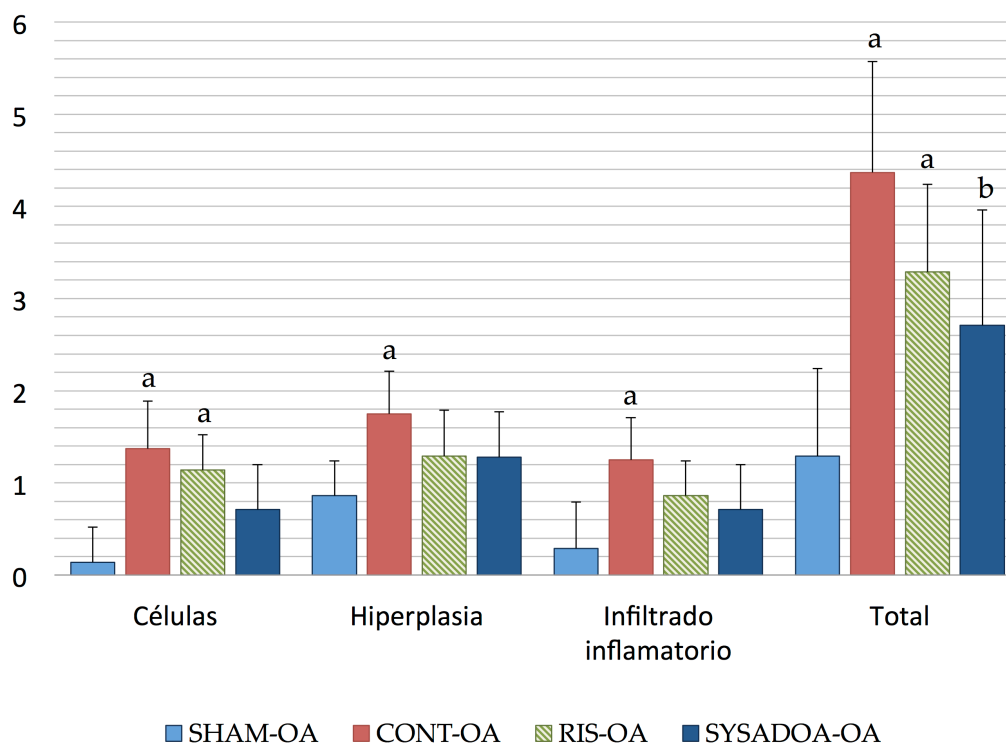


Figura 3. Evaluación microscópica histológica de los cambios observados en la membrana sinovial en las rodillas OA. Valores expresados en medias \pm DS. Significación estadística $p < 0.05$: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT.

5.4 ANÁLISIS MICROTOMOGRÁFICO

5.4.1 Formación de osteofitos

En relación al estudio microtomográfico de la presencia de osteofitos, no se observaron en ninguna de las articulaciones no-operadas evaluadas (HT). Por el contrario, todas las rodillas-OA presentaron cierto grado de desarrollo de osteofitos, aunque los animales pertenecientes al grupo SHAM-OA fueron los que mostraron valores significativamente menores. En cuanto al volumen total de osteofitos femorales (TV), los animales tratados con placebo mostraron los valores más altos, aunque no se determinaron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los animales que recibieron tratamiento. Tampoco hubo diferencias significativas en la evaluación de la fracción de volumen óseo (BV/TV) o en la densidad mineral (vBMD). El tratamiento con risedronato y con SYSADOAs no parece reducir el desarrollo de osteofitos óseos en las articulaciones con OA (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la evaluación con micro-CT de la formación de osteofitos en el compartimento femoral de las rodillas operadas (OA).

	SHAM-OA	CONT-OA	RIS-OA	SYSADOA-OA
TV (mm³)	7.03 ± 11.63	38.59 ± 19.58^a	34.21 ± 19.52^a	35.32 ± 15.25^a
BV (mm³)	3.96 ± 6.77	17.99 ± 8.12	19.90 ± 12.01	22.10 ± 11.69^a
vBMD (mg/cm³)	219.90 ± 275.34	407.93 ± 168.02	539.69 ± 184.69	575.47 ± 107.90

TV: Volumen total; BV/TV: Fracción volumétrica ósea; vBMD: Densidad mineral ósea volumétrica. Valores expresados en medias ± DS. Diferencias estadísticas $p < 0.05$: ^a vs. SHAM.

5.4.2 Análisis microestructural del hueso trabecular

Los resultados del análisis del hueso trabecular obtenidos mediante micro-CT se recogen en la Tabla 2.

Las principales diferencias estadísticas en la mayoría de los parámetros analizados se encontraron en las articulaciones con OA (CONT-OA, RIS-OA y SYSADOA-OA) en comparación con las extremidades contralaterales (HT) y con el grupo SHAM-OA. En general se observó que las extremidades lesionadas mostraban una tendencia a la disminución de vBMD, BV/TV y Tb.Th, así como un aumento del Tb.Sp. En cuanto a los grupos de control de cirugía, aunque apenas hubo diferencias estadísticas entre SHAM-HT y SHAM-OA, este último mostró cambios osteoartrosicos ligeramente superiores.

En general no se encontraron diferencias significativas entre el compartimento medial y lateral en los parámetros analizados. En relación a los tratamientos administrados, los animales tratados con la combinación de SYSADOAs mostraron valores ligeramente más bajos de patología osteoartrosica que los animales tratados con risedronato, aunque no se determinaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparaban con el grupo placebo (CONT). En el grupo de animales tratados con risedronato se observaron alteraciones de los parámetros trabeculares tanto en las rodillas OA como en las HT, siendo los principales cambios significativos identificados el aumento del Tb.Sp y la disminución del Tb.N.

5.5 ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO

5.5.1 Grosor del cartílago y del hueso cortical subcondral

Los resultados del análisis histomorfométrico 2D realizado en las muestras histológicas no descalcificadas se muestran detalladamente en la Tabla 3.

En cuanto a los parámetros analizados en la articulación femorotibial, destaca un aumento estadísticamente significativo de los valores determinados a nivel de la meseta tibial medial, en todas las rodillas evaluadas, tanto sanas como enfermas. Con respecto a la evaluación del grosor total del cartílago, se observa un aumento significativo de Cg.Th en las rodillas operadas (CONT-OA, RIS-OA y SYSADOA-OA) frente a la articulación sana contralateral y el grupo SHAM-OA.

En relación al análisis por separado de las capas del cartílago, al igual que en los valores Cg.Th, se observó que en los grupos OA, la capa de cartílago no calcificado (cCg.Th) mostraba valores significativamente más elevados que los observados en las articulaciones HT y en el grupo SHAM-OA. En cuanto al cartílago calcificado, apenas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados, sin embargo, ambos grupos de tratamiento (RIS-OA y SYSADOA-OA) parecen mostrar una tendencia al engrosamiento del cartílago.

Al contrario que lo observado en el cartílago, en la evaluación del SB.Th se observó un adelgazamiento de la capa cortical en las rodillas afectadas por OA. En este caso, los animales pertenecientes al grupo control son los que presentaron los valores más bajos determinándose diferencias estadísticamente significativas en comparación al grupo de cirugía simulada (SHAM-OA).

En resumen, los tratamientos administrados no lograron prevenir el engrosamiento del cartílago en ninguna de las capas evaluadas. Sin embargo, parecen presentar cierta tendencia a la conservación del hueso cortical subcondral, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparaban con el grupo de animales tratado con placebo.

5.5.2 Índice de fibrilación articular

Los resultados de la evaluación del índice de fibrilación a nivel del cartílago articular se muestran en la Figura 4.

Los valores más elevados de afectación del cartílago se observaron en los grupos CONT-OA, RIS-OA y SYSADOA-OA, determinándose diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los resultados de la rodilla contralateral HT. Asimismo, se determinaron diferencias estadísticamente significativas contra SHAM-OA. El tratamiento con fármacos de acción lenta y con risedronato, no logró mejorar los cambios patológicos del cartílago, no observándose diferencias significativas con respecto a los animales tratados con placebo.

En cuanto a la localización anatómica principal, los compartimentos mediales tanto en rodillas OA como HT, muestran valores significativamente mayores de fibrilación superficial que los compartimentos laterales, siendo esto especialmente marcado a nivel de la meseta tibial medial.

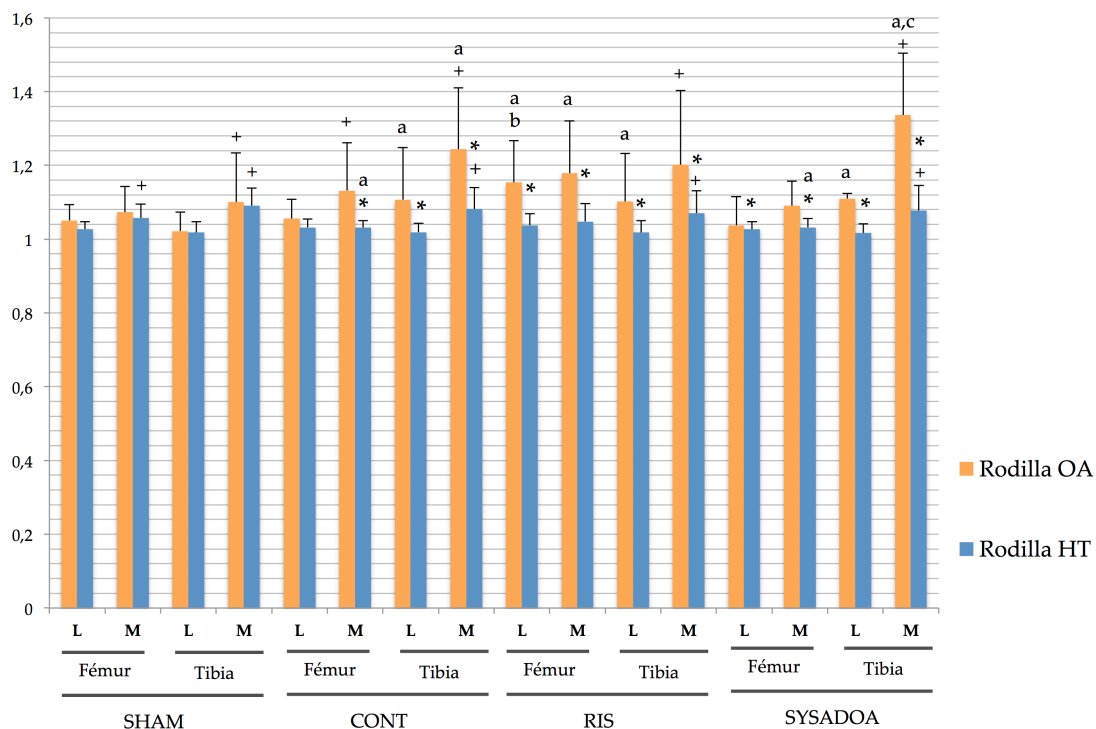


Figura 4. Índice de fibrilación del cartilago articular en las rodillas sanas (HT) y enfermas (OA). Valores expresados en medias \pm DS. Diferencias estadísticas $p < 0.05$: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT, ^c vs. RIS, ⁺ vs. compartimento lateral, * vs. rodillas OA.

Table 2. Análisis microtomográfico de las articulaciones sanas (HT) y osteoarthriticas (OA)

		vBMD (mg/cm ³)	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm ⁻¹)	Tb.Pf (mm ⁻¹)	
OA	SHAM	CFL	695 ± 43 ± 116.60	62.37 ± 4.56	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01	3.89 ± 0.24	3.03 ± 1.46
		CFM	708.81 ± 95.65	63.62 ± 3.52	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.02	3.94 ± 0.34	1.92 ± 2.97
		MTL	735.11 ± 106.36	61.92 ± 13.99	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.03	4.61 ± 0.42	-0.86 ± 4.89
		MTM	709.86 ± 98.55	59.20 ± 12.84	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.04	4.08 ± 0.71	3.66 ± 4.73
	CONT	CFL	452.39 ± 158.99^a	50.17 ± 8.59^a	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.06	3.60 ± 0.46	5.44 ± 2.22
		CFM	546.15 ± 134.36	55.94 ± 6.50	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.04	3.75 ± 0.39	3.89 ± 2.98
		MTL	487.01 ± 108.37^a	52.67 ± 6.46	0.12 ± 0.02 ⁺	0.12 ± 0.03	4.29 ± 0.55	3.39 ± 2.57
		MTM	537.37 ± 109.40	55.81 ± 6.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.06	3.97 ± 0.60	3.64 ± 3.15
	RIS	CFL	457.84 ± 170.76^a	50.40 ± 10.02^a	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.05^a	3.22 ± 0.43^a	3.81 ± 4.58
		CFM	456.73 ± 125.69^a	50.31 ± 6.47^a	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.04^a	3.23 ± 0.32^a	3.81 ± 2.63
		MTL	449.35 ± 226.52^a	53.23 ± 9.64	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.04^a	3.84 ± 0.50^a	2.15 ± 3.74
		MTM	446.98 ± 129.22^a	47.80 ± 9.30	0.15 ± 0.34	0.21 ± 0.08^a	3.22 ± 0.59⁺	4.47 ± 3.57
SYSADOA	CFL	484.64 ± 113.25^a	52.60 ± 5.88	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.03	3.73 ± 0.36	3.56 ± 1.32	
	CFM	575.01 ± 125.47	58.56 ± 6.33	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.03^c	4.02 ± 0.51^c	0.77 ± 3.43	
	MTL	487.87 ± 90.35^a	44.56 ± 10.77^a	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.02^a	4.36 ± 0.46	5.80 ± 4.82^a	
	MTM	393.80 ± 122.70^a	46.50 ± 8.40^a	0.11 ± 0.03	0.17 ± 0.03	4.49 ± 0.75^c	2.78 ± 2.94	
HT	SHAM	CFL	821.91 ± 74.53 [*]	67.07 ± 2.54 [*]	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.01 [*]	3.85 ± 0.18	2.52 ± 1.35
		CFM	861.11 ± 58.66 [*]	69.84 ± 1.55 ^{+,*}	0.18 ± 0.01 [*]	0.08 ± 0.01 [*]	3.94 ± 0.14	-0.69 ± 1.41 ⁺
		MTL	758.38 ± 185.16	69.23 ± 8.73	0.15 ± 0.03	0.08 ± 0.02	4.72 ± 0.80	-4.48 ± 7.01
		MTM	813.52 ± 82.51	63.30 ± 10.88	0.15 ± 0.04	0.09 ± 0.04	4.28 ± 0.85	0.29 ± 5.16
	CONT	CFL	773.16 ± 86.54 [*]	65.98 ± 3.34 [*]	0.17 ± 0.02 [*]	0.09 ± 0.02 [*]	3.84 ± 0.39	1.26 ± 1.71 [*]
		CFM	806.95 ± 101.34 [*]	67.77 ± 4.36 [*]	0.18 ± 0.02 [*]	0.10 ± 0.01 [*]	3.73 ± 0.38 ⁺	0.46 ± 2.44 [*]
		MTL	758.40 ± 227.16 [*]	59.06 ± 18.72	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.05	4.41 ± 0.44	-0.66 ± 7.21 [*]
		MTM	666.73 ± 231.44	53.37 ± 16.43	0.15 ± 0.06	0.15 ± 0.07	3.82 ± 0.61	3.75 ± 6.29
	RIS	CFL	758.16 ± 66.75 [*]	64.04 ± 3.09 [*]	0.19 ± 0.01 [*]	0.11 ± 0.01^{a,*}	3.33 ± 0.20^{a,b}	4.45 ± 2.47^b
		CFM	749.07 ± 94.66 [*]	64.11 ± 4.34^{a,*}	0.19 ± 0.01 [*]	0.11 ± 0.02^{a,*}	3.39 ± 0.26^a	3.54 ± 3.34^a
		MTL	733.36 ± 171.25 [*]	61.67 ± 14.99	0.16 ± 0.05	0.12 ± 0.06^a	4.02 ± 0.39	-1.00 ± 3.40
		MTM	688.92 ± 87.87 [*]	54.36 ± 12.42	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.09	3.44 ± 0.77	4.16 ± 6.43 ⁺
SYSADOA	CFL	739.81 ± 116.47 [*]	64.36 ± 4.72 [*]	0.17 ± 0.02 [*]	0.10 ± 0.02 [*]	3.91 ± 0.36^c	1.05 ± 2.73^c	
	CFM	790.44 ± 68.01 [*]	67.51 ± 3.08 [*]	0.17 ± 0.01 [*]	0.09 ± 0.01 [*]	3.95 ± 0.34^c	-0.15 ± 3.06	
	MTL	830.42 ± 55.45 [*]	65.09 ± 15.82 [*]	0.15 ± 0.04 [*]	0.09 ± 0.04 [*]	4.39 ± 0.44	-2.60 ± 6.02 [*]	
	MTM	770.42 ± 52.49 [*]	60.36 ± 13.68 [*]	0.16 ± 0.05 [*]	0.11 ± 0.05 [*]	3.90 ± 0.52	3.37 ± 2.62 ⁺	

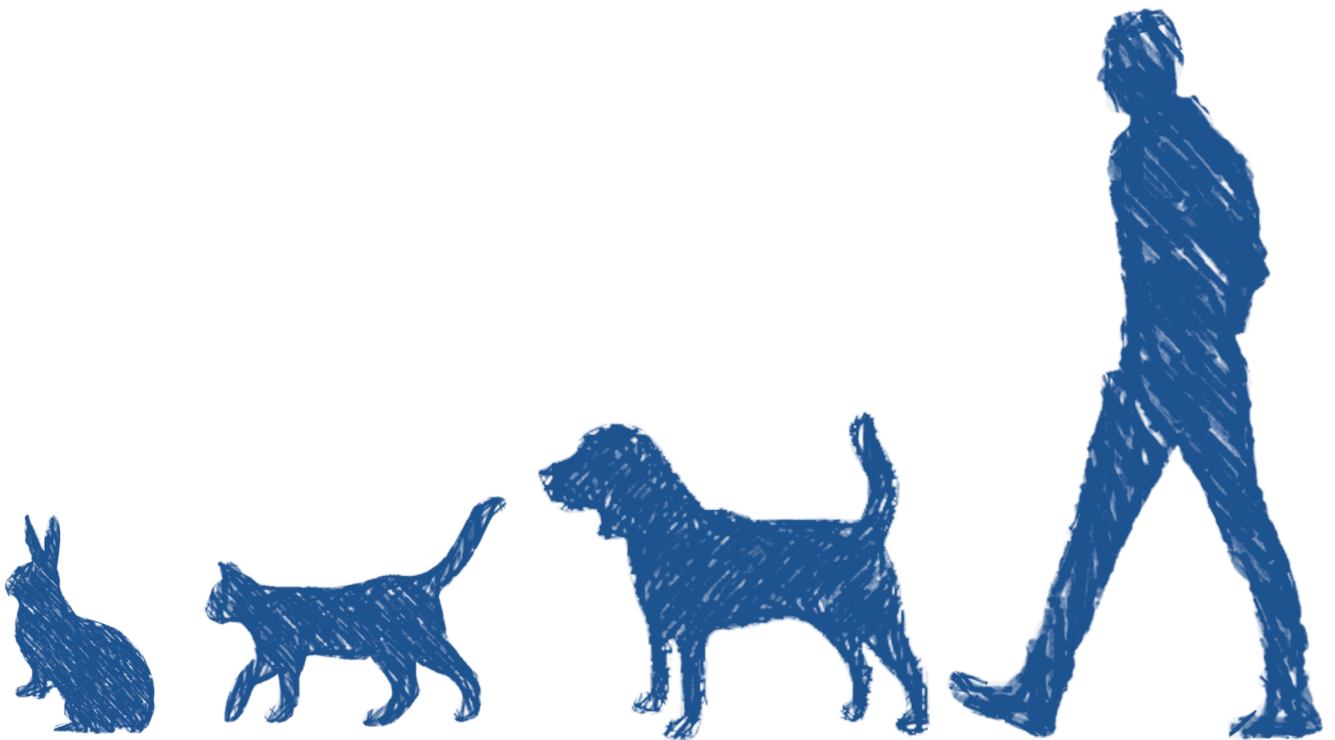
Resultados de micro-CT: vBMD: densidad mineral ósea volumétrica; BV/TV: fracción volumétrica ósea; Tb.Th: grosor trabecular; Tb.Sp: separación trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Pf: patrón óseo trabecular. Valores expresados en medias ± DS. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas en "negrita" p < 0.05: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT, ^c vs. RIS, ⁺ vs. compartimento lateral, * vs. rodillas OA.

Tabla 3. Análisis histomorfométrico de las muestras de histología no descalcificada.

