

EL EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAARTICULAR DE TEJIDO GRASO AUTÓLOGO MICROFRAGMENTADO SOBRE SÍNTESIS DE PROTEOGLICANO EN PACIENTES CON OSTEOARTRITIS DE RODILLA

Damir Hudetz, Igor Borić, Eduard Rod, Željko Jeleč, Andrej Radić, Trpimir Vrdoljak, Andrea Skelin, Gordan Lauc, Irena Trbojević-Akmačić, Mihovil Plečko, Ozren Polašek y Dragan Primorac.

Resumen:

La osteoartritis (OA) es uno de los principales trastornos musculoesqueléticos en la población adulta. Está asociada al daño del cartílago provocado por el deterioro del tejido de la matriz extracelular. El presente estudio explora el efecto de la inyección intraarticular de tejido adiposo autólogo microfragmentado para alojar condrocitos y proteoglicanos del cartílago en pacientes con OA de rodilla. Se realizó un ensayo clínico prospectivo, no aleatorizado, de intervención, abierto y de un solo centro, desde enero del 2016 a abril de 2017. Un total de 17 pacientes se inscribieron en el estudio y se evaluaron 32 rodillas con artrosis. Se realizó una intervención quirúrgica (lipoaspiración) seguida del procesamiento del tejido e inyección intraarticular del producto de tejido adiposo microfragmentado final en la (s) rodilla (s) afectada (s) en todos los pacientes. A los pacientes se les evaluó la escala visual analógica (VAS), la imagen de resonancia magnética del cartílago (dGEMRIC) y los glicanos de inmunoglobulina G (IgG) con retraso de gadolinio en la línea de base, a los tres, seis y 12 meses después del tratamiento. La secuencia de resonancia magnética en dGEMRIC debido a la infiltración del gadopentetato dimeglumina (Gd-DTPA2-) en el cartílago aniónico y con carga negativa indicó que los contenidos de glicosaminoglicanos del cartílago aumentaron significativamente en áreas específicas de la articulación de las rodillas tratadas. Además, consecuentemente la dGEMRIC reflejó cambios posteriores en el eje mecánico de las extremidades inferiores. Los resultados de nuestro estudio indican que el uso de tejido adiposo autólogo y microfragmentado en pacientes con artrosis de rodilla (medido por IRM dGEMRIC) incrementó el contenido de glicosaminoglicanos (GAG) en el cartílago hialino, acorde con la VAS y los resultados clínicos observados.

Palabras clave: célula madre mesenquimatosa; osteoartritis de rodilla; tejido adiposo; medicina regenerativa; dGEMRIC; glicosaminoglicanos; cartílago.

1. Introducción

El cartílago articular es un tejido que sirve únicamente con fines mecánicos. Permite el movimiento de las juntas al absorber y resistir las cargas mecánicas, al tiempo que permite una baja fricción entre las superficies de las juntas adyacentes. Estas propiedades mecánicas únicas dependen de la organización y la composición de la matriz extracelular. La lesión mecánica de una articulación es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar artrosis. Teniendo en cuenta que la osteoartritis de rodilla tiene una incidencia de 3.4 por 1000 ciudadanos y una prevalencia de 22 por cada 1000 ciudadanos, según un reciente estudio epidemiológico neerlandés, no es difícil comprender el impacto que esta enfermedad tiene en la población general. Los tratamientos para la osteoartritis de rodilla son una carga muy pesada para la sociedad en términos de costo, y no existen muchas evidencias científicas que apoyen las opciones de tratamiento disponibles, aparte de la artroplastia total de rodilla, en términos de eficacia para prevenir un mayor desarrollo de la enfermedad. Las opciones tales como la artroscopia de rodilla con desbridamiento, la inyección de corticosteroides y la inyección de plasma rico en plaquetas (PRP) tienen un limitado alcance terapéutico.