		Rodillas operadas (OA)				Rodillas no operadas (HT)			
		nCg.Th (µm)	cCg.Th (µm)	Cg.Th (µm)	SB.Th (µm)	nCg.Th (µm)	cCg.Th (µm)	Cg.Th (µm)	SB.Th (µm)
SHAM	CFL	320.309 ± 86.494	133.678 ± 43.063	451.778 ± 100.526	361.842 ± 147.790	260.216 ± 79.728*	109.362 ± 31.616*	366.988 ± 96.717*	358.232 ± 111.824
	CFM	379.790 ± 97.011 ⁺	155.375 ± 45.108	522.270 ± 110.933 ⁺	340.748 ± 104.850	382.654 ± 87.563 ⁺	146.074 ± 41.411 ⁺	525.259 ± 104.031 ⁺	373.385 ± 116.019
	MTL	355.584 ± 163.745	95.495 ± 29.563	448.564 ± 175.741	344.143 ± 108.749	310.373 ± 151.200	92.881 ± 34.526	398.918 ± 171.338	373.498 ± 215.107
	MTM	624.107 ± 265.736 ⁺	84.027 ± 23.499	704.658 ± 254.571 ⁺	441.256 ± 106.809 ⁺	715.210 ± 243.390 ⁺	76.299 ± 18.140	789.353 ± 239.807 ⁺	449.576 ± 72.102^{b,*}
CONT	CFL	520.845 ± 171.810^a	158.688 ± 59.899	679.425 ± 206.994^a	246.684 ± 139.024^a	304.207 ± 101.308*	125.149 ± 38.097*	420.498 ± 129.299*	329.669 ± 100.098*
	CFM	436.743 ± 147.303 ⁺	139.988 ± 58.932	572.449 ± 184.332 ⁺	274.201 ± 104.087^a	358.531 ± 102.515*	122.610 ± 36.271	482.179 ± 107.477*	322.055 ± 116.019
	MTL	535.606 ± 241.846^a	120.427 ± 60.416	656.573 ± 251.545^a	248.440 ± 108.749^a	312.579 ± 182.486*	96.350 ± 27.803	404.799 ± 185.271*	293.562 ± 94.786
	MTM	756.003 ± 233.108 ⁺	77.776 ± 32.335 ⁺	828.564 ± 221.823 ⁺	394.260 ± 104.633 ⁺	639.137 ± 212.237 ⁺	81.648 ± 31.568 ⁺	718.039 ± 193.335 ⁺	373.393 ± 85.383 ⁺
RIS	CFL	493.070 ± 132.302^a	156.660 ± 62.264	642.563 ± 178.727^a	285.038 ± 90.048	302.623 ± 109.223*	124.295 ± 33.750	422.778 ± 136.178*	333.754 ± 103.800
	CFM	554.460 ± 171.635^{a,b}	176.681 ± 64.531	725.457 ± 190.125^{a,b}	278.985 ± 98.264	377.246 ± 58.078 ^{+,*}	128.306 ± 34.996*	499.817 ± 65.636*	357.536 ± 111.688*
	MTL	462.138 ± 235.621	105.771 ± 38.390	560.508 ± 249.060	309.239 ± 107.392	347.705 ± 219.623*	90.034 ± 25.023	433.986 ± 228.799*	415.006 ± 145.15^{b,*}
	MTM	660.410 ± 242.048 ⁺	113.562 ± 54.130^b	775.094 ± 222.842 ⁺	418.378 ± 177.734 ⁺	629.924 ± 334.027 ⁺	91.134 ± 41.502*	779.191 ± 317.938 ⁺	478.990 ± 136.79^{b,*}
SYSADOA	CFL	438.066 ± 86.174^a	141.990 ± 41.558	576.128 ± 121.740^a	294.139 ± 126.524	322.875 ± 117.488*	119.154 ± 28.056	438.500 ± 138.077*	370.305 ± 97.799*
	CFM	507.156 ± 145.522^a	166.042 ± 64.082	691.351 ± 183.581^{a,b,*}	293.920 ± 80.937	387.486 ± 131.362*	143.170 ± 45.333 ⁺	526.871 ± 149.741 ^{*,+}	375.306 ± 125.748*
	MTL	510.789 ± 187.060^a	101.226 ± 31.455	611.534 ± 194.738^a	280.406 ± 120.247	345.103 ± 182.941*	86.373 ± 27.524	426.796 ± 194.358*	312.628 ± 131.165
	MTM	624.372 ± 240.026	88.929 ± 30.884	732.018 ± 269.726	530.018 ± 313.273 ⁺	618.051 ± 201.277 ⁺	96.070 ± 40.452	707.456 ± 182.718 ⁺	454.422 ± 119.97^{b,*}

nCg.Th, grosor del cartílago no calcificado; cCg.Th, grosor del cartílago calcificado; Cg.Th, grosor total del cartílago; SB.Th, grosor del hueso cortical subcontral. Valores expresados en medias ± DS. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas en "negrita" p< 0.05: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT, ⁺ vs. compartimento lateral, * vs. rodillas OA.

DISCUSIÓN GENERAL



DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de la alta prevalencia de la OA en medicina humana y veterinaria, en la actualidad las opciones terapéuticas disponibles para la prevención de la enfermedad son realmente limitadas (He et al., 2020). En relación a esto, los modelos animales preclínicos proporcionan una excelente oportunidad de resolver la actual controversia acerca de la efectividad de los posibles fármacos modificadores de la enfermedad en el progreso de la OA, al permitirnos evaluar de manera directa sus efectos sobre las diferentes estructuras y tejidos de la articulación sinovial (Poole et al., 2010; Kuyinu et al., 2016).

En nuestro caso, a lo largo de esta tesis doctoral hemos intentado elucidar el papel de algunos bifosfonatos y fármacos de acción lenta como posibles estrategias terapéuticas en el manejo de esta compleja patología, utilizando un modelo de OA inducido quirúrgicamente. La selección de este modelo animal, en concreto, el modelo ACLT más meniscectomía medial en conejo, se realizó en función de sus múltiples y conocidas ventajas, como un inicio de acción rápido, reproducibilidad y eficacia (Lavery et al., 2010). Asimismo, nuestro grupo de investigación dispone de una gran experiencia en el manejo de este modelo animal. En los últimos años, el grupo ha desarrollado un proyecto de investigación en el que se ha evaluado la eficacia de la administración a corto plazo de varios fármacos de acción lenta y cuyos resultados han dado lugar a la publicación de tres artículos científicos (Permuy et al., 2014, 2015a; 2015b). Aunque se determinaron respuestas positivas iniciales con la administración de la mayoría de los tratamientos, los efectos a largo plazo de este tipo de fármacos en investigación preclínica son prácticamente desconocidos, por lo que se consideró interesante continuar con la misma línea de investigación y evaluar la efectividad de estos tratamientos tras su administración durante un periodo más prolongado.

En el presente estudio, el modelo quirúrgico experimental indujo cambios degenerativos en el cartílago articular y el hueso subcondral, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las articulaciones operadas y las no-operadas en la mayoría de los parámetros analizados. En cuanto a la localización de las lesiones, los principales cambios patológicos observados fueron ligeramente más pronunciados en el compartimento medial que en el compartimento lateral. Estos

resultados coinciden con los de otras investigaciones con modelos ACLT en conejo, donde también se reportaron mayores cambios degenerativos en los compartimentos mediales (Batiste et al., 2004b; Florea et al., 2015; Huang et al., 2015). En relación a esto, al igual que lo observado en animales, en un estudio realizado en personas con OA avanzada de rodilla, también se determinaron grados más severos de la enfermedad en el compartimento medial (Bobinac et al., 2003).

A diferencia de lo reportado en bípedos, algunos autores han identificado en roedores como modelos de OA, una tendencia a desplazar parte de su peso hacia las extremidades anteriores y no sólo hacia la extremidad contralateral (Wang et al., 2011; Bagi et al., 2015b). Los cambios degenerativos asociados a la OA pueden ser muy variables entre las diferentes especies e incluso entre individuos del mismo grupo (Batiste et al., 2004b). En este sentido, el uso de la articulación contralateral como control sano de la enfermedad es ampliamente utilizado en investigación de la OA, permitiéndonos reducir el número de animales experimentales utilizados. Otra ventaja es que la utilización de la extremidad contralateral podría disminuir la variabilidad intraespecífica (Boyd et al., 2000a). Sin embargo, debemos de tener en cuenta que aunque la actividad física de los animales de laboratorio es bastante limitada, los cambios de carga y en el patrón de la marcha son respuestas naturales de los animales lesionados con objeto de prevenir un mayor daño articular y reducir el dolor en la extremidad operada (Bagi et al., 2015b). Por todo ello, en el diseño experimental es importante incluir animales control no inducidos quirúrgicamente (grupo SHAM), que permitan la identificación de posibles alteraciones de la carga hacia el miembro no operado (Florea et al., 2015). De acuerdo con otras publicaciones (Boyd et al., 2000b; Florea et al., 2015), las rodillas no-operadas incluidas en nuestro estudio no mostraron cambios significativos asociados a la OA en la mayoría de los parámetros analizados, lo que sugiere su validez como controles sanos. Sin embargo, aunque no se determinaron diferencias significativas entre las articulaciones SHAM-HT y el resto de grupos (CONT-HT, RIS-HT, SYSADOA-HT), estos últimos parecen mostrar algunos cambios estructurales ligeramente superiores, lo que podría indicar una posible respuesta inicial relacionada con la reestabilización de los animales hacia la articulación sana.

El principal objetivo de esta tesis doctoral fue dilucidar si las terapias antirresortivas y los fármacos de acción lenta podían influir de algún modo en la progresión de la OA. A pesar de que las investigaciones sobre la OA deberían incluir todos los tejidos que componen la articulación sinovial, el cartílago ha sido durante muchos años, el principal foco de atención de la enfermedad (Pritzker et al., 2006; Glasson et al., 2010). En la actualidad, sabemos que, para proporcionar una amplia comprensión de la enfermedad, en investigación preclínica es necesario el uso de varias técnicas de diagnóstico que permitan analizar adecuadamente todos los elementos de la

articulación sinovial al completo. Como expusimos al inicio de este trabajo de investigación, las técnicas de evaluación morfológica macroscópica e histológica proporcionan una evaluación completa del estado del cartílago articular. Sin embargo, solo nos permiten obtener datos cualitativos o parcialmente cuantitativos de los cambios osteoartrosicos y en ocasiones, pueden presentar problemas en cuanto a su validez y reproducibilidad (Pritzker et al., 2006; Pastoureau et al., 2010). Por todo ello, decidimos incluir evaluaciones cuantitativas de análisis 2D y 3D de los tejidos sinoviales (histomorfometría y micro-CT), que nos permitiesen obtener resultados objetivos, así como realizar la evaluación detallada de los cambios producidos a nivel del hueso subcondral.

A pesar de que la comunidad científica lleva más de 20 años estudiando el efecto de estos fármacos, las discrepancias entre los estudios experimentales y la falta de evaluación a largo plazo dificultan su evidencia científica y, en la actualidad, su recomendación para el manejo de la OA es discutible. En este contexto, nos pareció muy interesante realizar dos revisiones sistemáticas de la literatura, que evaluaran los resultados obtenidos en los estudios preclínicos con modelos animales llevados a cabo en los últimos 20 años, con objeto de intentar clarificar su papel en la articulación sinovial de las rodillas con OA, así como determinar diferentes aspectos o condicionantes que pudieran estar involucrados en su efectividad. Los resultados de cada uno de los capítulos que componen esta tesis doctoral serán discutidos a continuación.

Capítulo I: “Bisphosphonates as disease-modifying drugs in osteoarthritis preclinical studies: a systematic review from 2000 to 2021”

El objetivo de esta revisión sistemática en el desarrollo de la tesis doctoral fue estudiar el efecto de los bifosfonatos en modelos animales experimentales de OA, así como intentar clarificar su función como posibles DMOADs. Para ello, se seleccionaron 26 publicaciones en las que se evaluaron 5 tipos diferentes de BPs. Según nuestro conocimiento, hasta el momento ningún estudio anterior había evaluado el efecto de estos fármacos sobre los tejidos sinoviales y los biomarcadores de OA en modelos preclínicos publicados. Sin embargo, recientemente se ha publicado una revisión bibliográfica en la que se analizaron los resultados del uso de los BPs en estudios preclínicos y clínicos de la OA, concluyendo que existían discrepancias apreciables entre ambos tipos de estudios (Eriksen et al., 2020).

Aunque en algunos casos la traslación de los hallazgos preclínicos al tratamiento clínico de la OA puede no ser muy fiable, los modelos preclínicos animales pueden ofrecer una excelente oportunidad evaluando el efecto directo de diferentes terapias en las articulaciones afectadas (Bendele, 2001). En esta revisión sistemática, las

principales especies evaluadas fueron los conejos y las ratas, aunque también se incluyeron estudios con ratones, cobayas y perros. En cuanto al modelo de inducción de OA, más de la mitad de los estudios incluidos utilizaron modelos de inducción quirúrgica ($n=16$), siendo la ACLT ($n=10$) la técnica quirúrgica más utilizada, seguida por los modelos de inducción química ($n=5$), modelos espontáneos ($n=3$) y, por último, modelos de inducción no invasivos ($n=2$). Estos resultados difieren ligeramente de los descritos por otros autores de estudios preclínicos sobre la OA, donde los principales modelos utilizados fueron los modelos espontáneos, seguidos de modelos de inducción quirúrgica y modelos inducción química (Contartese et al., 2020). Además de las diferencias en el tipo de modelo animal seleccionado entre los diferentes estudios incluidos en esta revisión, se observaron otras variables como el tipo de bifosfonato evaluado, así como la posología y la vía de administración del fármaco. Asimismo, también se observaron diferencias en la duración de los tratamientos y el momento de inicio de estos. Por todo ello, la comparación de los resultados con objeto de obtener conclusiones significativas sobre la eficacia de los fármacos es realmente complicada.

En cuanto a la duración de los tratamientos, como pudimos observar en esta revisión, apenas hay estudios preclínicos que evalúen el efecto de los BPs a largo plazo. En este sentido, debemos tener en cuenta que la respuesta farmacológica en estas circunstancias es prácticamente desconocida. Por todo ello, es posible que el efecto condroprotector inicial observado en algunas publicaciones pueda no mantenerse en el tiempo. Curiosamente, en uno de los estudios incluidos se evaluó la eficacia del alendronato tras 7, 14 y 56 días de tratamiento. Aunque todas las evaluaciones se basaban en tratamientos a corto plazo, se observó que los animales presentaron una respuesta positiva inicial; sin embargo, el alendronato no fue capaz de detener la progresión de la OA a largo plazo (Khorasani et al., 2015). De manera similar, en otro estudio en el que se evaluó el efecto del risedronato en cobayas, los autores concluyeron que el fármaco no fue capaz de prevenir el daño articular tras 6 meses de tratamiento (Thomsen et al., 2013). Por el contrario, Dearmin et al. (Dearmin et al., 2014), determinaron que la administración de ácido zoledrónico en un modelo experimental en la especie canina durante un año de tratamiento, dio lugar a menor daño articular y menores cambios en los biomarcadores de OA.

En cuanto a los estudios clínicos, un interesante ensayo en humanos realizado durante 2 años concluyó que el risedronato no tenía capacidad para reducir la evolución de la OA, aunque se detectó una reducción de los marcadores de degradación del cartílago (Bingham et al., 2006). En otro ensayo clínico en pacientes con OA de cadera, también realizado durante 2 años, se observó que la dosis estándar de alendronato para el tratamiento de la osteoporosis de 35 mg/semana, no presentaba un efecto modificador de la enfermedad evidente. Sin embargo, la

administración de este tratamiento, disminuyó el dolor clínico y mostró niveles más bajos de fragmentos de CTX-II (Nishii et al., 2013). En este sentido, parece que, para la obtención de respuestas óptimas protectoras a nivel del cartílago, podrían ser necesarias dosis de BPs más altas que las utilizadas en el tratamiento de la osteoporosis. Entre las 26 publicaciones incluidas en este estudio, en 5 de ellas se evaluó la eficacia de estas terapias a distintas dosis. En líneas generales, se determinó que los BPs parecen reducir los cambios osteoartrotróficos de manera dosis-dependiente, mostrando mejores efectos condroprotectores cuando se utilizaban dosis altas (Hayami et al., 2004; Strassle et al., 2010; Dearmin et al., 2014; Khorasani et al., 2015; She et al., 2017).

Otro punto de interés en la evaluación de la efectividad de estos fármacos lo constituye el momento de inicio de la administración de los tratamientos en relación con el estadio de la OA. Con respecto a esto, se ha observado que las terapias preventivas y tempranas de BPs se relacionan con mejores resultados. Por el contrario, las administraciones tardías se han asociado a una menor eficacia condroprotectora. En esta revisión se identificaron 3 publicaciones en las que se evaluaron los efectos del alendronato o del ácido zoledrónico tras administraciones en diferentes fases de la enfermedad (Strassle et al., 2010; Mohan et al., 2013; Zhu et al., 2013). Aunque se observaron ciertos efectos positivos sobre el hueso subcondral, independientemente del momento de inicio del tratamiento, los resultados de los efectos sobre el cartílago revelaron una evidente eficacia dependiente del tiempo. Como sugiere Strassle et al. (Strassle et al., 2010), este hecho podrían explicar las diferencias de resultados determinadas entre los estudios preclínicos y los clínicos, dado que algunos de los resultados positivos observados en los estudios experimentales con modelos animales, podrían estar relacionados con la administración de los BPs de manera preventiva o en etapas muy tempranas de la enfermedad; mientras que en los ensayos clínicos, las terapias suelen iniciarse cuando la enfermedad se encuentra en una fase avanzada. Por todo ello, podemos concluir que el estadio de la enfermedad en el que se inician los tratamientos es un factor clave en la eficacia de las terapias antirresorptivas.

Como introdujimos previamente, en medio de esta gran variabilidad experimental es muy difícil sacar conclusiones específicas sobre la eficacia de estos fármacos y su posible efecto DMOAD. En general, en este estudio observamos que la administración de BPs parece mostrar un efecto positivo a nivel de la conservación del hueso subcondral, así como menor alteración de los biomarcadores asociados a la OA. Sin embargo, la administración de estos fármacos no parece suprimir la formación de osteofitos. En cuanto a la conservación del cartílago, los efectos observados varían bastante entre los estudios evaluados, pero en líneas generales, el ácido zoledrónico fue el BPs que mostró mayor respuesta condroprotectora (Muehleman et al., 2002;

Strassle et al., 2010; Dearmin et al., 2014; Lampropoulou-Adamidou et al., 2014a; Cinar et al., 2015; She et al., 2017).

En cuanto a las estructuras sinoviales analizadas entre los diferentes estudios, los parámetros más evaluados fueron la degradación cartílago y los cambios en el hueso subcondral. Aunque en la actualidad se ha descrito el papel de la sinovitis en la progresión de la OA y en la aparición de signos clínicos (Henrotin et al., 2014), en las publicaciones incluidas solo 4 de los estudios evaluaron el estado de la membrana sinovial (Strassle et al., 2010; Moreau et al., 2011; Permuy et al., 2014; Cinar et al., 2015). Teniendo en cuenta que las terapias antirresortivas parecen mostrar un efecto antiinflamatorio positivo, se necesitan más estudios, que evalúen la sinovitis articular y que permitan clarificar el efecto de estos fármacos a este nivel.

En cuanto a la evaluación de la calidad de los estudios preclínicos, de manera similar a lo observado por otros autores (Contartese et al., 2020), se identificaron carencias en la descripción de algunos ítems. Por ejemplo, la mitad de las publicaciones incluidas mostraban declaraciones éticas incompletas con falta de información en relación con las directrices sobre el cuidado de los animales. Por otro lado, la mayoría de los estudios no proporcionaron detalles precisos sobre los protocolos de anestesia y analgesia, el método de eutanasia o información adicional relevante como la procedencia de los animales. En casi la mitad de las publicaciones se facilitaron detalles incompletos sobre el alojamiento y la cría. En cuanto al tamaño de la muestra, sólo un estudio incluyó el cálculo del tamaño muestral de los animales (Adebayo et al., 2017). En relación con las evaluaciones del riesgo de sesgo, se identificó un “alto riesgo de sesgo” en la asignación de los grupos, el alojamiento de los animales y en el cegamiento de los cuidadores/investigadores (Shmagel et al., 2019). Adicionalmente, muchos de los ítems tuvieron que ser evaluados como “riesgo poco claro”, lo que evidencia una clara falta de inclusión de información por parte de los investigadores en los experimentos. Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que es esencial mejorar la calidad de información aportada en los estudios experimentales con animales.

Capítulo II: “No Effect of Long-Term Risedronate Use on Cartilage and Subchondral Bone in an Experimental Rabbit Model of Osteoarthritis”

En esta tesis doctoral uno de nuestros objetivos fue evaluar el efecto de la administración de risedronato oral en la progresión de la OA post-traumática. Para ello, en la primera fase de la evaluación de este fármaco, utilizamos evaluaciones cualitativas macroscópicas e histológicas de las muestras descalcificadas para determinar los cambios asociados a la OA en cartílago y membrana sinovial. Además, incluimos el análisis del hueso subcondral mediante escáner micro-CT de alta

resolución, lo que nos permitió evaluar la microestructura 3D del hueso trabecular, el volumen de la placa ósea subcondral y la formación de osteofitos. El risedronato ha sido ampliamente estudiado en el conejo como modelo preclínico de OA, (Doschak et al., 2004, 2005; MacNeil et al., 2008; Permuy et al., 2014). Sin embargo, según el conocimiento de los autores, ningún estudio anterior ha analizado la influencia de la administración de risedronato a largo plazo en el cartílago y hueso subcondral en un modelo de OA en conejo.

En la evaluación macroscópica de las rodillas incluidas en este estudio, aunque algunos autores observaron que la administración de BPs mostraba una mejoría significativa de la superficie del cartílago (Hayami et al., 2004; Panahifar et al., 2012), en nuestro estudio el risedronato no mostró ninguna mejora en el estado del cartílago y no suprimió la formación de osteofitos. En relación con el análisis histológico de las muestras descalcificadas, se observó que el tratamiento con risedronato durante 24 semanas, no fue capaz de reducir el daño del cartílago, mostrando cambios degenerativos similares o incluso mayores que los animales tratados con placebo. Estos resultados coinciden con lo publicado en otros estudios preclínicos, donde la administración de BPs no mostró efectos condroprotectores en la articulación sinovial (Thomsen et al., 2013; Bagi et al., 2015a). Contrariamente, algunos autores reportaron efectos significativamente positivos en la estadificación de la OA, determinando menores cambios degenerativos en los animales tratados con bifosfonatos (Muehleman et al., 2002; Hayami et al., 2004; Jones et al., 2010; Shirai et al., 2011; Zhang et al., 2011; Salman et al., 2019). Adicionalmente, en un estudio anterior publicado por nuestro grupo de investigación, se observó un modesto efecto condroprotector tras la administración de risedronato aunque en este caso la terapia se había administrado a corto plazo (Permuy et al., 2014). En cuanto a la evaluación histológica de la membrana sinovial, observamos que la administración de risedronato mostró grados menos severos de patología e inflamación sinovial que el grupo tratado con placebo, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos. Esta ligera actividad antiinflamatoria asociada al tratamiento con BPs coincide con lo publicado por otros autores en estudios con modelos animales de OA (Moreau et al., 2011; Permuy et al., 2014; Cinar et al., 2015).

En relación al desarrollo de osteofitos, de acuerdo con los hallazgos de otros grupos de investigación (Doschak et al., 2005; MacNeil et al., 2008; Jones et al., 2010), observamos que el risedronato no fue capaz de suprimir ni retrasar la osteofitogénesis. En el caso de otros BPs como el alendronato, algunos autores han reportado reducciones significativas en el desarrollo de los osteofitos asociadas a su administración (Hayami et al., 2004; Jones et al., 2010; Panahifar et al., 2012). Esto parece estar relacionado con una reducción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), lo que podría inhibir el desarrollo de los osteofitos. Sin embargo, aunque se

ha demostrado que el risedronato también reduce el TGF- β , no parece ser capaz de suprimir la osteofitogénesis (Jones et al., 2010). En nuestro estudio todas las extremidades operadas presentaron cierto grado de desarrollo de osteofitos, incluido el grupo SHAM-OA. Aunque se determinaron valores realmente bajos en este grupo, es importante señalar que solo el hecho de proceder a la apertura de la cápsula articular parece ser capaz de inducir la formación de osteofitos. En nuestra opinión, este punto es realmente interesante puesto que incluso algunos procedimientos clínicos considerados mínimamente invasivos, como la artrocentesis o la artroscopia, podría predisponer a una OA secundaria.

Además del daño progresivo observado en el cartílago durante el avance de la OA, se han descrito algunas adaptaciones óseas como la esclerosis de la placa ósea del hueso subcondral. En este sentido, algunos estudios han identificado aumentos significativos del grosor de la placa ósea tras el tratamiento con BPs (Ding et al., 2008b; Zhang et al., 2011), mientras que otros no observaron diferencias entre los grupos de control y de tratamiento (Shirai et al., 2011). Al igual que Thomsen et al. (Thomsen et al., 2013), observamos que la administración de risedronato durante 24 semanas mostraba una ligera tendencia a aumentar el grosor de la placa ósea subcondral en comparación con los animales no tratados. En nuestro caso, esto fue mayormente identificado en los compartimentos laterales de todas las articulaciones evaluadas (OA y HT). Esto podría estar relacionado con una alteración de los procesos de remodelación ósea causados por los efectos del fármaco. Sin embargo, estos cambios no parecen dar lugar a una reducción del daño del cartílago articular e incluso podrían reducir la capacidad de distribuir la carga mecánica sobre el cartílago aumentando la gravedad de la OA en las articulaciones.

El alcance exacto de los efectos que la administración de BPs ejerce sobre el cartílago articular y el hueso subcondral todavía no está claro en la actualidad. Shirai et al. (Shirai et al., 2011), demostraron el efecto condroprotector del alendronato, apoyando la hipótesis de que la prevención de la pérdida del hueso periarticular podría reducir la erosión del cartílago. Por el contrario, Ding et al. (Ding et al., 2008b), observaron que el alendronato no mostraba un efecto condroprotector y sugirieron que el aumento del grosor y densidad de la placa ósea subcondral, asociado a la administración de BPs, podría causar un aumento de la progresión de la OA promoviendo el estrés del cartílago en el soporte de la carga.

En cuanto al estudio del hueso trabecular, los principales cambios que observamos en las rodillas con OA fueron: la disminución de vBMD y BV/TV, así como menor Tb.Th (Boyd et al., 2000a; b; Batiste et al., 2004b). Aunque los resultados pueden ser diferentes según el momento de la evaluación y el procedimiento seleccionado para la inducción de la OA (Pauly et al., 2015), la tendencia principal según avanza la

enfermedad es un mayor deterioro de la calidad del hueso trabecular (Dedrick et al., 1993). Algunos autores han reportado un aumento del volumen, grosor y número de trabéculas tras la administración de BPs en comparación con los animales no tratados (Ding et al., 2003; MacNeil et al., 2008; Shirai et al., 2011; Zhang et al., 2011; Bagi et al., 2015a). En el caso específico del risedronato, se observó un efecto positivo en la preservación de las propiedades del hueso trabecular en administraciones a corto plazo en un modelo de OA en conejo (Doschak et al., 2004; MacNeil et al., 2008). Sin embargo en nuestro caso, la administración de risedronato a largo plazo no parece preservar el hueso trabecular, observándose una disminución de la calidad ósea con pérdida vBMD, una tendencia a la disminución de BV/TV y Tb.N, y un aumento de la Tb.Sp.

Según algunas publicaciones, la administración temprana de BPs, ayuda a la preservación de las propiedades óseas periarticulares, ralentizando la progresión de la enfermedad (MacNeil et al., 2008; Strassle et al., 2010). A este respecto como comentamos en el capítulo I, los mayores efectos positivos parecen estar relacionados con la administración preventiva o temprana del fármaco (Hayami et al., 2004). Desafortunadamente, cuando el cartílago articular está dañado, las terapias antirresortivas no parecen ser eficaces. Los conejos utilizados en nuestro estudio recibieron el tratamiento con risedronato sólo 3 semanas después de la cirugía y, a pesar de ello, su administración no consiguió mantener la salud del cartílago ni prevenir la pérdida de hueso y la formación de osteofitos, como habían sugerido otros autores (MacNeil et al., 2008).

Presumiblemente, la falta de consenso acerca de la administración de risedronato y su capacidad modificadora de la enfermedad, podría estar asociada a la biodisponibilidad oral del fármaco, al estadio de la OA, al uso de diferentes modelos animales de investigación y la dosis de los tratamientos administrados. Como también se sugirió en el capítulo I, es posible que sean necesarias dosis de BPs más elevadas que las utilizadas en los tratamientos de osteoporosis para conseguir la inhibición de la degradación del cartílago y la supresión de la formación de osteofitos (Ding et al., 2003; Hayami et al., 2004). En cuanto a la duración de los tratamientos, la mayoría de los estudios se basan en cortos periodos de tiempo. Por este motivo, se necesitan más estudios a largo plazo que permitan profundizar y validar estos hallazgos, como paso fundamental para comprender la fisiopatología de la enfermedad en estadios avanzados, así como para evaluar el efecto de las intervenciones terapéuticas en el tejido articular.

Capítulo III. “Histomorphometric quantitative evaluation of long-term risedronate use in knee osteoarthritis rabbit model”

En el presente estudio, se analizaron los efectos cuantitativos histomorfométricos de la administración de risedronato en el modelo experimental tras 6 meses de tratamiento. Para ello, se realizó la evaluación mediante histomorfometría 2D en las preparaciones de histología no descalcificadas evaluando los cambios estructurales en cartílago y hueso subcondral en diferentes áreas anatómicas. Asimismo, se incluyó el estudio 3D con micro-CT para completar la caracterización del hueso trabecular y evaluar la correlación entre ambas técnicas.

Entre los principales parámetros histomorfométricos evaluables, el grosor del cartílago es uno de los más estudiados en modelos animales y probablemente, uno de los más fáciles de cuantificar (Pastoureau et al., 2010). Sin embargo, las publicaciones científicas muestran gran heterogeneidad de resultados. Por un lado, se ha descrito la degradación y pérdida de la superficie del cartílago durante la progresión de la OA (Sabatini et al., 2005; Hayami et al., 2006; Pinamont et al., 2020). Mientras que en otros estudios, se observó el aumento y la hipertrofia de las capas del cartílago (Hwa et al., 2001; Daubs et al., 2006; Wang et al., 2011). En concordancia con esto último, en nuestro caso se determinó una marcada tendencia al engrosamiento del cartílago en las articulaciones con OA en todas las localizaciones anatómicas determinadas, siendo esto especialmente marcado en la meseta tibial medial. Por el contrario, Pinamont et al. (Pinamont et al., 2020), observaron una disminución del grosor del cartílago total en un modelo quirúrgico de ratón a las 12 semanas post-inducción de OA, probablemente relacionado con la fibrilación del cartílago, o incluso, su degeneración completa. Del mismo modo, Hayami et al. (Hayami et al., 2006) identificaron un significativo adelgazamiento del cartílago no calcificado en la MTM en dos modelos de rata inducidos quirúrgicamente, entre 4 y 10 semanas tras la cirugía. Por otro lado, Hagiwara et al. (Hagiwara et al., 2009) no observaron diferencias significativas en el grosor del cartílago articular utilizando un modelo de inmovilización física en rata. Esta falta de resultados consistentes en cuanto al grosor del cartílago podría estar relacionada con la deficiencia de protocolos de medición, el modelo animal seleccionado y el uso de la rodilla contralateral como control de articulación sana. En cuanto a la respuesta al tratamiento con BPs, en un estudio anterior publicado por nuestro grupo de investigación (Permuy et al., 2014), se observó que el tratamiento con risedronato a corto plazo, parecía prevenir el engrosamiento del cartílago, mostrando valores similares a los observados en los animales sanos. Sin embargo, en el caso actual no observamos esta capacidad a largo plazo, determinando resultados similares a los obtenidos en el grupo placebo.

En cuanto a los cambios patológicos observados a nivel óseo, encontramos una notable relación entre el daño a nivel del cartílago y del hueso subcondral subyacente, tal y como se ha descrito en numerosas publicaciones (Hwa et al., 2001; Fahlgren et al., 2003; Wang et al., 2011; Bagi et al., 2015b). En concordancia con esto, nuestro análisis mostró una tendencia al adelgazamiento del hueso subcondral en las articulaciones con OA. Por el contrario, en otras publicaciones se observó un mayor grosor de la capa ósea en las articulaciones osteoartísticas (Fahlgren et al., 2003; Daubs et al., 2006). En estadios tempranos o leves de la OA, Wang et al. (Wang et al., 2011), sugirieron que tanto el cartílago como el hueso subcondral podrían responder inicialmente con un aumento de la actividad remodeladora que se manifestaría con un aumento de la capa del cartílago no calcificado. Por el contrario, la respuesta inicial del hueso subcondral al estrés mecánico podría aumentar la actividad de los osteoclastos, lo que daría lugar a una placa ósea subcondral más fina.

En este estudio también se determinaron los índices de fibrilación de la superficie del cartílago. Éste índice se considera un indicador histopatológico de la degradación del colágeno en la OA (Sabatini et al., 2005). Algunos autores han descrito que la fibrilación focalizada es uno de los principales cambios observados en modelos animales quirúrgicos (Hayami et al., 2006). Las terapias con BPs han demostrado efectos condroprotectores significativos en estudios preclínicos, evidenciando menor número de ulceraciones y menor fibrilación articular (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014a; Permuy et al., 2014). Por el contrario, en nuestro análisis tras 6 meses de tratamiento, el risedronato no pareció mejorar los cambios patológicos a nivel del cartílago, mostrando valores similares a los observados en los animales no tratados. De acuerdo con otras publicaciones, (Pastoureau et al., 2003), las articulaciones con OA mostraron una fibrilación de la superficie articular significativamente mayor que las articulaciones no operadas. Sin embargo, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que, aunque este parámetro puede ser indicativo de la gravedad del cartílago, también puede disminuir, debido a la erosión completa del mismo en fases avanzadas de la enfermedad, no siendo en estos casos un parámetro fiable para determinar el alcance de las lesiones del cartílago (Pinamont et al., 2020).

En cuanto al análisis del hueso trabecular realizado con microtomografía computerizada en 3 áreas anatómicas diferentes, a diferencia de lo publicado por otros autores que observaron una mayor pérdida de hueso trabecular en los cóndilos femorales (Batiste et al., 2004b), en nuestro caso no se encontraron diferencias significativas entre el compartimento femoral y tibial, ni tampoco entre ninguna de las áreas analizadas. Al igual que lo observado en el estudio perteneciente al capítulo II de esta Tesis, los principales cambios observados asociados a la OA fueron la reducción del BV/TV, menor Tb.Th y Tb.N y un aumento del Tb.Sp. De manera interesante, y en contra a lo publicado en algunos modelos preclínicos, Bobinac et al.

(Bobinac et al., 2003), observaron un aumento significativo de BV/TV y Tb.Th en las articulaciones con OA en el hombre, así como una disminución de los valores Tb.N y Tb.Sp. En este caso, algunos autores han sugerido que las diferencias observadas entre la OA en humanos y los estudios preclínicos con animales, podrían estar relacionadas con las variaciones entre la OA primaria y la post-traumática (Chappard et al., 2006). Adicionalmente, se deben tener en cuenta otros factores, como la presencia de enfermedades comórbidas, como la diabetes mellitus tipo II y la hipertensión arterial, que se han relacionado con una pérdida ósea significativa en la placa subcondral (Wen et al., 2013). Con respecto a la administración de risedronato, aunque varios estudios preclínicos han mostrado una preservación positiva del hueso subcondral (Doschak et al., 2004; MacNeil et al., 2008), en nuestro caso la administración a largo plazo del risedronato no mostró ningún efecto beneficioso a nivel del hueso trabecular, mostrando incluso valores de Tb.N más bajos y de Tb.Sp más elevados, que los animales tratados con placebo. Curiosamente, estos cambios se observaron también en el grupo de RIS-HT, especialmente en el área central. Esto podría explicarse debido a las propiedades antirresortivas inherentes a estas terapias, pero también podría estar relacionado con una alteración de la carga hacia la extremidad sana contralateral, observándose diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo SHAM-HT.

Como algunos autores han señalado (Boutroy et al., 2011), la histomorfometría ósea presenta algunas limitaciones asociada a su condición 2D y al tamaño y selección anatómica de los cortes histológicos, representando sólo una fracción muy pequeña del tejido articular. En nuestro caso, las correlaciones observadas entre la histomorfometría 2D y los análisis obtenidos por micro-CT fueron débiles. En la evaluación 2D del hueso trabecular, no se identificaron apenas diferencias significativas entre los grupos del estudio. Por el contrario, la evaluación 3D mediante micro-CT identificó con mayor precisión los cambios en la microarquitectura del hueso trabecular asociados a la OA.

Las alteraciones observadas tanto en el cartílago como en el hueso subcondral reflejan una respuesta a la inestabilidad quirúrgica y, en consecuencia, a la alteración de la carga biomecánica. Tal y como esperábamos, debido a la localización de la cirugía experimental (menisectomía medial parcial), los compartimentos mediales mostraron una mayor respuesta a la sobrecarga, especialmente en la meseta tibial (Hwa et al., 2001). Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela, puesto que las rodillas no-operadas también mostraron un marcado engrosamiento del cartílago y del hueso cortical subcondral, de manera que el conejo podría presentar de manera fisiológica un mayor grosor a este nivel articular que debe ser tenido en cuenta en la evaluación de los cambios asociados a la OA. En relación con los resultados determinados en las 4 regiones de interés establecidas al inicio del

estudio, en nuestro caso las mediciones de los cóndilos femorales fueron demasiado variables para establecer conclusiones. Con respecto a las mesetas tibiales, los valores más altos se identificaron en las zonas 1 y 2, correspondientes a las zonas internas articulares.

En cuanto a la efectividad del risedronato, en nuestro estudio su administración a largo plazo no logró disminuir la respuesta hipertrófica del cartílago, la fibrilación superficial ni prevenir la pérdida de hueso subcondral. Tal y como comentamos previamente, algunos autores han observado que el inicio temprano del tratamiento con BPs mostraba una mayor eficacia condroprotectora y una mejor calidad del hueso subcondral que las administraciones tardías (Strassle et al., 2010; Mohan et al., 2013; Zhu et al., 2013). Por lo tanto, es posible que en nuestro modelo de ACLT y meniscectomía medial parcial en conejo, el daño del cartílago se desarrollase de manera muy rápida y que, cuando iniciamos la administración de RIS, los cambios generados fueran demasiado severos. No obstante, la situación clínica real tanto en medicina humana como veterinaria, es que las terapias suelen iniciarse cuando la OA se encuentra en un estado avanzado (Strassle et al., 2010). Por este motivo, las técnicas de diagnóstico precoz, como las nuevas modalidades de imagen avanzada y los marcadores bioquímicos, deberían ofrecer una nueva oportunidad para el futuro manejo de la enfermedad.

Capítulo IV. “Glucosamine and chondroitin sulfate: is there any scientific evidence for their effectiveness as disease-modifying drugs in knee osteoarthritis preclinical studies? – A systematic review from 2000 to 2021

El objetivo de esta revisión sistemática fue evaluar el efecto de la administración de glucosamina y condroitín sulfato en la articulación sinovial de la rodilla y en los biomarcadores específicos en estudios preclínicos de OA. Para ello, se incluyeron 22 publicaciones que incluían 3 tipos diferentes de condroprotectores, glucosamina sulfato, glucosamina hidrocloreuro y condroitín sulfato, administrados solos o en diferentes combinaciones. Los estudios fueron meticulosamente analizados con objeto de dilucidar su influencia directa en los principales elementos estructurales articulares y bioquímicos de las articulaciones con OA.

Teniendo en cuenta el modelo animal experimental, en los estudios considerados para esta revisión las especies más utilizadas fueron ratas y conejos, mientras que sólo un estudio empleó el ratón como modelo animal (Ivanovska y Dimitrova, 2011). Estos resultados difieren de lo observado en otras revisiones preclínicas sobre la OA, en las que la especie animal más utilizada fue el ratón (Shmagel et al., 2019; Contartese et al., 2020). En lo que respecta a la inducción de la enfermedad, de acuerdo con otras publicaciones, los modelos de inducción quirúrgica de la OA fueron

uno de los más seleccionados (Lampropoulou-Adamidou et al., 2014b; Kuyinu et al., 2016). En cuanto a los modelos espontáneos, aunque se ha descrito una mayor aproximación al proceso natural de la OA primaria (McCoy, 2015), en este estudio, pudimos observar que solo una publicación utilizó un modelo espontáneo en cobayas (Taniguchi et al., 2012).

Al igual que lo observado en la revisión sistemática realizada sobre los bifosfonatos (capítulo I), en el presente estudio se observó una gran heterogeneidad entre todos los protocolos experimentales. En un intento de reducir la variabilidad entre los estudios, se excluyeron los artículos en los que los animales habían recibido los tratamientos mediante inyección intraarticular (Shikhman et al., 2005; Scotto D'Abusco et al., 2008; Frisbie et al., 2013; Gibson et al., 2014; Fonsi et al., 2020). Aunque los resultados de los estudios demostraron que las terapias locales con SYSADOAs mostraban un efecto condroprotector positivo y buena actividad antiinflamatoria, decidimos evaluar otras vías de administración, como la oral y la intraperitoneal, con objeto de analizar los efectos sistémicos y no locales de la glucosamina y el condroitín sulfato.

En cuanto al régimen terapéutico, también observamos notables diferencias entre los estudios, tanto en la frecuencia de administración como en la dosis seleccionada. En este sentido, 2 de los artículos incluidos en esta revisión examinaron la eficacia del CS (Sun et al., 2018) y de la GS (Wang y Cai, 2018) a diferentes dosis. Ambos estudios concluyeron que los SYSADOAs evaluados parecían reducir los cambios del cartílago y las alteraciones de los biomarcadores de manera dosis-dependiente.

Adicionalmente, algunas publicaciones evaluaron el posible efecto condroprotector de diferentes combinaciones de SYSADOAs, así como su combinación con otras terapias y fármacos. En este contexto, se observaron efectos beneficiosos en la asociación de glucosamina y risedronato (Permuy et al., 2015b; Salman et al., 2019), glucosamina y péptidos de colágeno marino (Ohnishi et al., 2013) y glucosamina hidrocloreto, condroitín sulfato y fursultiamina, en el que sólo el grupo combinado con la adición de la vitamina mostró un efecto condroprotector significativo (Kobayashi et al., 2005). Por último, en un estudio en el que se utilizó un modelo experimental de OA en ratas, se observaron respuestas positivas incrementadas con la asociación de glucosamina, condroitín sulfato y el tratamiento con fotobiomodulación (Sanches et al., 2017).

En cuanto a la combinación de glucosamina y condroitín sulfato, Silva et al. (Silva et al., 2009) observaron que esta asociación redujo significativamente el dolor articular y las alteraciones histológicas del cartílago, de manera más eficiente que la administración aislada de glucosamina. Asimismo, Terencio et al. (Terencio et al., 2016) demostraron los efectos condroprotectores de la combinación de CS y

glucosamina, así como la reducción de la inflamación sinovial. Por el contrario, Roman-Blas et al. (Roman-Blas et al., 2017) no encontraron ningún efecto beneficioso en la terapia combinada de CS más GS o GH. En relación con esto, en uno de los estudios en el que se utilizó ratón como modelo de inducción química, se determinó el efecto de la glucosamina sulfato o hidrocloreuro sobre la degradación del cartílago y la resorción ósea. Los resultados mostraron una menor eficacia histológica con la presentación de GS en comparación con la GH, cuando ambas se administraban en las mismas condiciones (Ivanovska y Dimitrova, 2011). Sin embargo, los estudios son contradictorios, ya que otros han sugerido una menor biodisponibilidad y alivio sintomático en la formulación hidrocloreuro (Bhathal et al., 2017). En nuestra revisión se determinaron efectos condroprotectores ligeramente superiores en los estudios con GS en comparación con los estudios que incluyeron GH (80% vs. 67%). No obstante, algunos autores han determinado que, debido a la heterogeneidad de resultados observada en los estudios clínicos en humana, determinar qué formulación podría ser más eficaz continúa siendo extremadamente difícil (Henrotin et al., 2012b).

Otro de los puntos de interés en la evaluación de la efectividad de los SYSADOAs, sería el momento de inicio del tratamiento en relación con el momento de inducción de la OA. Los artículos incluidos en esta revisión se agruparon en tres protocolos distintos: administraciones preventivas, tempranas y tardías. Entre estos estudios, los efectos condroprotectores más elevados se determinaron en las terapias preventivas (Silva et al., 2009; Taniguchi et al., 2012; Terencio et al., 2016), seguidas de las tardías, que mostraron valores ligeramente superiores a los de los estudios con administraciones tempranas. Estos hallazgos fueron ligeramente diferentes a los observados en el capítulo I de esta tesis doctoral, donde se determinó una evidente eficacia del tratamiento con BPs dependiente del estado previo del cartílago, y observándose por tanto mejores efectos condroprotectores en las terapias preventivas y tempranas. En nuestra opinión, estos valores positivos observados en las administraciones tardías podrían estar asociados a una inadecuada selección del periodo de tiempo determinado en la metodología del estudio (>14 días post-inducción de OA), pudiendo ser necesario establecer como administraciones tardías a periodos de tiempo más largos.