La comprensión de los procesos biológicos que ocurren durante el deterioro del cartílago en la osteoartritis (OA) es de suma importancia. El cartílago articular contiene hasta 10% de proteoglicanos por peso (principalmente agregano), y su pérdida es una señal temprana de artrosis. La importancia del agregano en la

formación de los miembros en las vértebras ha sido ampliamente estudiada. A nivel microscópico, existen evidencias tanto de la estructura (muerte celular de los condrocitos, duplicación de la marca registrada, etc.) como de los cambios bioquímicos (disminución del contenido de proteoglicanos y estructura alterada de los proteoglicanos) durante la progresión de la OA. Los proteoglicanos del cartílago disminuyen en tamaño y masa, y su concentración en el tejido disminuye con la edad.

La osteoartritis se caracteriza por una inflamación sistémica y crónica de bajo grado la cual recientemente adquirió el nombre de "envejecimiento de origen inflamatorio". Existe un creciente interés en los biomarcadores de la OA presentes en la sangre y el líquido sinovial, ya que los diagnósticos basados en el examen clínico y la radiografía han proporcionado poca información sobre los cambios metabólicos. Como prueba de los efectos sistémicos de la terapia con inyección de tejido graso micro-fragmentado en la glicosilación, analizamos la composición del glicoma de la inmunoglobulina G (IgG) tanto en el plasma sanguíneo como en el líquido sinovial. Es bien sabido que la composición del glicoma de la IgG es un biomarcador muy sensible que puede usarse para evaluar los procesos inflamatorios agudos y crónicos y, por lo tanto, son una excelente herramienta para realizar un seguimiento a los efectos sistémicos de las intervenciones terapéuticas.

Se han desarrollado nuevos enfoques biológicos para superar el problema de la disminución en el contenido de proteoglicanos en el cartílago

osteoartrítico. Las articulaciones diartrodiales tales como la rodilla son muy adecuadas para llevar a cabo terapias de inyección intraarticular, lo que permite una mayor biodisponibilidad, una menor exposición sistémica, menos efectos fuera del objetivo y menores costos. La principal desventaja de todos los enfoques intraarticulares es la rápida eliminación de los fármacos a través de los capilares en el caso de pequeñas moléculas, y a través de los capilares linfáticos en el caso de las macromoléculas. La vida media intraarticular de los corticosteroides rara vez excede las 12 horas y de 12 a 24 horas para el hialuronato. Las terapias de células intraarticulares han surgido recientemente como un método para superar la cinética del espacio articular que ha resultado infructuoso. En los últimos años se ha centrado la atención en las células madre mesenquimales (MSC) para su uso en diversos fines regenerativos. Sus efectos biológicos generales están mediados por la secreción de moléculas que inhiben la apoptosis causada por la isquemia e inhiben las formaciones de cicatrices, estimulan la angiogénesis y la estabilidad de los vasos y estimulan la mitosis de los progenitores intrínsecos a los tejidos. Estos efectos se han reconocido en la práctica con el propósito de la reconstrucción del ligamento de la rodilla y el tratamiento del cartílago osteoartrítico. En este estudio, investigamos los efectos de una innovadora técnica, la cual ha sido desarrollada para obtener tejido graso microfracturado. Las fuentes de MSC más fácilmente disponibles son la médula ósea y el tejido adiposo y en este contexto, el tejido adiposo se considera hoy en día como el más prometedor, debido a su abundancia, por ser de fácil acceso y por la simplicidad del procedimiento de aislamiento. Además, de los muchos tipos de células contenidos en el tejido adiposo, las MSC (ASC) comprenden hasta el 2%, mientras que solo el 0.02% de las células

en la médula ósea son MSC. Recientemente se ha centrado la atención en el uso de las ASC ya sea expandidas por medio de cultivo u obtenidas mediante tratamientos mecánicos o enzimáticos como la fracción vascular estromal (SVF), en el contexto de la regeneración del cartílago las cuales han mostrado unos resultados prometedores. Sin embargo, los estudios publicados hasta la fecha se han enfocado en la ingeniería de tejidos, la cual implica el uso de andamios, células y factores de crecimiento, solos o en cualquier combinación. Además de la gran cantidad de pasos de procesamiento, la gran carga económica y las restricciones asociadas con la expansión celular y la amplia manipulación, y los resultados obtenidos hasta la fecha están lejos de ser completamente satisfactorios. Por lo tanto, la disponibilidad de un tejido adiposo mínimamente manipulado que proporcione en un solo paso, los elementos clave para soportar una respuesta regenerativa natural, tendría una relevancia clínica notable. Sobre estas bases, en este estudio se utilizó una técnica disponible comercialmente que proporciona intraoperatoriamente un tejido adiposo microfragmentado y mínimamente manipulado sin expansión o tratamiento enzimático.

En este estudio inscribimos a pacientes con artrosis en la clasificación de Kellgren Lawrence en las etapas III y IV, y llevamos a cabo el seguimiento de los efectos de la administración de una inyección de tejido graso microfragmentado con células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) durante un período de 12 meses. Actualmente, en la práctica clínica cuando se diagnostica la OA el patrón de referencia es la radiografía; sin embargo, la radiografía se encuentra limitada por la insensibilidad a los cambios degenerativos tempranos. En este estudio, utilizamos imágenes de resonancia magnética de cartílago (dGEMRIC), de resonancia magnética de gadolinio retrasada (Gd)

para evaluar la síntesis de proteoglicanos. La dGEMRIC es una técnica de imagen molecular que se ha utilizado para estudiar la pérdida de glicosaminoglicanos (GAG) en el cartílago articular de pacientes con OA primaria, y se puede utilizar en pacientes con lesión del ligamento cruzado. Mediante las imágenes por dGEMRIC, se crean mapas en T1 del cartílago hialino siguiendo la administración intravenosa (IV) de un agente de contraste basado en gadolinio aniónico gadopentetato dimeglumina (GdDTPA2-). Dado que la matriz de cartílago está compuesta en gran parte por moléculas de GAG con grupos de carboxilo y sulfato cargados negativamente, esta repele los iones de contraste cargados negativamente. Como resultado, las concentraciones de gadolinio son más altas en las regiones del cartílago con concentraciones bajas de GAG, y el tiempo de relajación del cartílago T1 (T1Gd) se reduce. La concentración de Gd-DTPA2- por vóxel se describe mediante el índice dGEMRIC (T1Gd) que se calcula a partir de los cinco tiempos de inversión diferentes utilizando un método de ajuste de curva. En áreas con poco GAG, el T1Gd calculado será bajo y viceversa. El índice dGEMRIC resultante (el promedio de T1Gd en una región de interés) está relacionado tanto con la concentración de GAG como con el tiempo entre la administración de gadolinio y la adquisición de imágenes. Por lo tanto, el cartílago sano que contiene una gran cantidad de GAG tendrá bajas concentraciones de GdDTPA2-, mientras que el cartílago degradado tendrá altas concentraciones del agente de contraste en áreas donde se han perdido GAG. Los tiempos de relajación T1 son inversamente proporcionales a la concentración de Gd-DTPA2- y, por lo tanto, proporcionan una métrica cuantitativa de la integridad del cartílago.

En este estudio, planteamos la hipótesis de que existen cambios en la composición de la matriz extracelular del cartílago

articular después de la administración de tejido graso autólogo y microfracturado en pacientes con osteoartritis de rodilla los cuales son detectables con la evaluación del cartílago preestructural mediante la resonancia magnética (IRM). Hasta donde sabemos, no se han publicado resultados sobre los efectos de la administración intraarticular de tejido graso autólogo y microfracturado en el contenido de proteoglicanos en el cartílago osteoartítico.