En cuanto a la duración de los tratamientos, una vez más, llama la atención la falta de evidencia de las terapias a largo plazo, identificando sólo una de las 22 publicaciones incluidas, en las que se evaluó la GH y el CS a los 8, 12 y 18 meses de tratamiento. Los resultados mostraron una reducción de la degeneración del cartílago y de las alteraciones de los biomarcadores en ambos grupos tratados y en los tres tiempos evaluados (Taniguchi et al., 2012). En este contexto, es importante destacar que la respuesta histológica y bioquímica tras la administración de los condroprotectores a

largo plazo es básicamente impredecible en estudios preclínicos, de manera que las respuestas positivas iniciales identificadas en algunos estudios podrían no mantenerse durante largos periodos de tiempo. Aunque también es posible lo contrario, que sean necesarios periodos de tratamiento de mayor duración para observar un efecto beneficioso en la articulación sinovial. Por lo tanto, se requieren estudios preclínicos adicionales en la investigación de la OA que evalúen el efecto de estas terapias a largo plazo (Comblain et al., 2016).

En esta revisión sistemática se observó la presencia de una gran variabilidad entre los diseños experimentales. En consecuencia, sigue siendo un reto realizar una evaluación precisa de cómo la glucosamina y el condroitín sulfato afectan a la progresión de la OA. En términos generales, los condroprotectores evaluados, solos o en combinación, no parecen prevenir los cambios óseos subcondrales, la inflamación sinovial o la formación de osteofitos, mostrando respuestas positivas pobres. No obstante, es cierto que sólo algunas de las publicaciones incluían evaluaciones a esos niveles. Definitivamente, el cartílago sigue siendo el foco de atención principal en la investigación sobre la OA y, en este sentido, se identificaron efectos condroprotectores positivos en aproximadamente la mitad de las publicaciones, siendo los estudios sobre la GS y la combinación de CS más GS, los que mostraron resultados más prometedores. En cuanto al uso de marcadores bioquímicos en la investigación de la OA, como se pudo observar en este estudio, fueron el segundo parámetro más evaluado. En este contexto, se identificó una respuesta positiva en más de la mitad de las evaluaciones que se incluyeron en esta revisión.

En cuanto al riesgo de sesgo y las evaluaciones de calidad de los artículos incluidos en esta revisión, en los estudios con animales siguen sin reportarse detalles esenciales sobre el diseño experimental, como el cálculo del tamaño de la muestra, que solo se identificó en uno de los artículos (Abdul Kadir et al., 2019).

Para concluir, como hemos expuesto en esta revisión, la glucosamina y el condroitín sulfato parecen proporcionar efectos condroprotectores y una menor respuesta bioquímica inflamatoria en aproximadamente la mitad de las evaluaciones. A pesar de estos efectos, la falta de efectos positivos determinada de manera general en el resto de las estructuras sinoviales sugiere que parece poco probable que tanto la glucosamina como el condroitín sulfato, puedan ser eficaces como fármacos modificadores de la OA. Por todas estas razones, el uso de la glucosamina y el condroitín sulfato debe ser una decisión individual establecida en consenso veterinario/propietario, y que se establezca en base a la evaluación de cada caso clínico particular y su respuesta sintomática.

Capítulo V. “Comparación de los efectos de la administración a largo plazo de una combinación de fármacos de acción lenta y risedronato sobre la articulación sinovial en un modelo experimental de osteoartritis”

El objetivo del último estudio que compone esta tesis doctoral fue evaluar el efecto a largo plazo del tratamiento vía oral de una combinación de SYSADOAs (glucosamina hidrocloreto, condroitín sulfato y ácido hialurónico) en los diferentes tejidos articulares del modelo animal. Para ello se realizó la evaluación morfológica macroscópica, histología cualitativa y cuantitativa y el análisis microtomográfico. Asimismo, se procedió a comparar los resultados con los obtenidos tras la administración de risedronato.

En la evaluación macroscópica e histológica, al igual que lo observado con la administración de risedronato, los animales tratados con SYSADOAs no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo placebo. En este sentido, estos resultados coinciden con lo observado por otros autores, donde la administración de glucosamina y/o condroitín no mostraron efectos condroprotectores en los modelos animales evaluados (Torelli et al., 2005; Panahifar et al., 2014; Roman-Blas et al., 2017). Por el contrario, la administración de fármacos de acción lenta en otros estudios experimentales evidenció menores cambios degenerativos a nivel del cartílago articular (Wen et al., 2010; Taniguchi et al., 2012; Abdul Kadir et al., 2019; Salman et al., 2019).

En nuestro estudio, los animales pertenecientes a ambos grupos de tratamiento presentaron valores de OA ligeramente superiores a los observados en el grupo control. Una de las posibles explicaciones estaría relacionada con alivio del dolor asociado a la administración de estos fármacos (Wang et al., 2018). Las propiedades analgésicas de los SYSADOAs se han determinado tanto en modelos animales (Wen et al., 2010; Sun et al., 2018), como en ensayos clínicos en medicina humana (Leeb et al., 2000; Schneider, 2012) y veterinaria (McCarthy et al., 2007). En este sentido, los animales con menor dolor articular podrían realizar una mayor actividad física y presentar mayor apoyo en la extremidad lesionada, lo que podría favorecer la degradación articular.

En cuanto a los resultados de la evaluación histológica de la membrana sinovial, a diferencia de lo observado en el cartílago articular, los resultados de nuestro estudio tras la administración de ambos tratamientos (SYSADOA y RIS) mostraron valores de alteración sinovial más bajos que en el grupo control, siendo este efecto más marcado en el grupo SYSADOA presentando resultados similares a los observados en la articulación sana. Esta ligera actividad antiinflamatoria asociada a la administración de estos fármacos coincide con lo publicado por Wen et al. (Wen et al., 2010), que observó una supresión significativa de la sinovitis tras la administración oral de

glucosamina sulfato en un modelo ACLT en ratas. Por el contrario, otros autores no observaron menores alteraciones asociadas a la OA en la membrana sinovial (Torelli et al., 2005; Panahifar et al., 2014; Roman-Blas et al., 2017). Adicionalmente, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, ni la administración de glucosamina ni de condroitín sulfato demostró ningún efecto antiinflamatorio sobre la membrana sinovial (Permuy et al., 2015b).

En relación a los efectos de estos fármacos en la inhibición del desarrollo de osteofitos, en nuestro estudio la combinación de SYSADOAs no parece reducir la osteofitogénesis en las articulaciones operadas. Ivanoska et al. (Ivanovska y Dimitrova, 2011) evaluaron los efectos de la glucosamina sulfato o hidrocloreuro en un modelo de inducción química en ratón. Curiosamente, la administración de la formulación sulfato no evidenció una disminución en el desarrollo de osteofitos, mientras que la de glucosamina hidrocloreuro mostró una reducción significativa del área de osteofitos en comparación con el grupo control. Sin embargo, se necesitan más estudios experimentales para poder establecer conclusiones acerca de la efectividad de estos fármacos en la inhibición de la formación de osteofitos.

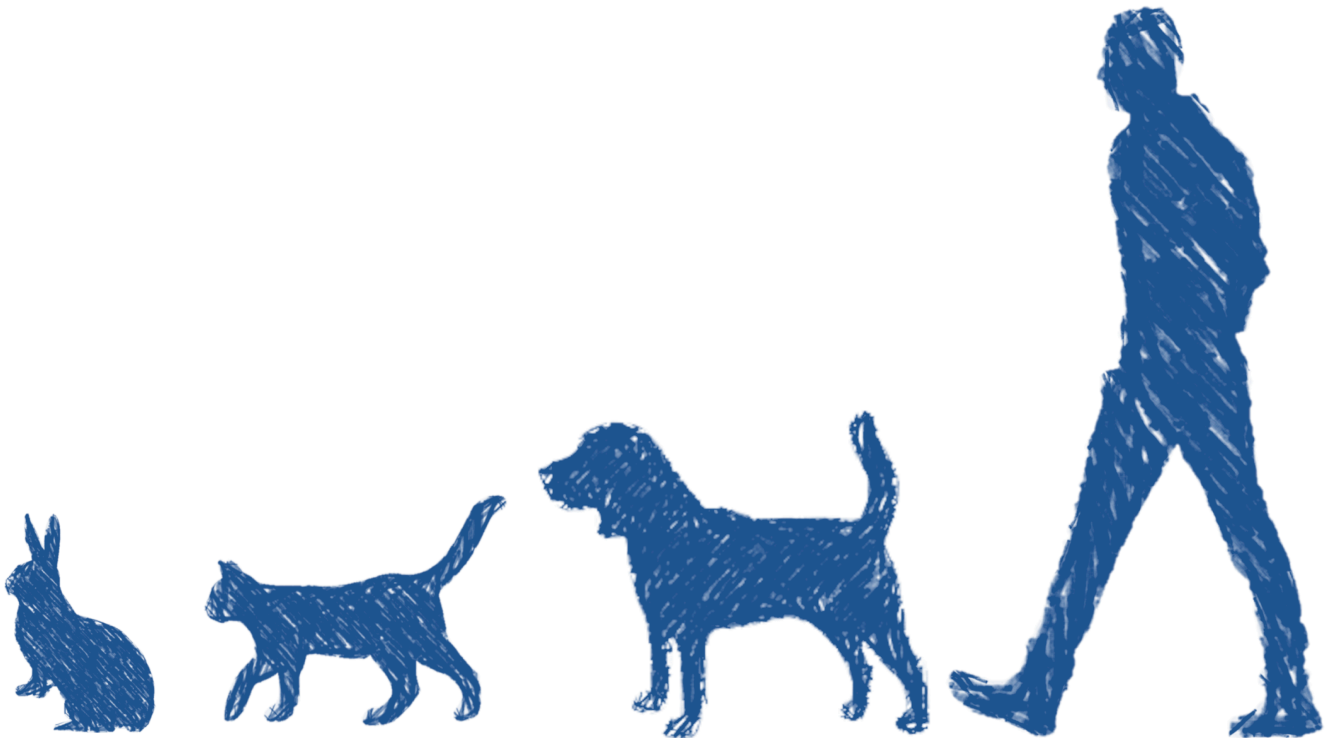
En relación al análisis histomorfométrico realizado en las muestras histológicas, se determinaron aumentos significativos del grosor del cartílago en los grupos OA en relación a la rodilla sana contralateral. Sin embargo, la administración de los tratamientos no evidenció diferencias significativas en comparación con el grupo tratado con placebo. De igual modo, en nuestro estudio, el tratamiento SYSADOAs no mostró una mejoría del índice de fibrilación del cartílago. Estos resultados coinciden con lo publicado en el estudio de Abdul-Kadir et al. (Abdul Kadir et al., 2019), donde la administración de glucosamina no logró prevenir la hipertrofia del cartílago ni la fibrilación superficial.

Por último, con respecto a los efectos de los fármacos de acción lenta sobre las propiedades estructurales del hueso subcondral, en la actualidad todavía son pocos los autores que incluyen evaluaciones a este nivel, por lo que la evidencia científica sobre su posible efecto protector es realmente limitada. En el estudio de Wang et al. (Wang et al., 2007), la administración de GH durante 8 semanas disminuyó los cambios estructurales en el hueso subcondral durante el desarrollo de la OA, sugiriendo un posible efecto DMOAD a nivel óseo. Por el contrario, en el estudio llevado a cabo por Roman-Blas et al. (Roman-Blas et al., 2017), en el que se evaluó la asociación de condroitín sulfato con glucosamina hidrocloreuro o sulfato, se observó que ninguna de las dos combinaciones de tratamiento fue capaz de prevenir el daño estructural, mostrando un significativo descenso de la densidad mineral en comparación con los controles.

En nuestro estudio, la administración de SYSADOAs no mostró diferencias significativas con el grupo tratado con placebo, de manera similar a lo observado en un estudio previo de nuestro grupo de investigación tras la administración a corto plazo de glucosamina y condroitín sulfato. (Permuy et al., 2015b). Sin embargo, en el mismo estudio, Permuy et al. identificaron una ligera tendencia hacia la formación ósea y conservación de la densidad mineral en los grupos de tratamiento con risedronato, diacereina y ácido hialurónico. En base a los resultados de esta tesis doctoral, no parece que ese positivo efecto inicial asociado a la administración del risedronato pueda mantenerse en el tiempo.



CONCLUSIONS



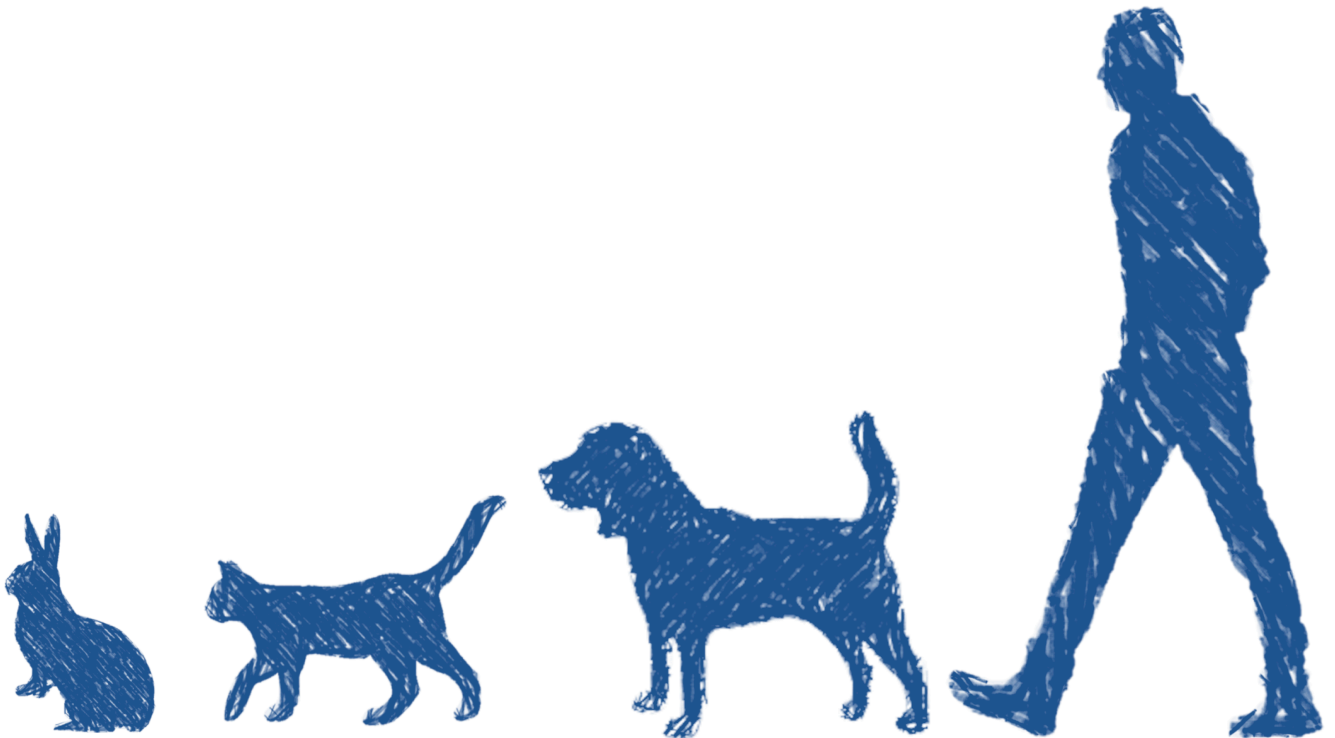
CONCLUSIONS

- I. Bisphosphonates seemed to reduce the osteoarthritic changes in a dose-dependent manner and with pre-emptive and early administrations. Generally, they seemed to show positive subchondral bone conservation and fewer biomarker alteration. However, they did not appear to suppress the osteophyte development and their chondroprotective effect is highly variable among the studies. Regarding the therapy duration, there is a significant lack of evidence on evaluating their effectiveness in preclinical long-term studies. Lastly, with reference to synovial membrane evaluation, bisphosphonate treatments seemed to show a tendency toward anti-inflammatory effect but further studies are needed in order to clarify their effectiveness at that level.
- II. Long-term risedronate administration did not demonstrate a chondroprotective effect, showing similar or even greater degenerative changes compared to those of untreated animals. Regarding the histological synovial membrane assessment, a slight improvement in the inflammatory changes was noticeable. Risedronate administration showed a slight tendency to increase the subchondral bone plate thickness in lateral compartments but, it did not show conservation of periarticular bone and was not able to suppress the osteophyte formation. Consequently, oral risedronate treatment did not have the capacity to prevent the osteoarthritis progression in a rabbit instability model of OA after 6 months of treatment.
- III. Histomorphometric analysis of the undecalcified histology samples showed a marked tendency toward cartilage thickening and cartilage fibrillation in the OA joints, in all the examined anatomical sections, as well as a trend toward subchondral bone thinning beneath the cartilage alteration. These outcomes were especially pronounced in the medial tibial plateau and in the inner tibial zones. Additionally, the trabecular evaluation showed a significant bone quality loss in the operated limbs with decreased trabecular thickness, trabecular number and bone volume, as well as increased trabecular separation. The micro-CT analysis identified more accurately the trabecular bone changes than the undecalcified histology. Therefore, the long-term risedronate treatment did not seem to have the capacity to reduce the

osteoarthritic hypertrophic cartilage response and failed to diminish the surface fibrillation or prevent the trabecular bone loss.

- IV. Glucosamine and chondroitin sulfate seems to provide chondroprotective effects and less inflammatory biochemical response in approximately half of the articles evaluated. As for the rest of parameters, these therapies did not appear to adequately suppress the subchondral bone changes, the synovial inflammation or the osteophyte formation. However, further experimental studies may be needed to evaluate their response at those levels. Beneficial effects were associated with pre-emptive treatment administrations, higher doses and multimodality approaches with some combined therapies. Besides, additional studies focused in the long term are required to clarify their function in the OA progression.
- V. Oral combined SYSADOAs and risedronate administrations did not show improved cartilage health compared with untreated operated rabbits in both macroscopic and histological evaluations. However, an anti-inflammatory activity was observed in the synovial membrane and it was significant in the SYSADOAs-treated animals. Both treatments in the long term failed to prevent the subchondral bone changes or the osteophyte development. As for the histomorphometric analyses, these therapies also did not show a reduction the superficial cartilage fibrillation, the cartilage thickening and the subchondral bone thinning. The present results suggest that it seems unlikely that risedronate and the SYSADOAs combination could be effective as a disease-modifying osteoarthritic drugs.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Kadir, A., Abdul Kadir, A., Abd Hamid, R., Mat Jais, A.M., Omar, J., Sadagatullah, A.N., Badrin, S., Win, T.T., Sirajudeen, K.N.S., y Salleh, A. 2019. Evaluation of Chondroprotective Activity of *Channa striatus* in Rabbit Osteoarthritis Model. *Biomed Res. Int.* 2019. doi:10.1155/2019/6979585.
- Adebayo, O.O., Ko, F.C., Wan, P.T., Goldring, S.R., Goldring, M.B., Wright, T.M., y van der Meulen, M.C.H. 2017. Role of subchondral bone properties and changes in development of load-induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthr. Cartil.* 25:2108-2118. doi:10.1016/j.joca.2017.08.016.
- Adrian, A.M., Barrett, M.F., Werpy, N.M., Kawcak, C.E., Chapman, P.L., y Goodrich, L.R. 2017. A comparison of arthroscopy to ultrasonography for identification of pathology of the equine stifle. *Equine Vet. J.* 49:314-321. doi:10.1111/evj.12541.
- Aghazadeh-Habashi, A., Gilzad Kohan, M.H., Asghar, W., y Jamali, F. 2014. Glucosamine dose/concentration-effect correlation in the rat with adjuvant arthritis. *J. Pharm. Sci.* 103:760-767. doi:10.1002/jps.23819.
- Agung, M., Ochi, M., Yanada, S., Adachi, N., Izuta, Y., Yamasaki, T., y Toda, K. 2006. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 14:1307-1314. doi:10.1007/s00167-006-0124-8.
- Aho, O.-M., Finnilä, M., Thevenot, J., Saarakkala, S., y Lehenkari, P. 2017. Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis. *PLoS One* 12. doi:10.1371/journal.pone.0173726.
- Aigner, T., Cook, J.L., Gerwin, N., Glasson, S.S., Laverty, S., Little, C.B., McIlwraith, W., y Kraus, V.B. 2010. Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S2-S6. doi:10.1016/j.joca.2010.07.013.
- Aigner, T., Söder, S., Gebhard, P.M., McAlinden, A., y Haag, J. 2007. Mechanisms of Disease: Role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis - Structure, chaos and senescence. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3:391-399. doi:10.1038/ncprheum0534.
- Alam, M., Ji, J.R., Kim, M.S., y Kim, N.S. 2011. Biomarkers for identifying the early phases of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs. *J. Vet. Sci.* 12:273-280. doi:10.4142/jvs.2011.12.3.273.

- Allen, M.R., Iwata, K., Phipps, R., y Burr, D.B. 2006. Alterations in canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. *Bone* 39:872-879. doi:10.1016/j.bone.2006.04.028.
- Allen, M.R., Turek, J.J., y Phipps, R.J. 2011. Greater magnitude of turnover suppression occurs earlier after treatment initiation with risedronate than alendronate. *Bone* 49:128-132. doi:10.1016/J.BONE.2010.07.011.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., Howell, D., Kaplan, D., Koopman, W., Longley, S., Mankin, H., McShane, D.J., Medsger, T., Meenan, R., Mikkelsen, W., Moskowitz, R., Murphy, W., Rothschild, B., Segal, M., Sokoloff, L., y Wolfe, F. 1986. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 29:1039-1049. doi:10.1002/art.1780290816.
- Altman, R.D., Manjoo, A., Fierlinger, A., Niazi, F., y Nicholls, M. 2015. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: A systematic review. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16. doi:10.1186/s12891-015-0775-z.
- Alves, J.C., Santos, A., Jorge, P., Lavrador, C., y Carreira, L.M. 2020. A Pilot Study on the Efficacy of a Single Intra-Articular Administration of Triamcinolone Acetonide, Hyaluronan, and a Combination of Both for Clinical Management of Osteoarthritis in Police Working Dogs. *Front. Vet. Sci.* 7:512523. doi:10.3389/fvets.2020.512523.
- Amiel, D., Toyoguchi, T., Kobayashi, K., Bowden, K., Amiel, M.E., y Healey, R.M. 2003. Long-term effect of sodium hyaluronate (Hyalgan®) on osteoarthritis progression in a rabbit model. *Osteoarthr. Cartil.* 11:636-643. doi:10.1016/S1063-4584(03)00119-5.
- Anderson, K.L., O'Neill, D.G., Brodbelt, D.C., Church, D.B., Meeson, R.L., Sargan, D., Summers, J.F., Zulch, H., y Collins, L.M. 2018. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci. Rep.* 8:1-12. doi:10.1038/s41598-018-23940-z.
- Anitua, E., Andía, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zalduendo, M., de la Fuente, M., Nurden, P., y Nurden, A.T. 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.* 23:281-286. doi:10.1016/j.orthres.2004.08.015.
- Apostu, D., Lucaciu, O., Mester, A., Oltean-Dan, D., Baciut, M., Baciut, G., Bran, S., Onisor, F., Piciu, A., Pasca, R.D., Maxim, A., y Benea, H. 2019. Systemic drugs with impact on osteoarthritis. *Drug Metab. Rev.* 51:498-523. doi:10.1080/03602532.2019.1687511.
- Aragon, C.L., Hofmeister, E.H., y Budsberg, S.C. 2007. Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *Javma* 230:514-521. doi:10.1186/s12889-016-3643-3.