Los condrocitos están expuestos a los efectos secundarios de cualquier fármaco que haya sido administrado por vía intraarticular, estos son sensibles a los cambios en el líquido sinovial debido a su dependencia de la difusión; por lo que la condrotoxicidad es un tema relativamente importante. Como en cualquier otra terapia intraarticular, es de mayor importancia la eficacia prolongada en lugar de la eliminación rápida de la medicación.

Quisimos comprobar si la administración intraarticular de tejido graso autólogo microfragmentado no resultaba condrotóxico y si tenía la eficacia de tratamiento durante el período de observación de 12 meses.

2. Pacientes y métodos

2.1. Diseño del estudio

De enero de 2016 a abril de 2017 en el hospital de especialidades St. Catherine, de Zabok/Zagreb, Croacia, se llevó a cabo un ensayo clínico de método abierto, de un solo centro, de intervención, de una única inyección intraarticular de tejido adiposo autólogo microfragmentado, el cual contenía Ad-MS, en pacientes con osteoartritis primaria de rodilla. El protocolo de estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional local (IRB) bajo la autorización No: EP 001/2016. El estudio se registró en ISRCTN (ID: ISRCTN13337022). Se inscribieron en el estudio pacientes con OA primaria de

rodilla que cumplieron con los criterios de inclusión en la clasificación radiológica (Kellgren Lawrence de grado II-IV, que el inicio de los síntomas en la rodilla fuera de seis meses o más, que el paciente tuviese la capacidad de seguir las instrucciones del estudio, con edades entre 40-85). Los criterios de exclusión fueron: edad <40 años o > 85 años; condromatosis o sinovitis villonodular de la rodilla; trauma reciente de la rodilla sintomática (<3 meses); enfermedad infecciosa de las articulaciones; malignidad; embarazo; pacientes con tratamiento anticoagulante con un tiempo de protrombina de (PT) (<0,70) o con trombocitopenia y/o trastorno de la coagulación; hipersensibilidad a los anestésicos locales.

Los participantes fueron evaluados usando una historia clínica detallada, examen físico completo y evaluación radiológica la cual incluía radiografías simples (pie derecho y proyecciones de rodilla LL), radiografía de peso completo (FLWB) de pie, para medir la alineación de las extremidades, MRI, dGEMRIC y resultados de pruebas bioquímicas de laboratorio. Se incluyó la Escala visual Analógica como evaluación adicional. Los pacientes fueron evaluados en los puntos de tiempo 0, 3 meses, 6 meses y 12 meses después de la intervención. En el estudio se inscribieron un total de 17 pacientes y se evaluaron 32 rodillas. Los pacientes recibieron información detallada oral y por escrito sobre el protocolo del estudio, y se les pidió que firmaran un formulario de consentimiento informado. Una vez que ingresaron al ensayo, se les asignó a los pacientes un código anónimo único y se recopilaron datos en el libro de registro de datos. La información de referencia recopilada en el registro incluyó diagnósticos primarios, historial médico y demografía de pacientes. Todos los procedimientos se estandarizaron e implementaron de acuerdo con el protocolo de procedimiento operativo estándar (SOP).

2.2. Recolección y procesamiento de muestras de sangre y sinovial

Se tomaron muestras de sangre para la medición de la proteína C-reactiva (CRP) en suero y para la extracción de sangre en plasma para los análisis de glicano IgG antes y después de la operación. Para mediciones de CRP se extrajeron muestras de sangre mediante dos tubos con vacío (vacutainer) provistos por Vacuette® Z Serum Clot Activator Tubes (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria), y Tubos Vacuette® EDTA (Greiner Bio-One) para análisis glicómicos de IgG. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 4 °C antes de su procesamiento en el laboratorio. Los aspirados de líquido sinovial para los análisis de glicosilación de IgG se tomaron durante el procedimiento, se almacenaron a (4 °C) y se transfirieron con muestras de sangre de plasma al glicol laboratorio.

2.3. Trasplante y procesamiento de tejido adiposo microfragmentado con Ad-MSc.

Los pacientes fueron remitidos a la unidad de cirugía ambulatoria con una admisión promedio de 3 horas. La parte quirúrgica del procedimiento se configuró en un quirófano. Los pacientes fueron colocados en posición decúbito supino; se limpió la piel abdominal con una loción antiséptica Dermoguard® (Antiséptica, Pulheim, Alemania), se enjuagó con la solución inyectable Aqua Pro (HZTM, Zagreb, Croacia), se secó y se desinfectó con la solución Skin-Des® (Antiséptica, Pulheim, Alemania). El procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo incluyó una etapa de infiltración en la que se prepararon un total de 250 ml de solución salina con 40 ml de una solución de lidocaína al 2% (Lidokain®, Belupo, Koprivnica, Croacia) y 1 ml de epinefrina (1 mg/ml) (Suprarenin®, Sanofi-Aventis, Berlín, Alemania), el cual se inyectó en el tejido adiposo subcutáneo abdominal. En la etapa de aspiración, se

realizó una lipoaspiración empleando la técnica estándar, y la grasa recolectada se introdujo en el dispositivo Lipogems® (Lipogems International SpA, Milán, Italia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante tal como se describió previamente. El producto de tejido adiposo microfragmentado final recogido y procesado se transfirió a varias jeringas de 10 ml y se inyectó intraarticularmente (4-15 ml) en las rodillas.

2.4. Aislamiento de inmunoglobulina G de muestras de plasma y de líquido sinovial.

La inmunoglobulina G se aisló a partir de muestras de plasma sanguíneo y líquido sinovial utilizando perlas de agarosa de proteína G (20 mg de IgG humana/mL de agarosa, Merck, Darmstadt, Alemania) utilizando un colector de vacío (Pall, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Todos los pasos llevados a cabo durante el procedimiento de aislamiento se realizaron con 50 mmHg aproximadamente. Todos los tampones se filtraron a través de filtros de PES (polietersulfona) de 0,2 μ m (Nalgene Thermo Fischer Scientific, Waltham, ME, EE. UU.). Se preparó hialuronidasa (HA) de testículos bovinos (400-1000 unidades/mg sólido, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Como solución madre se preparó 1 mg/ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1x, pH 7,4 (137 mmol de L-1 de NaCl, 2,7 mmol de L-1 de Na₂HPO₄, 9,7 mmol de L-1 de KH₂PO₄, 2,2 mmol de L-1 de KCl, titulados con NaOH a pH 7,4) y se almacenaron en alícuotas a -20°C antes de su uso. Las muestras de líquido sinovial (100 μ l) se pipetearon en los pocillos previamente designados de una placa de recogida, se diluyeron con 690 μ l de 1 x PBS, tampón (pH 7,4). Luego, se agregaron 10 μ l de solución madre de HA a cada muestra de líquido sinovial y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, las muestras se agitaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos más.