- Arzi, B., Wisner, E.R., Huey, D.J., Kass, P.H., Hu, J., y Athanasiou, K.A. 2012. A proposed model of naturally occurring osteoarthritis in the domestic rabbit. *Lab Anim. (NY)*. 41:20-25. doi:10.1038/labani0112-20.
- Ashraf, S., Mapp, P.I., Burston, J., Bennett, A.J., Chapman, V., y Walsh, D.A. 2014. Augmented pain behavioural responses to intra-articular injection of nerve growth factor in two animal models of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73:1710-1718. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203416.
- Ayral, X., Pickering, E.H., Woodworth, T.G., Mackillop, N., y Dougados, M. 2005. Synovitis: A potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - Results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthr. Cartil.* 13:361-367. doi:10.1016/j.joca.2005.01.005.
- Bagi, C.M., Berryman, E., Zakur, D.E., Wilkie, D., y Andresen, C.J. 2015a. Effect of antiresorptive and anabolic bone therapy on development of osteoarthritis in a posttraumatic rat model of OA. *Arthritis Res. Ther.* 17:315. doi:10.1186/s13075-015-0829-5.
- Bagi, C.M., Zakur, D.E., Berryman, E., Andresen, C.J., y Wilkie, D. 2015b. Correlation between μ CT imaging, histology and functional capacity of the osteoarthritic knee in the rat model of osteoarthritis. *J. Transl. Med.* 13:276. doi:10.1186/s12967-015-0641-7.
- Band, P.A., Heeter, J., Wisniewski, H.G., Liublinska, V., Pattanayak, C.W., Karia, R.J., Stabler, T., Balazs, E.A., y Kraus, V.B. 2015. Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. *Osteoarthr. Cartil.* 23:70-76. doi:10.1016/j.joca.2014.09.017.
- Bannuru, R.R., Natov, N.S., Obadan, I.E., Price, L.L., Schmid, C.H., y McAlindon, T.E. 2009. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res.* 61:1704-1711. doi:10.1002/art.24925.
- Batiste, D.L., Kirkley, A., Laverty, S., Thain, L.M.F., Spouge, A.R., Gati, J.S., Foster, P.J., y Holdsworth, D.W. 2004a. High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 12:614-626. doi:10.1016/j.joca.2004.03.002.
- Batiste, D.L., Kirkley, A., Laverty, S., Thain, L.M.F., Spouge, A.R., y Holdsworth, D.W. 2004b. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthr. Cartil.* 12:986-996. doi:10.1016/j.joca.2004.08.010.
- Bauer, D.C., Hunter, D.J., Abramson, S.B., Attur, M., Corr, M., Felson, D., Heinegård, D., Jordan, J.M., Kepler, T.B., Lane, N.E., Saxne, T., Tyree, B., Kraus, V.B., y For the Osteoarthritis Biomarkers Network, (V Kraus, Chair). 2006. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthr. Cartil.* 14:723-727. doi:10.1016/j.joca.2006.04.001.

- Bedson, J., y Croft, P.R. 2008. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: A systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet. Disord.* 9. doi:10.1186/1471-2474-9-116.
- Belshaw, Z., Dean, R., y Asher, L. 2020. «you can be blind because of loving them so much»: The impact on owners in the United Kingdom of living with a dog with osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 16. doi:10.1186/s12917-020-02404-5.
- Bendele, A.M. 2001. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact* 1:363-376.
- Bennett, D., Zainal Ariffin, S.M. bt, y Johnston, P. 2012a. Osteoarthritis in the cat: 1. how common is it and how easy to recognise?. *J. Feline Med. Surg.* 14:65-75. doi:10.1177/1098612X11432828.
- Bennett, D., Zainal Ariffin, S.M. bt, y Johnston, P. 2012b. Osteoarthritis in the cat: 2. How should it be managed and treated?. *J. Feline Med. Surg.* 14:76-84. doi:10.1177/1098612X11432829.
- Berenbaum, F. 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr. Cartil.* 21:16-21. doi:10.1016/j.joca.2012.11.012.
- Bhathal, A., Spryszak, M., Louizos, C., y Frankel, G. 2017. Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review. *Open Vet. J.* 7:36-49. doi:10.4314/ovj.v7i1.6.
- Bhosale, A.M., y Richardson, J.B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 87:77-95. doi:10.1093/bmb/ldn025.
- Bingham, C.O., Buckland-Wright, J.C., Garner, P., Cohen, S.B., Dougados, M., Adami, S., Clauw, D.J., Spector, T.D., Pelletier, J.P., Raynauld, J.P., Strand, V., Simon, L.S., Meyer, J.M., Cline, G.A., y Beary, J.F. 2006. Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degradation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee: Results of the two-year multinational knee osteoarthritis st. *Arthritis Rheum.* 54:3494-3507. doi:10.1002/art.22160.
- Bobinac, D., Spanjol, J., Zoricic, S., y Maric, I. 2003. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone* 32:284-290. doi:10.1016/S8756-3282(02)00982-1.
- Bonasia, D.E., Marmotti, A., Massa, A.D.F., Ferro, A., Blonna, D., Castoldi, F., y Rossi, R. 2015. Intra- and inter-observer reliability of ten major histological scoring systems used for the evaluation of in vivo cartilage repair. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 23:2484-2493. doi:10.1007/s00167-014-2975-8.
- Boutroy, S., Vilayphiou, N., Roux, J.P., Delmas, P.D., Blain, H., Chapurlat, R.D., y Chavassieux, P. 2011. Comparison of 2D and 3D bone microarchitecture evaluation at the femoral neck, among postmenopausal women with hip fracture or hip osteoarthritis. *Bone* 49:1055-1061. doi:10.1016/j.bone.2011.07.037.

- Boyan, B.D., Hart, D.A., Enoka, R.M., Nicoletta, D.P., Resnick, E., Berkley, K.J., Sluka, K.A., Kwoh, C.K., Tosi, L.L., O'Connor, M.I., Coutts, R.D., y Kohrt, W.M. 2013. Hormonal modulation of connective tissue homeostasis and sex differences in risk for osteoarthritis of the knee. *Biol. Sex Differ.* 4:3. doi:10.1186/2042-6410-4-3.
- Boyd, S.K., Matyas, J.R., Wohl, G.R., Kantzas, A., y Zernicke, R.F. 2000a. Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. *J. Appl. Physiol.* 89:2359-2364. doi:10.1152/jappl.2000.89.6.2359.
- Boyd, S.K., Müller, R., Matyas, J.R., Wohl, G.R., y Zernicke, R.F. 2000b. Early morphometric and anisotropic change in periarticular cancellous bone in a model of experimental knee osteoarthritis quantified using microcomputed tomography. *Clin. Biomech.* 15:624-631. doi:10.1016/S0268-0033(00)00023-1.
- Brandt, K.D. 2002. Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 39:221-235.
- Brandt, K.D., y Slowman-Kovacs, S. 1986. Nonsteroidal antiinflammatory drugs in treatment of osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* No.213:84-91.
- Braun, H.J., y Gold, G.E. 2012. Diagnosis of osteoarthritis: Imaging. *Bone* 51:278-288. doi:10.1016/j.bone.2011.11.019.
- Brioschi, F.A., Di Cesare, F., Gioeni, D., Rabbogliatti, V., Ferrari, F., D'urso, E.S., Amari, M., y Ravasio, G. 2020. Oral transmucosal cannabidiol oil formulation as part of a multimodal analgesic regimen: Effects on pain relief and quality of life improvement in dogs affected by spontaneous osteoarthritis. *Animals* 10:1-14. doi:10.3390/ani10091505.
- Brown, D.C., Boston, R.C., y Farrar, J.T. 2010. Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237:66-70. doi:10.2460/javma.237.1.66.
- Bruyère, O., Altman, R.D., y Reginster, J.Y. 2016. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Semin. Arthritis Rheum.* 45:S12-S17. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.11.011.
- Bruyère, O., Burlet, N., Delmas, P.D., Rizzoli, R., Cooper, C., y Reginster, J.Y. 2008. Evaluation of symptomatic slow-acting drugs in osteoarthritis using the GRADE system. *BMC Musculoskelet. Disord.* 9:1-9. doi:10.1186/1471-2474-9-165.
- Buckland-Wright, C.J., Messent, E.A., Bingham, C.O., Ward, R.J., y Tonkin, C. 2007. A 2 yr longitudinal radiographic study examining the effect of a bisphosphonate (risedronate) upon subchondral bone loss in osteoarthritic knee patients. *Rheumatology* 46:257-264. doi:10.1093/rheumatology/kel213.
- Budsberg, S.C., Torres, B.T., Kleine, S.A., Sandberg, G.S., y Berjeski, A.K. 2018. Lack of effectiveness of tramadol hydrochloride for the treatment of pain and joint dysfunction in dogs with chronic osteoarthritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 252:427-432. doi:10.2460/javma.252.4.427.

- Burr, D.B. 2004. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 12:20-30. doi:10.1016/j.joca.2003.09.016.
- Carballo, C.B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., y Rodeo, S.A. 2017. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin. Sports Med.* 36:413-425. doi:10.1016/j.csm.2017.02.001.
- Carlson, C.S., Loeser, R.F., Purser, C.B., Gardin, J.F., y Jerome, C.P. 1996. Osteoarthritis in cynomolgus macaques III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J. Bone Miner. Res.* 11:1209-1217. doi:10.1002/jbmr.5650110904.
- Carrillo, J.M. 2020. Guía Servet de manejo clínico. Osteoarthritis. Servet editorial. Grupo Asís Biomedica SL, Zaragoza - España.
- Castañeda, S., Roman-Blas, J.A., Largo, R., y Herrero-Beaumont, G. 2012. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem. Pharmacol.* 83:315-323. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.018.
- Chappard, C., Peyrin, F., Bonnassie, A., Lemineur, G., Brunet-Imbault, B., Lespessailles, E., y Benhamou, C.L. 2006. Subchondral bone micro-architectural alterations in osteoarthritis: A synchrotron micro-computed tomography study. *Osteoarthr. Cartil.* 14:215-223. doi:10.1016/j.joca.2005.09.008.
- Chiang, E.R., Ma, H.L., Wang, J.P., Liu, C.L., Chen, T.H., y Hung, S.C. 2016. Allogeneic mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in rabbits. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0149835.
- Christiansen, B.A., Guilak, F., Lockwood, K.A., Olson, S.A., Pitsillides, A.A., Sandell, L.J., Silva, M.J., van der Meulen, M.C.H., y Haudenschild, D.R. 2015. Non-invasive mouse models of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 23:1627-1638. doi:10.1016/j.joca.2015.05.009.
- Cinar, B.M., Ozkoc, G., Bolat, F., Karaeminogullari, O., Sezgin, N., y Tandogan, R.N. 2015. Intra-articular zoledronic acid in a rat osteoarthritis model: significant reduced synovitis may indicate chondroprotective effect. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 23:1410-1418. doi:10.1007/s00167-014-2955-z.
- Colombo, C., Butler, M., O'Byrne, E., Hickman, L., Swartzendruber, D., Selwyn, M., y Steinetz, B. 1983. A new model of osteoarthritis in rabbits. I. Development of knee joint pathology following lateral meniscectomy and section of the fibular collateral and sesamoid ligaments.. *Arthritis Rheum.* 26:875-86.
- Comblain, F., Serisier, S., Barthelemy, N., Balligand, M., y Henrotin, Y. 2016. Review of dietary supplements for the management of osteoarthritis in dogs in studies from 2004 to 2014. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39:1-15. doi:10.1111/jvp.12251.
- Contartese, D., Tschon, M., De Mattei, M., y Fini, M. 2020. Molecular Sciences Sex Specific Determinants in Osteoarthritis: A Systematic Review of Preclinical Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3696. doi:10.3390/ijms21103696.

- Cook, J.L., Hung, C.T., Kuroki, K., Stoker, A.M., Cook, C.R., Pfeiffer, F.M., Sherman, S.L., y Stannard, J.P. 2014. Animal models of cartilage repair. *Bone Jt. Res.* 3:89-94. doi:10.1302/2046-3758.34.2000238.
- Cook, J.L., Kuroki, K., Visco, D., Pelletier, J.-P., Schulz, L., y Lafeber, F.P.J.G. 2010. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S66-S79. doi:10.1016/J.JOCA.2010.04.017.
- Cope, P.J., Ourradi, K., Li, Y., y Sharif, M. 2019. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthr. Cartil.* 27:230-239. doi:10.1016/j.joca.2018.09.016.
- Cuervo, B., Rubio, M., Chicharro, D., Damiá, E., Santana, A., Carrillo, J.M., Del Romero, A., Vilar, J.M., Cerón, J.J., y Sopena, J.J. 2020. Objective comparison between platelet rich plasma alone and in combination with physical therapy in dogs with osteoarthritis caused by hip dysplasia. *Animals* 10. doi:10.3390/ani10020175.
- Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Carrillo, J.M., Cugat, R., Dominguez, J.M., Vilar, J., y Morales, M. 2014. Hip osteoarthritis in dogs: A randomized study using mesenchymal stem cells from adipose tissue and plasma rich in growth factors. *Int. J. Mol. Sci.* 15:13437-13460. doi:10.3390/ijms150813437.
- Custers, R.J.H., Creemers, L.B., Verbout, A.J., van Rijen, M.H.P., Dhert, W.J.A., y Saris, D.B.F. 2007. Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthr. Cartil.* 15:1241-1248. doi:10.1016/j.joca.2007.04.017.
- Daniels, E., y Sakakeeny, C. 2015. Hypercalcemia: Pathophysiology, clinical signs, and emergent treatment. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 51:291-299. doi:10.5326/JAAHA-MS-6297.
- Daubs, B.M., Markel, M.D., y Manley, P.A. 2006. Histomorphometric analysis of articular cartilage, zone of calcified cartilage, and subchondral bone plate in femoral heads from clinically normal dogs and dogs with moderate or severe osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.* 67:1719-1724. doi:10.2460/ajvr.67.10.1719.
- Davis, A.J., Smith, T.O., Hing, C.B., y Sofat, N. 2013. Are Bisphosphonates Effective in the Treatment of Osteoarthritis Pain? A Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One* 8:72714. doi:10.1371/journal.pone.0072714.
- Dearmin, M.G., Trumble, T.N., García, A.P., Chambers, J.N., y Budsberg, S.C. 2014. Chondroprotective effects of zoledronic acid on articular cartilage in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.* 75:329-337. doi:10.2460/ajvr.75.4.329.
- Dedrick, D.K., Goldstein, S.A., Brandt, K.D., O'Connor, B.L., Goulet, R.W., y Albrecht, M. 1993. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum.*

36:1460-1467. doi:10.1002/art.1780361019.

DeGroot, J., Verzijl, N., Wenting-Van Wijk, M.J.G., Jacobs, K.M.G., Van El, B., Van Roermund, P.M., Bank, R.A., Bijlsma, J.W.J., TeKoppele, J.M., y Lafeber, F.P.J.G. 2004. Accumulation of Advanced Glycation End Products as a Molecular Mechanism for Aging as a Risk Factor in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50:1207-1215. doi:10.1002/art.20170.

Ding, M., Danielsen, C.C., y Hvid, I. 2008a. The Effects of Bone Remodeling Inhibition by Alendronate on Three-Dimensional Microarchitecture of Subchondral Bone Tissues in Guinea Pig Primary Osteoarthrosis. *Calcif. Tissue Int.* 82:77-86. doi:10.1007/s00223-007-9093-2.

Ding, M., Danielsen, C.C., y Hvid, I. 2008b. The effects of bone remodeling inhibition by alendronate on three-dimensional microarchitecture of subchondral bone tissues in guinea pig primary osteoarthrosis. *Calcif. Tissue Int.* 82:77-86. doi:10.1007/s00223-007-9093-2.

Ding, M., Day, J.S., Burr, D.B., Mashiba, T., Hirano, T., Weinans, H., Sumner, D.R., y Hvid, I. 2003. Canine Cancellous Bone Microarchitecture after One Year of High-Dose Bisphosphonates. *Calcif. Tissue Int.* 72:737-744. doi:10.1007/s00223-002-2066-6.

Doig, P.A., Purbrick, K.A., Hare, J.E., y McKeown, D.B. 2000. Clinical efficacy and tolerance of meloxicam in dogs with chronic osteoarthritis. *Can. Vet. J.* 41:296-300.

Donath, K. 1985. The Diagnostic Value of the New Method for the Study of Undecalcified Bones and Teeth with Attached Soft Tissue, (Säge-Schliff, (Sawing and Grinding) Technique). *Pathol. Res. Pract.* 179:631-633. doi:10.1016/S0344-0338(85)80209-0.

Doschak, M.R., LaMothe, J.M., Cooper, D.M.L., Hallgrímsson, B., Hanley, D.A., Bray, R.C., y Zernicke, R.F. 2005. Bisphosphonates reduce bone mineral loss at ligament entheses after joint injury. *Osteoarthr. Cartil.* 13:790-797. doi:10.1016/j.joca.2005.04.015.

Doschak, M.R., Wohl, G.R., Hanley, D.A., Bray, R.C., y Zernicke, R.F. 2004. Antiresorptive therapy conserves some periarticular bone and ligament mechanical properties after anterior cruciate ligament disruption in the rabbit knee. *J. Orthop. Res.* 22:942-948. doi:10.1016/j.orthres.2003.12.018.

Duclos, M.E., Roualdes, O., Cararo, R., Rousseau, J.C., Roger, T., y Hartmann, D.J. 2010. Significance of the serum CTX-II level in an osteoarthritis animal model: A 5-month longitudinal study. *Osteoarthr. Cartil.* 18:1467-1476. doi:10.1016/j.joca.2010.07.007.

Elrod, S.M., y Hofmeister, E.H. 2019. Veterinarians' attitudes towards use of nutraceuticals. *Can. J. Vet. Res.* 83:291.

- Enomoto, M., Mantyh, P.W., Murrell, J., Innes, J.F., y Lascelles, B.D.X. 2019. Anti-nerve growth factor monoclonal antibodies for the control of pain in dogs and cats. *Vet. Rec.* 184:1-14. doi:10.1136/vr.104590.
- Epstein, M., Rodan, I., Griffenhagen, G., Kadrlik, J., Petty, M., Robertson, S., y Simpson, W. 2015. 2015 AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 51:67-84. doi:10.5326/JAAHA-MS-7331.
- Epstein, M.E. 2019. Anti-nerve growth factor monoclonal antibody: a prospective new therapy for canine and feline osteoarthritis. *Vet. Rec.* 184:20-22. doi:10.1136/vr.k5292.
- Eriksen, E.F., Shabestari, M., Ghouri, A., y Conaghan, P.G. 2020. Bisphosphonates as a treatment modality in osteoarthritis. *Bone* 143:115352. doi:10.1016/j.bone.2020.115352.
- Espinosa-Mur, P., Phillips, K.L., Galuppo, L.D., DeRouen, A., Benoit, P., Anderson, E., Shaw, K., Puchalski, S., Peters, D., Kass, P.H., y Spriet, M. 2020. Radiological prevalence of osteoarthritis of the cervical region in 104 performing Warmblood jumpers. *Equine Vet. J.* 1-7. doi:10.1111/evj.13383.
- Fahlgren, A., Messner, K., y Aspenberg, P. 2003. Meniscectomy leads to an early increase in subchondral bone plate thickness in the rabbit knee. *Acta Orthop. Scand.* 74:437-441. doi:10.1080/00016470310017758.
- Feldkamp, L.A., Davis, L.C., y Kress, J.W. 1984. Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A* 1:612-619.
- Felson, D.T., y Neogi, T. 2004. Osteoarthritis: Is It a Disease of Cartilage or of Bone?. *Arthritis Rheum.* 50:341-344. doi:10.1002/art.20051.
- Finnilä, M.A.J., Thevenot, J., Aho, O.-M., Tiitu, V., Rautiainen, J., Kauppinen, S., Nieminen, M.T., Pritzker, K., Valkealahti, M., Lehenkari, P., y Saarakkala, S. 2017. Association between subchondral bone structure and osteoarthritis histopathological grade. *J. Orthop. Res.* 35:785-792. doi:10.1002/jor.23312.
- Florea, C., Malo, M.K.H., Rautiainen, J., Mäkelä, J.T.A., Fick, J.M., Nieminen, M.T., Jurvelin, J.S., Davidescu, A., y Korhonen, R.K. 2015. Alterations in subchondral bone plate, trabecular bone and articular cartilage properties of rabbit femoral condyles at 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthr. Cartil.* 23:414-422. doi:10.1016/j.joca.2014.11.023.
- Fonsi, M., El Amrani, A.I., Gervais, F., y Vincent, P. 2020. Intra-Articular Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate: Pharmacokinetic Investigation in Osteoarthritic Rat Models. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* 92. doi:10.1016/j.curtheres.2019.100573.
- Fortier, L.A., Mohammed, H.O., Lust, G., y Nixon, A.J. 2002. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* 84:276-288. doi:10.1302/0301-620X.84B2.11167.
- Frisbie, D.D., McIlwraith, C.W., Kawcak, C.E., y Werpy, N.M. 2013. Evaluation of intra-

- articular hyaluronan, sodium chondroitin sulfate and N-acetyl-d-glucosamine combination versus saline (0.9% NaCl) for osteoarthritis using an equine model. *Vet. J.* 197:824-829. doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.033.
- Gamble, L.-J., Boesch, J.M., Frye, C.W., Schwark, W.S., Mann, S., Wolfe, L., Brown, H., Berthelsen, E.S., y Wakshlag, J.J. 2018. Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Front. Vet. Sci.* 5. doi:10.3389/fvets.2018.00165.
- Garnero, P., y Delmas, P.D. 2003. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:641-646. doi:10.1097/00002281-200309000-00020.
- Gerwin, N., Bendele, A.M., Glasson, S., y Carlson, C.S. 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S24-S34. doi:10.1016/j.joca.2010.05.030.
- Gibson, M., Li, H., Coburn, J., Moroni, L., Nahas, Z., Bingham, C., Yarema, K., y Elisseeff, J. 2014. Intra-articular delivery of glucosamine for treatment of experimental osteoarthritis created by a medial meniscectomy in a rat model. *J. Orthop. Res.* 32:302-309. doi:10.1002/jor.22445.
- Giorgi, M. 2015. CJ-023,423 (Grapiprant) a potential novel active compound with antihyperalgetic properties for veterinary patients. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 10:1-4. doi:10.3844/ajavsp.2015.53.56.
- Glasson, S.S., Chambers, M.G., Van Den Berg, W.B., y Little, C.B. 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S17-S23. doi:10.1016/j.joca.2010.05.025.
- Goldring, M.B. 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4:269-285. doi:10.1177/1759720X12448454.
- Goldring, M.B., y Goldring, S.R. 2010. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192:230-237. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x.
- Goldring, M.B., y Marcu, K.B. 2009. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 11:224. doi:10.1186/ar2592.
- Goldring, S.R., y Goldring, M.B. 2016. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: Structure, function and cartilage bone crosstalk. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12:632-644. doi:10.1038/nrrheum.2016.148.
- de Grauw, J.C., Visser-Meijer, M.C., Lashley, F., Meeus, P., y van Weeren, P.R. 2016. Intra-articular treatment with triamcinolone compared with triamcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. *Equine Vet. J.* 48:152-158. doi:10.1111/evj.12383.
- Gruen, M.E., Thomson, A.E., Griffith, E.H., Paradise, H., Gearing, D.P., y Lascelles, B.D.X.