Se centrifugaron unas muestras de plasma (100 μ l) durante 3 minutos a 12.100 g, se pipetearon en los pocillos previamente designados de una placa de recogida y se diluyeron con 1 x PBS, pH 7.4 en una proporción de 1: 7. Todas las muestras de plasma y líquido sinovial fueron filtradas (después del tratamiento con HA) a través de placas de filtro AcroPrep GHP (polipropileno hidrófilo) (Pall) por medio de un colector de vacío (alrededor de 380 mmHg) e inmediatamente se aplicaron a perlas de proteína G equilibradas. Las perlas de agarosa de proteína G (65 μ l de suspensión) se pipetearon con una punta acortada a cada pocillo de placa de filtro AcroPrep GHP de 0,45 μ m (Pall), mientras que la proteína G de agarosa se agitó mediante de un agitador. Las perlas se lavaron con 4 x 100 μ l de 1 x PBS (pH 7,4) usando un colector de vacío (<50 mmHg). Se colocó una placa de filtro AcroPrep GHP que contenía las perlas de proteína G en una placa de recogida; el líquido sinovial filtrado y las muestras de plasma se transfirieron a las perlas y se agitaron durante 5 minutos en un agitador para facilitar la unión del IgG a las perlas. Las proteínas que no se unieron se lavaron con 3 x 500 μ l de 1 x PBS (pH 7,4). Luego, la placa del filtro AcroPrep GHP que contenía las perlas de proteína G se colocó en una placa de recogida limpia la cual contenía 34 μ L de 1 mol de hidrógeno-carbonato de amonio L-1. Para eludir la IgG unida, se agregaron a las perlas 2 x 100 μ l de ácido fórmico 0,1 mol L-1; las placas se agitaron durante 5 minutos cada vez en un agitador, y se eluyó con IgG utilizando un colector de vacío. Se secó un volumen de 100 μ l de cada fracción de elución en una centrifuga de vacío con un concentrador de vacío (Savant SC210A, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), una trampa de vapor (Savant RVT400, Thermo Scientific, Waltham, MA, United Estados) y una bomba de vacío (OFP400, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados

Unidos), para el análisis posterior de N-glucano.

2.5. Liberación, Etiquetado y Análisis de N-glicano mediante cromatografía líquida de ultra-rendimiento

Los N-glicanos de IgG aislados fueron liberados con PNGasa F (Promega, Madison, WI, EE. UU.) Y se marcaron con 2-aminobenzamida (Sigma-Aldrich); los excesos de reagentes se eliminaron por medio de limpieza con cromatografía líquida de interacción hidrófila de extracción en fase sólida (HILIC-SPE), tal como se describió previamente. El efluente se almacenó a -20 °C hasta que se llevase a cabo el análisis de cromatografía líquida de ultra-rendimiento (UPLC). Los N-glicanos marcados y purificados con fluorescencia se separaron mediante HILIC-UPLC usando un instrumento Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, EE. UU.) Tal como se describió previamente. Las muestras de N-glicano se separaron en 24 picos, y la cantidad de N-glicanos en cada pico cromatográfico se expresó como porcentaje del área total integrada (área%).

2.6. Radiografía

Para cada paciente Se llevaron a cabo radiografías simples (posición AP y proyecciones de rodilla LL). Se utilizó la clasificación de Kellgren Lawrence para evaluar el grado de OA de la rodilla usando cinco grados: Grado 0: no hubo elementos radiográficos de OA presentes; Grado 1: dudoso estrechamiento del espacio articular (JSN) y posibles descamaciones osteofíticas; Grado 2: osteofitos definidos y posible JSN en la radiografía de soporte anteroposterior; Grado 3: osteofitos múltiples, JSN definido, esclerosis, posible deformidad ósea; Grado 4: osteofitos grandes, marcado JSN, esclerosis grave y deformidad ósea definitiva. Se realizaron radiografías FLWB en la posición de pie para medir la alineación de las extremidades. La alineación se midió como el ángulo entre las líneas que conectan la

cabeza femoral y las eminencias tibiales, la mitad del tobillo y las eminencias tibiales.

2.7. Imágenes de Resonancia Magnética.

Las Imágenes de Resonancia Magnética se realizaron con un imán de 1,5 T (Avanto; Siemens, Erlangen, Alemania) utilizando una bobina dedicada de rodilla (Siemens, Erlangen, Alemania). Una secuencias de recuperación de inversión de 5 turbo spin eco (tiempos de inversión de 1650 ms, 650 ms, 350 ms, 150 ms y 28 ms; tiempo de repetición (TR) = 1800 ms; tiempo de eco (TE) = 19 ms; ancho de banda = 326 Hz; campo de visión (FOV) = 160 mm; matriz = 384 × 384; tamaño de vóxel = 0,4 × 0,4 × 3 mm; número de excitaciones (NEX) = 1) para el posterior mapeo T1Gd para calcular los índices dGEMRIC femorales, del cartílago articular tibial y rotuliano. La gravedad de la OA temprana en la cohorte del estudio fue determinada mediante IRM llevada a cabo por un radiólogo musculoesquelético experimentado, el cual empleó el sistema de puntuación introducido por la Sociedad Internacional de Investigación del Cartílago (ICRS) basado en un sistema modificado de Outerbridge dividido en cinco etapas según el tamaño y la profundidad de la lesión del cartílago así como la apariencia del hueso subcondral circundante: Grado 0: cartílago normal; Grado 1: alteraciones de la intensidad de la señal con una superficie intacta del cartílago articular en comparación con el cartílago normal circundante; Grado 2: defecto de espesor parcial del cartílago con fisuras en la superficie que no alcanzan el hueso subcondral o exceden 1,5 cm de diámetro; Grado 3: fisuración del cartílago hasta el nivel del hueso subcondral en un área con un diámetro mayor a 1.5 cm; Grado 4: hueso subcondral expuesto. El estado del cartílago se analizó en siete facetas articulares distintas: cóndilo femoral medial y lateral, tróclea femoral, cóndilo tibial medial y lateral y facetas patelares.

Además, el grosor del cartílago articular se midió en el mismo lugar antes de la aplicación intraarticular de las células madre y posteriormente, en cada examen de resonancia magnética.

2.8. Protocolo dGEMRIC

Cada sujeto recibió gadolinio, ácido dietilentriaminopentaacético (Dotarem; Guerbet, Roissy CgG Cedex, Villepinte, Francia), 0,2 mmol/kg, administrado mediante infusión IV, a través de un catéter colocado en la vena ante cubital mientras el paciente se encontraba en posición decúbito supino, para evitar una tromboflebitis en el sitio de inyección. La relaxividad del agente de contraste del IRM administrado fue la misma para todos los pacientes, debido a que el agente de contraste de IRM siempre se aplicó en las mismas condiciones: temperatura, intensidad del campo magnético y concentración del agente de contraste. El tiempo de inyección del agente de contraste fue inferior a 5 minutos. Posteriormente el sujeto se ejercitó subiéndolo y bajando las escaleras durante aproximadamente 10 minutos, comenzando 5 minutos después de la inyección, para promover el suministro del agente de contraste a la articulación. La imagen de contraste posterior del cartílago se realizó 120 minutos después de la administración del contraste. Las imágenes dGEMRIC fueron analizadas por un radiólogo musculoesquelético experimentado utilizando el software syngoMapIt (Siemens, Erlangen, Alemania). El índice dGEMRIC se analizó en siete facetas articulares distintas: el cóndilo femoral medial y lateral, la tróclea femoral, el cóndilo tibial medial y lateral y las facetas patelares, antes de la aplicación intraarticular de las células madre y en todos los exámenes de resonancia magnética posteriores a los tres, nueve, y 12 meses después de la aplicación intraarticular de las células madre. Las regiones de interés (ROI) en las que se

calculó el índice T1 promedio, se dibujaron manualmente para cubrir siempre la misma parte central (que soporta el peso) de cada faceta articular. Las facetas articulares que no se encontraban cubiertas por cartílago y en donde no fue posible medir el índice dGEMRIC se marcaron como "0", y las facetas articulares en las que, por alguna razón, el índice dGEMRIC no se midió fueron etiquetadas como "-". Las diferencias más altas entre varias mediciones dentro de nuestro estudio en el mismo ROI estuvieron por debajo del 6% (rango de 0.1 a 5.4%), y se correspondieron con los datos reportados en otros estudios.