2016. A Feline-Specific Anti-Nerve Growth Factor Antibody Improves Mobility in Cats with Degenerative Joint Disease-Associated Pain: A Pilot Proof of Concept Study. *J. Vet. Intern. Med.* 30:1138-1148. doi:10.1111/jvim.13972.
- Guedes, A.G.P., Meadows, J.M., Pypendop, B.H., y Johnson, E.G. 2018a. Evaluation of tramadol for treatment of osteoarthritis in geriatric cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 252:565-571.
- Guedes, A.G.P., Meadows, J.M., Pypendop, B.H., Johnson, E.G., y Zaffarano, B. 2018b. Assessment of the effects of gabapentin on activity levels and owner-perceived mobility impairment and quality of life in osteoarthritic geriatric cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 253:579-585. doi:10.2460/javma.253.5.579.
- Guilak, F., Fermor, B., Keefe, F.J., Kraus, V.B., Olson, S.A., Pisetsky, D.S., Setton, L.A., y Weinberg, J.B. 2004. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. Páginas 17-26 in *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Guillot, M., Moreau, M., Heit, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., y Troncy, E. 2013. Characterization of osteoarthritis in cats and meloxicam efficacy using objective chronic pain evaluation tools. *Vet. J.* 196:360-367. doi:10.1016/j.tvjl.2013.01.009.
- Ha, C.W., Park, Y.B., Jang, J.W., Kim, M., Kim, J.A., y Park, Y.G. 2019. Variability of the Composition of Growth Factors and Cytokines in Platelet-Rich Plasma From the Knee With Osteoarthritis. Páginas 2878-2884.e1 in *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. W.B. Saunders.
- Hagiwara, Y., Ando, A., Chimoto, E., Saijo, Y., Ohmori-Matsuda, K., y Itoi, E. 2009. Changes of articular cartilage after immobilization in a rat knee contracture model. *J. Orthop. Res.* 27:236-242. doi:10.1002/jor.20724.
- Hardie, E.M., Roe, S.C., y Martin, F.R. 2002. Radiographic evidence of degenerative joint disease in geriatric cats: 100 cases (1934-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220:628-632. doi:10.2460/javma.2002.220.628.
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G.A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., Rodan, G.A., y Duong, L.T. 2004. The Role of Subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of Cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Alendronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transection Model. *Arthritis Rheum.* 50:1193-1206. doi:10.1002/art.20124.
- Hayami, T., Pickarski, M., Zhuo, Y., Wesolowski, G.A., Rodan, G.A., y Duong, L.T. 2006. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38:234-243. doi:10.1016/j.bone.2005.08.007.
- Hays, L., Zhang, Z., Mateescu, R.G., Lust, G., Burton-Wurster, N.I., y Todhunter, R.R. 2007. Quantitative genetics of secondary hip joint osteoarthritis in a Labrador Retriever-Greyhound pedigree. *Am. J. Vet. Res.* 68:35-41.

doi:10.2460/ajvr.68.1.35.

- He, Y., Li, Z., Alexander, P.G., Ocasio-Nieves, B.D., Yocum, L., Lin, H., y Tuan, R.S. 2020. Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. *Biology (Basel)*. 9:194. doi:10.3390/biology9080194.
- Henrotin, Y., Lambert, C., y Richette, P. 2014. Importance of synovitis in osteoarthritis: Evidence for the use of glycosaminoglycans against synovial inflammation. *Semin. Arthritis Rheum.* 43:579-587. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.10.005.
- Henrotin, Y., Martel-Pelletier, J., Msika, P., Guillou, G.B., y Deberg, M. 2012a. Usefulness of specific OA biomarkers, Coll2-1 and Coll2-1NO 2, in the anterior cruciate ligament OA canine model. *Osteoarthr. Cartil.* 20:787-790. doi:10.1016/j.joca.2012.03.016.
- Henrotin, Y., Mobasheri, A., y Marty, M. 2012b. Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis?. *Arthritis Res. Ther.* doi:10.1186/ar3657.
- Henrotin, Y., Sanchez, C., y Balligand, M. 2005. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *Vet. J.* 170:113-123. doi:10.1016/j.tvjl.2004.08.014.
- Hochberg, M.C. 2015. Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies. *Osteoarthr. Cartil.* 23:S18-S21. doi:10.1016/j.joca.2014.10.005.
- Hoddinott, K., Oblak, M.L., Wood, G.A., Boston, S., y Mutsaers, A.J. 2019. Evaluation of effects of radiation therapy combined with either pamidronate or zoledronate on canine osteosarcoma cells. *Can. J. Vet. Res.* 83:3-10.
- Hu, Y., Chen, X., Wang, S., Jing, Y., y Su, J. 2021. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. *Bone Res.* 9. doi:10.1038/s41413-021-00147-z.
- Huang, G., Hua, S., Yang, T., Ma, J., Yu, W., y Chen, X. 2018a. Platelet-rich plasma shows beneficial effects for patients with knee osteoarthritis by suppressing inflammatory factors. *Exp. Ther. Med.* 15:3096-3102. doi:10.3892/etm.2018.5794.
- Huang, K., Bao, J.P., Jennings, G.J., y Wu, L.D. 2015. The disease-modifying effect of dehydroepiandrosterone in different stages of experimentally induced osteoarthritis: A histomorphometric study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 16:1-10. doi:10.1186/s12891-015-0595-1.
- Huang, K., Li, Q., Li, Y., Yao, Z., Luo, D., Rao, P., y Xiao, J. 2018b. Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells, Stimulating Factors and Scaffolds. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 13:547-567. doi:10.2174/1574888x12666170608080722.
- Huskisson, E.C. 2008. Glucosamine and chondroitin for osteoarthritis. *J. Int. Med. Res.* 36:1161-1179. doi:10.1177/147323000803600602.

- Hwa, S.Y., Burkhardt, D., Little, C., y Ghosh, P. 2001. The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis.. *J. Rheumatol.* 28.
- Iadarola, M.J., Sapio, M.R., Raithel, S.J., Mannes, A.J., y Brown, D.C. 2018. Long-term pain relief in canine osteoarthritis by a single intra-articular injection of resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist. *Pain* 159:2105-2114. doi:10.1097/j.pain.0000000000001314.
- Ishijima, M., Watari, T., Naito, K., Kaneko, H., Futami, I., Yoshimura-Ishida, K., Tomonaga, A., Yamaguchi, H., Yamamoto, T., Nagaoka, I., Kurosawa, H., Poole, R.A., y Kaneko, K. 2011. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 13. doi:10.1186/ar3246.
- Ivanovska, N., y Dimitrova, P. 2011. Bone resorption and remodeling in murine collagenase-induced osteoarthritis after administration of glucosamine. *Arthritis Res. Ther.* 13. doi:10.1186/ar3283.
- Iwamoto, J., Takeda, T., Sato, Y., y Matsumoto, H. 2010. Effects of Risedronate on Osteoarthritis of the Knee. *Yonsei Med J* 51:164-170. doi:10.3349/ymj.2010.51.2.164.
- Jeong, D.H., Ullah, H.M.A., Goo, M.J., Ghim, S.G., Hong, I.H., Kim, A.Y., Jeon, S.M., Choi, M.S., Elfadl, A.K., Chung, M.J., Lee, E.J., Kim, Y.D., Kim, J.H., Kim, S.Y., y Jeong, K.S. 2017. Effects of oral glucosamine hydrochloride and mucopolysaccharide protein in a rabbit model of osteoarthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 21:620-628. doi:10.1111/1756-185X.13239.
- Jerosch, J. 2011. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on cartilage metabolism in OA: Outlook on other nutrient partners especially omega-3 fatty acids. *Int. J. Rheumatol.* 2011:17. doi:10.1155/2011/969012.
- Johnson, V.L., y Hunter, D.J. 2014. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 28:5-15. doi:10.1016/j.berh.2014.01.004.
- Johnston, S.A. 1997. Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology.. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 27:699-723. doi:10.1016/S0195-5616(97)50076-3.
- Jones, M.D., Tran, C.W., Li, G., Maksymowych, W.P., Zernicke, R.F., y Doschak, M.R. 2010. In vivo microfocal computed tomography and micro-magnetic resonance imaging evaluation of antiresorptive and antiinflammatory drugs as preventive treatments of osteoarthritis in the rat. *Arthritis Rheum.* 62:2726-2735. doi:10.1002/art.27595.
- Karsdal, M.A., Bay-Jensen, A.C., Lories, R.J., Abramson, S., Spector, T., Pastoureau, P., Christiansen, C., Attur, M., Henriksen, K., Goldring, S.R., y Kraus, V. 2014. The coupling of bone and cartilage turnover in osteoarthritis: Opportunities for bone antiresorptives and anabolics as potential treatments?. *Ann. Rheum. Dis.* 73:336-

348. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204111.

- Karsdal, M.A., Leeming, D.J., Dam, E.B., Henriksen, K., Alexandersen, P., Pastoureau, P., Altman, R.D., y Christiansen, C. 2008. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis?. *Osteoarthr. Cartil.* 16:638-646. doi:10.1016/j.joca.2008.01.014.
- Khan, M., Khanna, V., Adili, A., Ayeni, O.R., Bedi, A., y Bhandari, M. 2018. Knee osteoarthritis: When arthroscopy can help?. *Polish Arch. Intern. Med.* 128:121-125. doi:10.20452/pamw.4186.
- Khan, S.A., y McLean, M.K. 2012. Toxicology of Frequently Encountered Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Dogs and Cats. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 42:289-306. doi:10.1016/j.cvsm.2012.01.003.
- Khorasani, M.S., Diko, S., Hsia, A.W., Anderson, M.J., Genetos, D.C., Haudenschild, D.R., y Christiansen, B.A. 2015. Effect of alendronate on post-traumatic osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament rupture in mice. *Arthritis Res. Ther.* 17:30. doi:10.1186/s13075-015-0546-0.
- Kiefer, K.M., O'Brien, T.D., Pluhar, E.G., y Conzemius, M. 2015. Canine adipose-derived stromal cell viability following exposure to synovial fluid from osteoarthritic joints. *Vet. Rec. Open 2.* doi:10.1136/vetreco-2014-000063.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., y Altman, D.G. 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8:6-10. doi:10.1371/journal.pbio.1000412.
- Kim, J.E., Song, D., Kim, S.H., Jung, Y., y Kim, S.J. 2018. Development and characterization of various osteoarthritis models for tissue engineering. *PLoS One* 13:e0194288. doi:10.1371/journal.pone.0194288.
- Kimura, T., Kimura, S., Okada, J., Suzuki, S., y Kitanaka, T. 2020. Retrospective Radiographic Study of Degenerative Joint Disease in Cats: Prevalence Based on Orthogonal Radiographs. *Front. Vet. Sci.* 7:138. doi:10.3389/fvets.2020.00138.
- King, J.N., King, S., Budsberg, S.C., Lascelles, B.D.X., Bienhoff, S.E., Roycroft, L.M., y Roberts, E.S. 2016. Clinical safety of robenacoxib in feline osteoarthritis: results of a randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial. *J. Feline Med. Surg.* 18:632-642. doi:10.1177/1098612X15590870.
- Knazovicky, D., Tomas, A., Motsinger-Reif, A., y Lascelles, B.D.X. 2015. Initial evaluation of nighttime restlessness in a naturally occurring canine model of osteoarthritis pain. *PeerJ* 2015. doi:10.7717/peerj.772.
- Kobayashi, T., Notoya, K., Nakamura, A., y Akimoto, K. 2005. Fursultiamine, a vitamin B1 derivative, enhances chondroprotective effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in rabbit experimental osteoarthritis. *Inflamm. Res.* 54:249-255. doi:10.1007/s00011-005-1351-z.
- Koh, Y.H., Hong, S.H., Kang, H.S., Chung, C.Y., Koo, K.H., Chung, H.W., Cha, J.H., y Son,

- K.R. 2010. The effects of bone turnover rate on subchondral trabecular bone structure and cartilage damage in the osteoarthritis rat model. *Rheumatol. Int.* 30:1165-1171. doi:10.1007/s00296-009-1118-x.
- Van der Kraan, P.M., y Van den Berg, W.B. 2012. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: Role in initiation and progression of cartilage degeneration?. *Osteoarthr. Cartil.* 20:223-232. doi:10.1016/j.joca.2011.12.003.
- Kraus, V.B., Blanco, F.J., Englund, M., Henrotin, Y., Lohmander, L.S., Losina, E., Önerfjord, P., y Persiani, S. 2015. OARSI Clinical Trials Recommendations: Soluble biomarker assessments in clinical trials in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 23:686-697. doi:10.1016/j.joca.2015.03.002.
- Kraus, V.B., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garnero, P., Hardin, J., Henrotin, Y., Heinegård, D., Ko, A., Lohmander, L.S., Matthews, G., Menetski, J., Moskowitz, R., Persiani, S., Poole, A.R., Rousseau, J.C., y Todman, M. 2011. Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 19:515-542. doi:10.1016/j.joca.2010.08.019.
- KuKanich, B. 2013. Outpatient Oral Analgesics in Dogs and Cats Beyond Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. An Evidence-based Approach. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 43:1109-1125. doi:10.1016/j.cvsm.2013.04.007.
- Kuyinu, E.L., Narayanan, G., Nair, L.S., y Laurencin, C.T. 2016. Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. *J. Orthop. Surg. Res.* 11:1-27. doi:10.1186/s13018-016-0346-5.
- Laczko, J., y Levai, G. 1975. A simple differential staining method for semi thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 31:1-4.
- Lampropoulou-Adamidou, K., Dontas, I., Stathopoulos, I.P., Khaldi, L., Lelovas, P., Vlamis, J., Triantafillopoulos, I.K., y Papaioannou, N.A. 2014a. Chondroprotective effect of high-dose zoledronic acid: An experimental study in a rabbit model of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 32:1646-1651. doi:10.1002/jor.22712.
- Lampropoulou-Adamidou, K., Lelovas, P., Karadimas, E. V., Liakou, C., Triantafillopoulos, I.K., Dontas, I., y Papaioannou, N.A. 2014b. Useful animal models for the research of osteoarthritis. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 24:263-271. doi:10.1007/s00590-013-1205-2.
- Lane, N.E., Schnitzer, T.J., Birbara, C.A., Mokhtarani, M., Shelton, D.L., Smith, M.D., y Brown, M.T. 2010. Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* 363:1521-1531. doi:10.1056/nejmoa0901510.
- Lascelles, B.D., Knazovicky, D., Case, B., Freire, M., Innes, J.F., Drew, A.C., y Gearing, D.P. 2015. A canine-specific anti-nerve growth factor antibody alleviates pain and improves mobility and function in dogs with degenerative joint disease-associated pain. *BMC Vet. Res.* 11. doi:10.1186/s12917-015-0413-x.

- Lascelles, B.D.X. 2010. Feline degenerative joint disease. *Vet. Surg.* 39:2-13. doi:10.1111/j.1532-950X.2009.00597.x.
- Lascelles, B.D.X., Gaynor, J.S., Smith, E.S., Roe, S.C., Davidson, G., Boland, E., y Carr, J. 2008. Amantadine in a Multimodal Analgesic Regimen for Alleviation of Refractory Osteoarthritis Pain in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22:53-59. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.0014.x.
- Lavery, S., Girard, C.A., Williams, J.M., Hunziker, E.B., y Pritzker, K.P.H. 2010. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S53-S65. doi:10.1016/j.joca.2010.05.029.
- Leeb, B.F., Schweitzer, H., Montag, K., y Smolen, J.S. 2000. A metaanalysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 27:205-211.
- Leung, V., Rousseau-Blass, F., Beauchamp, G., y Pang, D.S.J. 2018. ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia. *PLoS One* 13:e0197882. doi:10.1371/journal.pone.0197882.
- Li, W., y Neugebauer, V. 2004. Block of NMDA and non-NMDA receptor activation results in reduced background and evoked activity of central amygdala neurons in a model of arthritic pain. *Pain* 110:112-122. doi:10.1016/j.pain.2004.03.015.
- Little, C.B., y Zaki, S. 2012. What constitutes an «animal model of osteoarthritis» - the need for consensus?. *Osteoarthr. Cartil.* 20:261-267. doi:10.1016/j.joca.2012.01.017.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., y Goldring, M.B. 2012. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64:1697-1707. doi:10.1002/art.34453.
- MacNeil, J.A., Doschak, M.R., Zernicke, R.F., y Boyd, S.K. 2008. Preservation of periarticular cancellous morphology and mechanical stiffness in post-traumatic experimental osteoarthritis by antiresorptive therapy. *Clin. Biomech.* 23:365-371. doi:10.1016/j.clinbiomech.2007.10.015.
- Maldonado, M., y Nam, J. 2013. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res. Int.* 2013. doi:10.1155/2013/284873.
- Malek, S., Sample, S.J., Schwartz, Z., Nemke, B., Jacobson, P.B., Cozzi, E.M., Schaefer, S.L., Bleedorn, J.A., Holzman, G., y Muir, P. 2012. Effect of analgesic therapy on clinical outcome measures in a randomized controlled trial using client-owned dogs with hip osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 8:185. doi:10.1186/1746-6148-8-185.
- Malek, S., Weng, H.Y., Martinson, S.A., Rochat, M.C., Béraud, R., y Riley, C.B. 2020. Evaluation of serum MMP-2 and MMP-3, synovial fluid IL-8, MCP-1, and KC

- concentrations as biomarkers of stifle osteoarthritis associated with naturally occurring cranial cruciate ligament rupture in dogs. *PLoS One* 15. doi:10.1371/journal.pone.0242614.
- Mankin, H.J. 1974. The Reaction of Articular Cartilage to Injury and Osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.* 291:1335-1340. doi:10.1056/nejm197412192912507.
- Mantovani, V., Maccari, F., y Volpi, N. 2016. Chondroitin Sulfate and Glucosamine as Disease Modifying Anti- Osteoarthritis Drugs (DMOADs). *Curr. Med. Chem.* 23:1139-1151. doi:10.2174/0929867323666160316123749.
- Mapp, P.I., y Walsh, D.A. 2012. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8:390-398. doi:10.1038/nrrheum.2012.80.
- Martel-Pelletier, J., Farran, A., Montell, E., Vergés, J., y Pelletier, J.-P. 2015. Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. *Molecules* 20:4277-4289. doi:10.3390/molecules20034277.
- Mashiba, T., Hirano, T., Turner, C.H., Forwood, M.R., Johnston, C.C., y Burr, D.B. 2000. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *J. Bone Miner. Res.* 15:613-620. doi:10.1359/jbmr.2000.15.4.613.
- Mathews, K., Kronen, P.W., Lascelles, D., Nolan, A., Robertson, S., Steagall, P.V., Wright, B., y Yamashita, K. 2015. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. *Vet. Nurse* 6:164-173. doi:10.12968/vetn.2015.6.3.164.
- McAlindon, T.E., LaValley, M.P., Harvey, W.F., Price, L.L., Driban, J.B., Zhang, M., y Ward, R.J. 2017. Effect of intra-articular triamcinolone vs saline on knee cartilage volume and pain in patients with knee osteoarthritis a randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 317:1967-1975. doi:10.1001/jama.2017.5283.
- McCarthy, G., O'Donovan, J., Jones, B., McAllister, H., Seed, M., y Mooney, C. 2007. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet. J.* 174:54-61. doi:10.1016/j.tvjl.2006.02.015.
- McCarty, M.F., O'Keefe, J.H., y DiNicolantonio, J.J. 2019. Glucosamine for the Treatment of Osteoarthritis: The Time Has Come for Higher-Dose Trials. *J. Diet. Suppl.* 16:179-192. doi:10.1080/19390211.2018.1448920.
- McCoy, A.M. 2015. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet. Pathol.* 52:803-818. doi:10.1177/0300985815588611.
- McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Fuller, C.J., Hurtig, M., y Cruz, A. 2010. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthr. Cartil.* 18. doi:10.1016/j.joca.2010.05.031.
- Mei, L., Shen, B., Ling, P., Liu, S., Xue, J., Liu, F., Shao, H., Chen, J., Ma, A., y Liu, X. 2017.

- Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One* 12. doi:10.1371/journal.pone.0176107.
- Messenger, K.M., Hopfensperger, M., Knych, H.K., y Papich, M.G. 2016. Pharmacokinetics of detomidine following intravenous or oral-transmucosal administration and sedative effects of the oral-transmucosal treatment in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 77:413-420. doi:10.2460/ajvr.77.4.413.
- Mével, E., Monfoulet, L.E., Merceron, C., Coxam, V., Wittrant, Y., Beck, L., y Guicheux, J. 2014. Nutraceuticals in joint health: Animal models as instrumental tools. *Drug Discov. Today* 19:1649-1658. doi:10.1016/j.drudis.2014.06.012.
- Miller, R.E., Block, J.A., y Malfait, A.M. 2017. Nerve growth factor blockade for the management of osteoarthritis pain: What can we learn from clinical trials and preclinical models?. *Curr. Opin. Rheumatol.* 29:110-118. doi:10.1097/BOR.0000000000000354.
- Mohan, G., Perilli, E., Parkinson, I.H., Humphries, J.M., Fazzalari, N.L., y Kuliwaba, J.S. 2013. Pre-emptive, early, and delayed alendronate treatment in a rat model of knee osteoarthritis: Effect on subchondral trabecular bone microarchitecture and cartilage degradation of the tibia, bone/cartilage turnover, and joint discomfort. *Osteoarthr. Cartil.* 21:1595-1604. doi:10.1016/j.joca.2013.06.020.
- Monteiro-Steagall, B.P., Steagall, P.V.M., y Lascelles, B.D.X. 2013. Systematic Review of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Adverse Effects in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27:1011-1019. doi:10.1111/jvim.12127.
- Monteiro, B.P., Klinck, M.P., Moreau, M., Guillot, M., Steagall, P.V., Edge, D.K., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., Gauvin, D., del Castillo, J.R., y Troncy, E. 2016. Analgesic efficacy of an oral transmucosal spray formulation of meloxicam alone or in combination with tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. *Vet. Anaesth. Analg.* 43:643-651. doi:10.1111/vaa.12360.
- Monteiro, B.P., Klinck, M.P., Moreau, M., Guillot, M., Steagall, P.V.M., Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., Gauvin, D., Del Castillo, J.R.E., y Troncy, E. 2017. Analgesic efficacy of tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. *PLoS One* 12. doi:10.1371/journal.pone.0175565.
- Monteiro, B.P., Lambert, C., Bianchi, E., Genevois, J.P., Soldani, G., y Troncy, E. 2019. Safety and efficacy of reduced dosage ketoprofen with or without tramadol for long-term treatment of osteoarthritis in dogs: a randomized clinical trial. *BMC Vet. Res.* 15:213. doi:10.1186/s12917-019-1960-3.
- Moreau, M., Dupuis, J., Bonneau, N.H., y Desnoyers, M. 2003. Clinical evaluation of a nutraceutical, carprofen and meloxicam for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet. Rec.* 152:323-329. doi:10.1136/vr.152.11.323.
- Moreau, M., Riolland, P., Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Boileau, C., Caron, J., Frank, D., Lussier, B., del Castillo, J.R.E., Beauchamp, G., Gauvin, D.,

- Bertaim, T., Thibaud, D., y Troncy, E. 2011. Tiludronate treatment improves structural changes and symptoms of osteoarthritis in the canine anterior cruciate ligament model. *Arthritis Res. Ther.* 13:R98. doi:10.1186/ar3373.
- Moskowitz, R.W., Davis, W., Sammarco, J., Martens, M., Baker, J., Mayor, M., Burstein, A.H., y Frankel, V.H. 1973. Experimentally Induced Degenerative Joint Lesions Following Partial Meniscectomy in the Rabbit. *Arthritis Rheum.* 16:397-405. doi:10.1002/art.1780160317.
- Muehleman, C., Green, J., Williams, J.M., Kuettner, K.E., Thonar, E.M., y Sumner, D.R. 2002. The effect of bone remodeling inhibition by zoledronic acid in an animal model of cartilage matrix damage. *Osteoarthr. Cartil.* 10:226-233. doi:10.1053/j.joca.2001.0506.
- Mullard, A. 2015. Drug developers reboot anti-NGF pain programmes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:297-298. doi:10.1038/nrd4612.
- Muratovic, D., Findlay, D.M., Cicuttini, F.M., Wluka, A.E., Lee, Y.R., Edwards, S., y Kuliwaba, J.S. 2019. Bone marrow lesions in knee osteoarthritis: regional differences in tibial subchondral bone microstructure and their association with cartilage degeneration. *Osteoarthr. Cartil.* 27:1653-1662. doi:10.1016/j.joca.2019.07.004.
- Nakao, K., Murase, A., Ohshiro, H., Okumura, T., Taniguchi, K., Murata, Y., Masuda, M., Kato, T., Okumura, Y., y Takada, J. 2007. CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322:686-694. doi:10.1124/jpet.107.122010.
- Nelson, A.E. 2018. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthr. Cartil.* 26:319-325. doi:10.1016/j.joca.2017.11.014.
- Neogi, T. 2013. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 21:1145-1153. doi:10.1016/j.joca.2013.03.018.
- Neogi, T., Felson, D., Niu, J., Nevitt, M., Lewis, C.E., Aliabadi, P., Sack, B., Torner, J., Bradley, L., y Zhang, Y. 2009. Association between radiographic features of knee osteoarthritis and pain: Results from two cohort studies. *BMJ* 339:498-501. doi:10.1136/bmj.b2844.
- Neundorff, R.H., Lowerison, M.B., Cruz, A.M., Thomason, J.J., McEwen, B.J., y Hurtig, M.B. 2010. Determination of the prevalence and severity of metacarpophalangeal joint osteoarthritis in Thoroughbred racehorses via quantitative macroscopic evaluation. *Am. J. Vet. Res.* 71:1284-1293. doi:10.2460/ajvr.71.11.1284.
- Nishii, T., Tamura, S., Shiomi, T., Yoshikawa, H., y Sugano, N. 2013. Alendronate treatment for hip osteoarthritis: Prospective randomized 2-year trial. *Clin. Rheumatol.* 32:1759-1766. doi:10.1007/s10067-013-2338-8.
- O'Driscoll, S.W., Keeley, F.W., y Salter, R.B. 1986. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness

- defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* 68:1017-1035. doi:10.2106/00004623-198668070-00008.
- O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., y Brodbelt, D.C. 2014. Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. *PLoS One* 9:e90501. doi:10.1371/journal.pone.0090501.
- Ogawa, K., Mawatari, M., Komine, M., Shigematsu, M., Kitajima, M., Kukita, A., y Hotokebuchi, T. 2007. Mature and activated osteoclasts exist in the synovium of rapidly destructive coxarthrosis. *J. Bone Miner. Metab.* 25:354-360. doi:10.1007/s00774-007-0761-0.
- Ohnishi, A., Osaki, T., Matahira, Y., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y., y Minami, S. 2013. Evaluation of the chondroprotective effects of glucosamine and fish collagen peptide on a rabbit ACLT model using serum biomarkers. *J. Vet. Med. Sci.* 75:421-429. doi:10.1292/jvms.12-0240.
- Oliveira, M.Z., Albano, M.B., Stirna, G.A., Namba, M.M., Vidigal, L., y Cunha, L.A.M. da. 2018. Intra-articular viscosupplementation of hyaluronic acids in an experimental osteoarthritis model. *Rev. Bras. Ortop. (English Ed.* 53:293-299. doi:10.1016/j.rboe.2018.03.009.
- Omata, T., Itokazu, Y., Inoue, N., y Segawa, Y. 2000. Effects of chondroitin sulfate-C on articular cartilage destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 50:148-153. doi:10.1055/s-0031-1300180.
- Pacheco, M., Knowles, T.G., Hunt, J., Slingsby, L.S., Taylor, P.M., y Murrell, J.C. 2020. Comparing paracetamol/codeine and meloxicam for postoperative analgesia in dogs: A non-inferiority trial. *Vet. Rec.* 187. doi:10.1136/vr.105487.
- Panahifar, A., Jaremko, J.L., Tessier, A.G., Lambert, R.G., Maksymowych, W.P., Fallone, B.G., y Doschak, M.R. 2014. Development and reliability of a multi-modality scoring system for evaluation of disease progression in pre-clinical models of osteoarthritis: Celecoxib may possess disease-modifying properties. *Osteoarthr. Cartil.* 22:1639-1650. doi:10.1016/j.joca.2014.06.013.
- Panahifar, A., Maksymowych, W.P., y Doschak, M.R. 2012. Potential mechanism of alendronate inhibition of osteophyte formation in the rat model of post-traumatic osteoarthritis: Evaluation of elemental strontium as a molecular tracer of bone formation. *Osteoarthr. Cartil.* 20:694-702. doi:10.1016/j.joca.2012.03.021.
- Pastoureau, P., Hunziker, E.B., y Pelletier, J.-P. 2010. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S106-S112. doi:10.1016/j.joca.2010.05.024.
- Pastoureau, P., Leduc, S., Chomel, A., y De Ceuninck, F. 2003. Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 11:412-423.

doi:10.1016/S1063-4584(03)00050-5.

- Pauly, H.M., Larson, B.E., Coatney, G.A., Button, K.D., DeCamp, C.E., Fajardo, R.S., Haut, R.C., y Haut Donahue, T.L. 2015. Assessment of cortical and trabecular bone changes in two models of post-traumatic osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 33:1835-1845. doi:10.1002/jor.22975.
- Pearson, R.G., Kurien, T., Shu, K.S.S., y Scammell, B.E. 2011. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis - reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthr. Cartil.* 19:324-331. doi:10.1016/j.joca.2010.12.005.
- Pedersen, D., Goetz, J., Kurriger, y Martin. 2013. Comparative digital cartilage histology for human and common osteoarthritis models. *Orthop. Res. Rev.* 2013:13. doi:10.2147/orr.s38400.
- Pelletier, J.P., Troncy, É., Bertaim, T., Thibaud, D., Goulet, A.C., Abram, F., Caron, J., Boileau, C., D'Anjou, M.A., Moreau, M., Lussier, B., y Martel-Pelletier, J. 2011. Treatment with tiludronic acid helps reduce the development of experimental osteoarthritis lesions in dogs with anterior cruciate ligament transection followed by reconstructive surgery: A 1-year study with quantitative magnetic resonance imaging. *J. Rheumatol.* 38:118-128. doi:10.3899/jrheum.100642.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., y Würbel, H. 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol.* 18:e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410.
- Permuy, M., Guede, D., López-Peña, M., Muñoz, F., Caeiro, J.R., y González-Cantalapiedra, A. 2015a. Effects of diacerein on cartilage and subchondral bone in early stages of osteoarthritis in a rabbit model. *BMC Vet. Res.* 11:143. doi:10.1186/s12917-015-0458-x.
- Permuy, M., Guede, D., López-Peña, M., Muñoz, F., Caeiro, J.R., y González-Cantalapiedra, A. 2015b. Comparison of various SYSADOA for the osteoarthritis treatment: An experimental study in rabbits. *Clinical rheumatology and osteoporosis. BMC Musculoskelet. Disord.* 16:1-12. doi:10.1186/s12891-015-0572-8.
- Permuy, M., Guede, D., López-Peña, M., Muñoz, F., González-Cantalapiedra, A., y Caeiro, J.R. 2014. Effects of glucosamine and risedronate alone or in combination in an experimental rabbit model of osteoarthritis. *BMC Vet. Res.* 10:1-11. doi:10.1186/1746-6148-10-97.
- Pettitt, R.A., y German, A.J. 2015. Investigation and management of canine osteoarthritis. *In Pract.* 37:1-8. doi:10.1136/inp.h5763.

- Pinamont, W.J., Yoshioka, N.K., Young, G.M., Karuppagounder, V., Carlson, E.L., Ahmad, A., Elbarbary, R., y Kamal, F. 2020. Standardized histomorphometric evaluation of osteoarthritis in a surgical mouse model. *J. Vis. Exp.* 2020:e60991. doi:10.3791/60991.
- Pineda, S., Pollack, A., Stevenson, S., Goldberg, V., y Caplan, A. 1992. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Cells Tissues Organs* 143:335-340. doi:10.1159/000147272.
- Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Laverty, S., Lockwood, S., Matyas, J., McDougall, J., Pritzker, K., Rudolphi, K., van den Berg, W., y Yaksh, T. 2010. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 18:S10-S16. doi:10.1016/j.joca.2010.05.027.
- Pritzker, K.P.H., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.-P., Revell, P.A., Salter, D., y van den Berg, W.B. 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthr. Cartil.* 14:13-29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014.
- Rausch-Derra, L., Huebner, M., Wofford, J., y Rhodes, L. 2016. A Prospective, Randomized, Masked, Placebo-Controlled Multisite Clinical Study of Grapiprant, an EP4 Prostaglandin Receptor Antagonist (PRA), in Dogs with Osteoarthritis. *J. Vet. Intern. Med.* 30:756-763. doi:10.1111/jvim.13948.
- Rausch-Derra, L.C., Huebner, M., y Rhodes, L. 2015. Evaluation of the safety of long-term, daily oral administration of grapiprant, a novel drug for treatment of osteoarthritic pain and inflammation, in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 76:853-859. doi:10.2460/ajvr.76.10.853.
- Rausch-Derra, L.C., y Rhodes, L. 2016. Safety and toxicokinetic profiles associated with daily oral administration of grapiprant, a selective antagonist of the prostaglandin E₂ EP4 receptor, to cats. *Am. J. Vet. Res.* 77:688-692. doi:10.2460/ajvr.77.7.688.
- Rausch-Derra, L.C., Rhodes, L., Freshwater, L., y Hawks, R. 2016. Pharmacokinetic comparison of oral tablet and suspension formulations of grapiprant, a novel therapeutic for the pain and inflammation of osteoarthritis in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39:566-571. doi:10.1111/jvp.12306.
- Reichenbach, S., Sterchi, R., Scherer, M., Trelle, S., Bürgi, E., Bürgi, U., Dieppe, P.A., y Jüni, P. 2007. Meta-analysis: Chondroitin for osteoarthritis of the knee or hip. *Ann. Intern. Med.* 146:580-590. doi:10.7326/0003-4819-146-8-200704170-00009.
- Richardson, D., Pearson, R.G., Kurian, N., Latif, M.L., Garle, M.J., Barrett, D.A., Kendall, D.A., Scammell, B.E., Reeve, A.J., y Chapman, V. 2008. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10. doi:10.1186/ar2401.
- Robertson-Plouch, C., Stille, J.R., Liu, P., Smith, C., Brown, D., Warner, M., Hu, L., y

- Fisher, M.J. 2019. A randomized clinical efficacy study targeting mPGES1 or EP4 in dogs with spontaneous osteoarthritis. *Sci. Transl. Med.* 11. doi:10.1126/scitranslmed.aaw9993.
- Rochat, M.C. 2001. Arthroscopy.. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 31. doi:10.1016/S0195-5616(01)50069-8.
- Roman-Blas, J.A., Mediero, A., Tardío, L., Portal-Nuñez, S., Gratal, P., Herrero-Beaumont, G., y Largo, R. 2017. The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 794:8-14. doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.015.
- Roseti, L., Desando, G., Cavallo, C., Petretta, M., y Grigolo, B. 2019. Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8111305.
- Rychel, J.K. 2010. Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Top. Companion Anim. Med.* 25:20-25. doi:10.1053/j.tcam.2009.10.005.
- Sabatini, M., Lesur, C., Thomas, M., Chomel, A., Anract, P., de Nanteuil, G., y Pastoureau, P. 2005. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52:171-180. doi:10.1002/art.20900.
- Saberi Hosnijeh, F., Bierma-Zeinstra, S.M., y Bay-Jensen, A.C. 2019. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthr. Cartil.* 27:412-423. doi:10.1016/j.joca.2018.12.002.
- Sakata, R., y Reddi, A.H. 2016. Platelet-Rich Plasma Modulates Actions on Articular Cartilage Lubrication and Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.* 22:408-419. doi:10.1089/ten.teb.2015.0534.
- De Salazar Alcalá, A.G., Gioda, L., Dehman, A., y Beugnet, F. 2019. Assessment of the efficacy of firocoxib (Previcox®) and grapiprant (Galliprant®) in an induced model of acute arthritis in dogs. *BMC Vet. Res.* 15. doi:10.1186/s12917-019-2052-0.
- Salman, A., Shabana, A.I., El-ghazouly, D.E.S., y Maha, E. 2019. Protective effect of glucosamine and risedronate (alone or in combination) against osteoarthritic changes in rat experimental model of immobilized knee. *Anat. Cell Biol.* 52:498-510. doi:10.5115/acb.19.050.
- Di Salvo, A., Chiaradia, E., Nannarone, S., y della Rocca, G. 2021. Intra-articular use of analgesic/ant inflammatory drugs in dogs and horses. *Res. Vet. Sci.* 134:159-170. doi:10.1016/j.rvsc.2020.12.014.
- Sanches, M., Assis, L., Criniti, C., Fernandes, D., Tim, C., y Renno, A.C.M. 2017. Chondroitin sulfate and glucosamine sulfate associated to photobiomodulation prevents degenerative morphological changes in an experimental model of osteoarthritis in rats. *Lasers Med. Sci.* 33:549-557. doi:10.1007/s10103-017-

2401-9.

- Sandell, L. 2007. Anabolic Factors in Degenerative Joint Disease. *Curr. Drug Targets* 8:359-365. doi:10.2174/138945007779940142.
- Scanzello, C.R., y Goldring, S.R. 2012. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51:249-257. doi:10.1016/j.bone.2012.02.012.
- Schneider, H. 2012. Symptom-Modifying Effect of Chondroitin Sulfate in Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials Performed with Structum®. *Open Rheumatol. J.* 6:183-189. doi:10.2174/1874312901206010183.
- Schulze-Tanzil, G. 2021. Experimental therapeutics for the treatment of osteoarthritis. *J. Exp. Pharmacol.* 13:101-125. doi:10.2147/JEP.S237479.
- Scott, R.M., Evans, R., y Conzemius, M.G. 2017. Efficacy of an oral nutraceutical for the treatment of canine osteoarthritis: A double-blind, randomized, placebo-controlled prospective clinical trial. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 30:318-323. doi:10.3415/VCOT-17-02-0020.
- Scotto D'Abusco, A., Corsi, A., Grillo, M.G., Cicione, C., Calamia, V., Panzini, G., Sansone, A., Giordano, C., Politi, L., y Scandurra, R. 2008. Effects of intra-articular administration of glucosamine and a peptidyl-glucosamine derivative in a rabbit model of experimental osteoarthritis: A pilot study. *Rheumatol. Int.* 28:437-443. doi:10.1007/s00296-007-0463-x.
- Sellam, J., y Berenbaum, F. 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6:625-635. doi:10.1038/nrrheum.2010.159.
- Sellers, R.S., Peluso, D., y Morris, E.A. 1997. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* 79:1452-1463. doi:10.2106/00004623-199710000-00002.
- Sharma, A.R., Jagga, S., Lee, S.S., y Nam, J.S. 2013. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 14:19805-19830. doi:10.3390/ijms141019805.
- She, G., Zhou, Z., Zha, Z., Wang, F., y Pan, X. 2017. Protective effect of zoledronic acid on articular cartilage and subchondral bone of rabbits with experimental knee osteoarthritis. *Exp. Ther. Med.* 14:4901-4909. doi:10.3892/etm.2017.5135.
- Shikhman, A.R., Amiel, D., D'Lima, D., Hwang, S.B., Hu, C., Xu, A., Hashimoto, S., Kobayashi, K., Sasho, T., y Lotz, M.K. 2005. Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 64:89-94. doi:10.1136/ard.2003.019406.
- Shiple, H., Flynn, K., Tucker, L., Wendt-Hornickle, E., Baldo, C., Almeida, D., Allweiler, S., y Guedes, A. 2020. Owner evaluation of quality of life and mobility in

- osteoarthritic cats treated with amantadine or placebo. *J. Feline Med. Surg.* doi:10.1177/1098612X20967639.
- Shirai, T., Kobayashi, M., Nishitani, K., Satake, T., Kuroki, H., Nakagawa, Y., y Nakamura, T. 2011. Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 29:1572-1577. doi:10.1002/jor.21394.
- Shmagel, A., Demmer, R., Knights, D., Butler, M., Langsetmo, L., Lane, N.E., y Ensrud, K. 2019. The effects of glucosamine and chondroitin sulfate on gut microbial composition: A systematic review of evidence from animal and human studies. *Nutrients* 11:294. doi:10.3390/nu11020294.
- Silva, F.S., Yoshinari, N.H., Castro, R.R., Girão, V.C.C., Pompeu, M.M.L., Andrade Feitosa, J.P., y Rocha, F.A.C. 2009. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. *Clin. Rheumatol.* 28:109-117. doi:10.1007/s10067-008-0988-8.
- da Silva Xavier, A.A., da Rosa, P.P., de Brum Mackmill, L., y Roll, V.F.B. 2021. An assessment of the effectiveness of hyaluronic acid and polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis: Systematic review and network meta-analysis. *Res. Vet. Sci.* 134:42-50. doi:10.1016/j.rvsc.2020.11.013.
- Slingerland, L.I., Hazewinkel, H.A.W., Meij, B.P., Picavet, P., y Voorhout, G. 2011. Cross-sectional study of the prevalence and clinical features of osteoarthritis in 100 cats. *Vet. J.* 187:304-309. doi:10.1016/j.tvjl.2009.12.014.
- Smith, G.K., Paster, E.R., Powers, M.Y., Lawler, D.F., Biery, D.N., Shofer, F.S., McKelvie, P.J., y Kealy, R.D. 2006. Lifelong diet restriction and radiographic evidence of osteoarthritis of the hip joint in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229:690-693. doi:10.2460/javma.229.5.690.
- Sniekers, Y.H., Weinans, H., Jvm Van Osch, G., y Ptm Van Leeuwen, J. 2010. Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12:R182. doi:10.1186/ar3148.
- Souza, M.V. de. 2016. Osteoarthritis in horses - Part 2: a review of the intra-articular use of corticosteroids as a method of treatment. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 59:16150025. doi:10.1590/1678-4324-2016150025.
- Spector, T.D., Conaghan, P.G., Buckland-Wright, J.C., Garnero, P., Cline, G.A., Beary, J.F., Valent, D.J., y Meyer, J.M. 2005. Effect of risedronate on joint structure and symptoms of knee osteoarthritis: results of the BRISK randomized, controlled trial [ISRCTN01928173]. *Arthritis Res. Ther.* 7:625-633. doi:10.1186/ar1716.
- Strassle, B.W., Mark, L., Leventhal, L., Piesla, M.J., Jian Li, X., Kennedy, J.D., Glasson, S.S., y Whiteside, G.T. 2010. Inhibition of osteoclasts prevents cartilage loss and pain in a rat model of degenerative joint disease. *Osteoarthr. Cartil.* 18:1319-1328. doi:10.1016/J.JOCA.2010.06.007.

- Sugasawa, T., Kuji, T., Aoki, K., Yanazawa, K., Takenouchi, A., Watanabe, M., Tome, Y., Takeuchi, Y., Aita, Y., Yahagi, N., Shishikura, Y., Ono, S., Yoshida, Y., Kawakami, Y., y Takekoshi, K. 2020. Characterization of osteoarthritis in a medial meniscectomy-induced animal model using contrast-enhanced X-ray microtomography. *Biomedicines* 8. doi:10.3390/biomedicines8030056.
- Sun, Y., Zhang, G., Liu, Q., Liu, X., Wang, L., Wang, J., y Liang, L. 2018. Chondroitin sulfate from sturgeon bone ameliorates pain of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 117:95-101. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.124.
- Taniguchi, S., Ryu, J., Seki, M., Sumino, T., Tokuhashi, Y., y Esumi, M. 2012. Long-term oral administration of glucosamine or chondroitin sulfate reduces destruction of cartilage and up-regulation of MMP-3 mRNA in a model of spontaneous osteoarthritis in Hartley guinea pigs. *J. Orthop. Res.* 30:673-678. doi:10.1002/jor.22003.
- Teeple, E., Jay, G.D., Elsaid, K.A., y Fleming, B.C. 2013. Animal models of osteoarthritis: Challenges of model selection and analysis. *AAPS J.* 15:438-446. doi:10.1208/s12248-013-9454-x.
- Terencio, M.C., Ferrándiz, M.L., Carceller, M.C., Ruhí, R., Dalmau, P., Vergés, J., Montell, E., Torrent, A., y Alcaraz, M.J. 2016. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomed. Pharmacother.* 79:120-128. doi:10.1016/j.biopha.2016.02.005.
- Thomsen, J.S., Straarup, T.S., Danielsen, C.C., Oxlund, H., y Brüel, A. 2013. No effect of risedronate on articular cartilage damage in the Dunkin Hartley guinea pig model of osteoarthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 42:408-416. doi:10.3109/03009742.2013.774046.
- Tiralocche, G., Girard, C., Chouinard, L., Sampalis, J., Moquin, L., Ionescu, M., Reiner, A., Poole, A.R., y Laverty, S. 2005. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 52:1118-1128. doi:10.1002/art.20951.
- Torelli, S.R., Rahal, S.C., Volpi, R.S., Sequeira, J.L., y Grassioto, I.Q. 2005. Histopathological evaluation of treatment with chondroitin sulphate for osteoarthritis induced by continuous immobilization in rabbits. *J. Vet. Med. Ser. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52:45-51. doi:10.1111/j.1439-0442.2004.00682.x.
- Torres-Torrillas, M., Rubio, M., Damia, E., Cuervo, B., Romero, A. Del, Peláez, P., Chicharro, D., Miguel, L., y Sopena, J.J. 2019. Adipose-derived mesenchymal stem cells: A promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20123105.
- Towheed, T., Maxwell, L., Anastassiades, T.P., Shea, B., Houpt, J.B., Welch, V., Hochberg, M.C., y Wells, G.A. 2005. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* doi:10.1002/14651858.CD002946.pub2.

- Towheed, T., Maxwell, L., Anastassiades, T.P., Shea, B., Houpt, J.B., Welch, V., Hochberg, M.C., y Wells, G.A. 2009. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* doi:10.1002/14651858.CD002946.pub2.
- Vaysbrot, E.E., Osani, M.C., Musetti, M.C., McAlindon, T.E., y Bannuru, R.R. 2018. Are bisphosphonates efficacious in knee osteoarthritis? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthr. Cartil.* 26:154-164. doi:10.1016/j.joca.2017.11.013.
- Venable, R.O., Stoker, A.M., Cook, C.R., Cockrell, M.K., y Cook, J.L. 2008. Examination of synovial fluid hyaluronan quantity and quality in stifle joints of dogs with osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.* 69:1569-1573. doi:10.2460/ajvr.69.12.1569.
- Vilar, J.M., Batista, M., Morales, M., Santana, A., Cuervo, B., Rubio, M., Cugat, R., Sopena, J., y Carrillo, J.M. 2014. Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. *BMC Vet. Res.* 10:143. doi:10.1186/1746-6148-10-143.
- Vilar, J.M., Cuervo, B., Rubio, M., Sopena, J., Domínguez, J.M., Santana, A., y Carrillo, J.M. 2016a. Effect of intraarticular inoculation of mesenchymal stem cells in dogs with hip osteoarthritis by means of objective force platform gait analysis: Concordance with numeric subjective scoring scales. *BMC Vet. Res.* 12:1-10. doi:10.1186/s12917-016-0852-z.
- Vilar, J.M., Rubio, M., Spinella, G., Cuervo, B., Sopena, J., Cugat, R., Garcia-Balleb, M., Dominguez, J.M., Granados, M., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J.J., y Carrillo, J.M. 2016b. Serum collagen type II cleavage epitope and serum hyaluronic acid as biomarkers for treatment monitoring of dogs with hip osteoarthritis. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0149472.
- De Vito, V., Salvadori, M., Poapolathep, A., Owen, H., Rychshanova, R., y Giorgi, M. 2017. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of grapiprant in a carrageenan-induced inflammatory pain model in the rabbit. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40:468-475. doi:10.1111/jvp.12380.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., y Goldberg, V.M. 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A* 76:579-592. doi:10.2106/0004623-199404000-00013.
- Wang, A., Leong, D.J., Cardoso, L., y Sun, H.B. 2018. Nutraceuticals and osteoarthritis pain. *Pharmacol. Ther.* 187:167-179. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.015.
- Wang, S.X., Arsenault, L., y Hunziker, E.B. 2011. Stereologic analysis of tibial-plateau cartilage and femoral cancellous bone in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469:2796-2805. doi:10.1007/s11999-011-1899-6.
- Wang, S.X., Laverty, S., Dumitriu, M., Plaas, A., y Gryn timer, M.D. 2007. The effects of

- glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 56:1537-1548. doi:10.1002/art.22574.
- Wang, X.X., y Cai, L. 2018. Expression level of proteoglycan, collagen and type II collagen in osteoarthritis rat model is promoted and degradation of cartilage is prevented by glucosamine methyl ester. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22:3609-3616. doi:10.26355/eurrev_201806_15188.
- Wang, Y.X. 2008. In vivo magnetic resonance imaging of animal models of knee osteoarthritis. *Lab. Anim.* 42:246-264. doi:10.1258/la.2007.06041e.
- Wen, C.Y., Chen, Y., Tang, H.L., Yan, C.H., Lu, W.W., y Chiu, K.Y. 2013. Bone loss at subchondral plate in knee osteoarthritis patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Osteoarthr. Cartil.* 21:1716-1723. doi:10.1016/j.joca.2013.06.027.
- Wen, Z.H., Tang, C.C., Chang, Y.C., Huang, S.Y., Hsieh, S.P., Lee, C.H., Huang, G.S., Ng, H.F., Neoh, C.A., Hsieh, C.S., Chen, W.F., y Jean, Y.H. 2010. Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: Association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 18:1192-1202. doi:10.1016/j.joca.2010.05.012.
- Wernecke, C., Braun, H.J., y Dragoo, J.L. 2015. The effect of intra-articular corticosteroids on articular cartilage: A systematic review. *Orthop. J. Sport. Med.* 3:1-7. doi:10.1177/2325967115581163.
- Wernham, B.G.J., Trumpatori, B., Hash, J., Lipsett, J., Davidson, G., Wackerow, P., Thomson, A., y Lascelles, B.D.X. 2011. Dose Reduction of Meloxicam in Dogs with Osteoarthritis-Associated Pain and Impaired Mobility. *J. Vet. Intern. Med.* 25:1298-1305. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00825.x.
- Willett, N.J., Thote, T., Hart, M., Moran, S., Guldberg, R.E., y Kamath, R. V. 2016. Quantitative pre-clinical screening of therapeutics for joint diseases using contrast enhanced micro-computed tomography. *Osteoarthr. Cartil.* 24:1604-1612. doi:10.1016/j.joca.2016.04.021.
- Wypij, J.M., y Heller, D.A. 2014. Pamidronate disodium for palliative therapy of feline bone-invasive tumors. *Vet. Med. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/675172.
- Yoshioka, M., Coutts, R.D., Amiel, D., y Hacker, S.A. 1996. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthr. Cartil.* 4:87-98. doi:10.1016/S1063-4584(05)80318-8.
- Yun, S., Ku, S.K., y Kwon, Y.S. 2016. Adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma synergistically ameliorate the surgical-induced osteoarthritis in Beagle dogs. *J. Orthop. Surg. Res.* 11. doi:10.1186/s13018-016-0342-9.
- Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y., y Hu, D. 2015. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based

therapy. *Stem Cell Res. Ther.* 6. doi:10.1186/s13287-015-0240-9.

Zhang, L., Hu, H., Tian, F., Song, H., y Zhang, Y. 2011. Enhancement of subchondral bone quality by alendronate administration for the reduction of cartilage degeneration in the early phase of experimental osteoarthritis. *Clin. Exp. Med.* 11:235-243. doi:10.1007/s10238-011-0131-z.

Zhornitsky, S., y Potvin, S. 2012. Cannabidiol in humans-The quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* 5:529-552. doi:10.3390/ph5050529.

Zhu, S., Chen, K., Lan, Y., Zhang, N., Jiang, R., y Hu, J. 2013. Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats. *Bone* 53:340-349. doi:10.1016/j.bone.2012.12.044.



ANEXOS

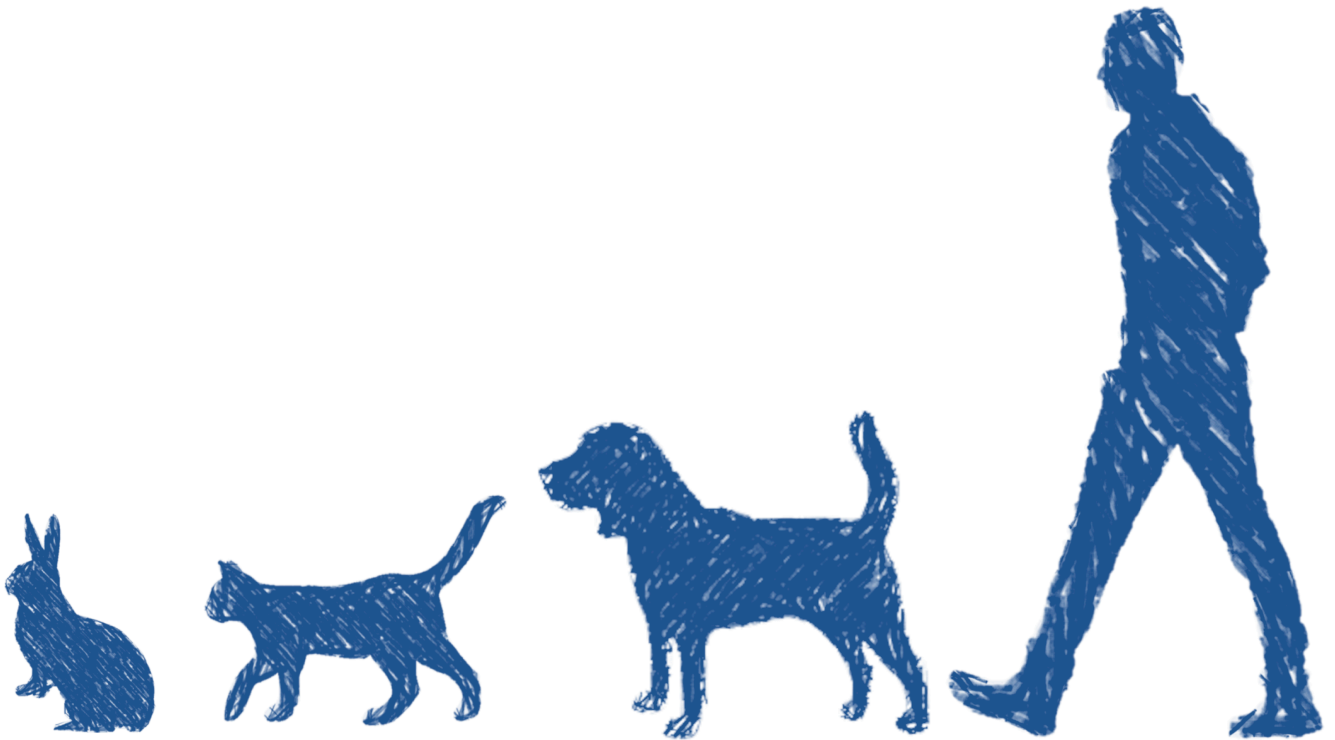


Tabla Suplementaria 1 . Evaluación morfológica macroscópica de las rodillas sanas (HT) y enfermas (OA)

	SHAM-OA	CONT-OA	RIS-OA	SYSADOA-OA	SHAM-HT	CONT-HT	RIS-HT	SYSADOA-HT
CFM	0.57 ± 0.53	2.25 ± 1.03 ^a <i>p</i> = 0.001	3.50 ± 0.76 ^a <i>p</i> < 0.001 ^b <i>p</i> = 0.006	3.14 ± 0.69 ^a <i>p</i> < 0.001	0.57 ± 0.52	0.37 ± 0.59 *	0.62 ± 0.59 *	0.71 ± 0.49 *
CFL	0.00 ± 0.00	2.12 ± 0.99 ^a <i>p</i> < 0.05	3.37 ± 0.92 ^a <i>p</i> < 0.05	2.29 ± 0.76 ^a <i>p</i> < 0.05	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.35 *	0.37 ± 0.59 *	0.00 ± 0.00 *
MTM	0.00 ± 0.00	2.25 ± 0.71 ^a <i>p</i> < 0.001	2.87 ± 0.99 ^a <i>p</i> < 0.001	2.57 ± 0.53 ^a <i>p</i> < 0.001	0.43 ± 0.53	0.12 ± 0.35 *	0.62 ± 0.59 *	0.57 ± 0.53 *
MTL	0.14 ± 0.38	2.00 ± 0.93 ^a <i>p</i> = 0.005	2.75 ± 1.28 ^a <i>p</i> < 0.001	2.14 ± 1.07 ^a <i>p</i> = 0.04	0.29 ± 0.49	0.37 ± 0.59 *	0.12 ± 0.35 *	0.29 ± 0.49 *
MM	0.29 ± 0.49	3.75 ± 1.28 ^a <i>p</i> < 0.05	4.87 ± 0.35 ^a <i>p</i> < 0.05	4.14 ± 0.69 ^a <i>p</i> < 0.05	1.14 ± 0.38 *	1.12 ± 0.35 *	1.50 ± 0.53 *	1.71 ± 0.76 *
ML	0.14 ± 0.38	3.75 ± 1.03 ^a <i>p</i> < 0.001	4.50 ± 0.53 ^a <i>p</i> < 0.001	3.57 ± 0.79 ^a <i>p</i> < 0.001	1.14 ± 1.07	1.62 ± 0.52 *	0.87 ± 0.35 *	1.33 ± 0.52 *
OST	0.57 ± 0.53	2.00 ± 0.76 ^a <i>p</i> < 0.001	2.62 ± 0.52 ^a <i>p</i> < 0.001	2.29 ± 0.49 ^a <i>p</i> < 0.001	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 *	0.25 ± 0.46 *	0.29 ± 0.49 *

OA, rodilla operada; HT, rodilla no-operada; CFM, cóndilo femoral medial; CFL, cóndilo femoral lateral; MTM, meseta tibial medial; MTL, meseta tibial lateral; MM, menisco medial; ML, menisco lateral; OST, osteofitos. Valores expresados en medias ± DS . Significación estadística *p*<0.05: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT, * vs. rodillas OA

Tabla Suplementaria 2 . Resultados de la evaluación histológica cualitativa

		SHAM-OA	CONT-OA	RIS-OA	SYSADOA-OA	SHAM-HT	CONT-HT	RIS-HT	SYSADOA-HT	
CARTÍLAGO	CFM	Patología del cartílago	0.29 ± 0.49	2.00 ± 1.19	2.37 ± 1.06 a	2.43 ± 0.53 a	0.43 ± 0.53	0.75 ± 0.71 *	0.12 ± 0.35 *	0.86 ± 0.69 *
		Patología de los condrocitos	0.14 ± 0.38	1.87 ± 1.13 a	2.12 ± 0.99 a	2.29 ± 0.95 a	0.14 ± 0.38	0.75 ± 0.71 *	0.50 ± 0.53 *	0.71 ± 0.49 *
		Tidemark	0.29 ± 0.49	1.25 ± 0.71	1.50 ± 0.53 a	1.57 ± 0.53 a	0.14 ± 0.38	0.62 ± 0.52	0.50 ± 0.53 *	0.71 ± 0.49 *
		Total	0.71 ± 1.11	5.12 ± 2.36 a	6.00 ± 2.20 a	6.29 ± 1.80 a	0.71 ± 0.49	2.12 ± 1.64 *	1.12 ± 1.13 *	2.29 ± 1.38 *
	CFL	Patología del cartílago	0.57 ± 0.53	1.62 ± 0.92	2.25 ± 1.03 a	2.29 ± 0.76 a	0.29 ± 0.49	0.71 ± 0.49	0.50 ± 0.53 *	0.71 ± 0.49 *
		Patología de los condrocitos	0.14 ± 0.38	2.00 ± 1.19 a	2.00 ± 1.19 a	2.00 ± 0.58 a	0.14 ± 0.38	0.71 ± 0.76 *	0.50 ± 0.53 *	0.86 ± 0.38 *
		Tidemark	0.43 ± 0.53	1.37 ± 0.52	1.25 ± 0.71	1.57 ± 0.53 a	0.14 ± 0.38	0.57 ± 0.53 *	0.62 ± 0.52	0.43 ± 0.53 *
		Total	1.14 ± 0.90	5.00 ± 2.45 a	5.50 ± 2.73 a	5.86 ± 1.46 a	0.57 ± 0.79	2.00 ± 1.63 *	1.62 ± 1.06 *	2.00 ± 1.00 *
	MTM	Patología del cartílago	0.86 ± 0.38	1.62 ± 0.52	2.00 ± 0.93	1.71 ± 0.76	0.43 ± 0.53	0.75 ± 0.46 *	0.57 ± 0.53 *	0.71 ± 0.49 *
		Patología de los condrocitos	0.00 ± 0.00	1.87 ± 0.64 a	2.12 ± 0.35 a	2.00 ± 0.58 a	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 *	0.43 ± 0.53 *	0.57 ± 0.53 *
		Tidemark	0.14 ± 0.38	1.62 ± 0.52 a	1.37 ± 0.52 a	1.57 ± 0.53 a	0.14 ± 0.38	0.37 ± 0.52 *	0.43 ± 0.53 *	0.57 ± 0.53 *
		Total	1.00 ± 0.58	5.12 ± 1.13 a	5.50 ± 1.41 a	5.29 ± 1.50 a	0.57 ± 0.53	1.12 ± 0.83 *	1.43 ± 0.98 *	1.86 ± 1.46 *
	MTL	Patología del cartílago	0.29 ± 0.49	1.25 ± 0.46	1.62 ± 0.92 a	1.57 ± 0.79 a	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.52 *	0.40 ± 0.55 *	0.14 ± 0.38 *
		Patología de los condrocitos	0.29 ± 0.49	2.37 ± 0.52 a	2.25 ± 0.71 a	2.00 ± 0.58 a	0.14 ± 0.38	0.12 ± 0.35 *	0.20 ± 0.45 *	0.14 ± 0.38 *
		Tidemark	0.43 ± 0.53	1.50 ± 0.53	1.37 ± 0.74	1.43 ± 0.53	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.53 *	0.60 ± 0.55	0.57 ± 0.53 *
Total		1.00 ± 1.00	5.12 ± 1.25 a	5.25 ± 1.58 a	5.00 ± 1.53 a	0.14 ± 0.38	1.00 ± 0.53 *	1.20 ± 1.09 *	0.86 ± 1.07 *	
SINOVIAL	Características de las células superficiales	0.14 ± 0.38	1.37 ± 0.52 a	1.14 ± 0.38 a	0.71 ± 0.49	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 *	0.00 ± 0.00 *	0.33 ± 0.82	
	Hiperplasia	0.86 ± 0.38	1.75 ± 0.46 a	1.28 ± 0.49	1.28 ± 0.49	0.43 ± 0.53	0.50 ± 0.53 *	0.43 ± 0.53 *	0.83 ± 0.75	
	Características de los infiltrados inflamatorios	0.29 ± 0.49	1.25 ± 0.46 a	0.86 ± 0.38	0.71 ± 0.49	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 *	0.14 ± 0.38 *	0.17 ± 0.41	
	Total	1.29 ± 0.95	4.37 ± 1.19 a	3.29 ± 0.95 a	2.71 ± 1.25 b	0.43 ± 0.53	0.50 ± 0.53 *	0.57 ± 0.79 *	1.33 ± 1.86	

OA, rodilla operada; HT, rodilla no-operada; CFM, cóndilo femoral medial; CFL, cóndilo femoral lateral; MTM, meseta tibial medial; MTL, meseta tibial lateral. Valores expresados en medias ± DS. Significación estadística p<0.05: ^a vs. SHAM, ^b vs. CONT, * vs. rodillas OA.