2.9. Análisis estadístico

Empleamos un métodos descriptivos e inferenciales para analizar los datos. Se usaron medias y desviaciones estándar para estimar la tendencia central y la variabilidad. Los datos numéricos se analizaron usando la prueba t, y se utilizó la prueba de chi-cuadrado para variables categóricas. Utilizamos la prueba t de pairwise para las mediciones apareadas y las mediciones posteriores del mismo paciente o rodilla. Dentro de la variación individual se definió sobre las bases de las tasas de error dGEMRIC, que se basaron en los artículos publicados previamente, e indicaron que la diferencia media por región de interés entre las dos mediciones de T1Gd varía entre 3.7% y 6.8%. En base a esto, definimos el cambio arbitrario del 15% en mediciones posteriores como clínicamente relevantes, y consideramos esto como el valor liminal (en base a dos desviaciones estándar de la tasa de error estimada). Todos los análisis se realizaron en R (<http://www.rproject.org/>), con significación establecida en $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Características del paciente

Diecisiete pacientes que coincidían con los criterios de inclusión fueron asignados consecutivamente para el estudio y recibieron una inyección intraarticular de tejido graso microfragmentado con Ad-MS. En general, todos los pacientes incluidos en el estudio mostraron una característica similar de edad (media 69 ± 12), altura, peso, índice de masa corporal (IMC) y grado de osteoartritis Kellgren Lawrence radiográfico (3 o 4). La distribución del sexo fue: 12 pacientes masculinos y cinco mujeres. El patrón, la distribución y la gravedad del deterioro del tejido del cartílago según lo evaluado mediante MRI y dGEMRIC variaron sustancialmente en la línea de base. La radiografía FLWB en la posición de pie reveló patrones de sobrecarga mecánica de los compartimientos de las rodillas desgastadas con la ausencia completa de la capa de cartílago. De las 32 rodillas, observamos que 25 de ellas tenían deformidades de varo, con una mala alineación promedio de 8.2° ; seis rodillas de valgo con un promedio de 2° de deformidad y una de las rodillas con una alineación perfecta.

3.2. Perfil de seguridad y condrotoxicidad de la inyección intraarticular del tejido adiposo microfragmentado autólogo

No se observaron eventos adversos (EA) en la cohorte de 17 pacientes y 32 rodillas tratadas con osteoartritis en asociación con lipoaspiración o inyección intraarticular (IA). No se produjeron infecciones AEs relacionadas con la inyección de IA durante el seguimiento. La exclusión de la condrotoxicidad es uno de los prerrequisitos para cualquier terapia intraarticular exitosa. En cambio, observamos un aumento en el contenido de proteoglicanos en un porcentaje del ROI evaluado de la rodilla, mediante el

índice dGEMRIC, lo cual es un indicativo de la vitalidad de los condrocitos y su producción de proteínas de la matriz extracelular. Este efecto se describe en detalle en la sección de resultados dGEMRIC.

3.3. Resultados clínicos básicos: escala visual analógica para la evaluación del dolor y proteína C reactiva.

En este estudio, medimos los resultados de la terapia mediante la inyección intraarticular de tejido adiposo autólogo y microfragmentado en 17 pacientes (32 rodillas) al inicio (M0), 3 meses (M3), 6 meses (M6) y 12 meses (M12). La comparación inicial de los parámetros clínicos básicos indicó un patrón decreciente de CRP hacia el seguimiento a medio tiempo y un retorno posterior a los valores originales hacia el final del seguimiento (Tabla 1). A pesar de los resultados numéricamente sugerentes, el cambio no fue significativo. Por el contrario, las estimaciones del dolor en toda la duración del estudio mostraron una disminución significativa tanto para las estimaciones de reposo como para el movimiento (Tabla 1).

3.4. Análisis de perfil N-Glicanos

El efecto de la terapia se evaluó en el nivel de glicosilación de IgG al aislar IgG de las muestras de plasma del paciente al inicio y después de 6 y 12 meses de seguimiento. Además, se aisló IgG a partir de muestras de líquido sinovial al inicio y después de 12 meses de seguimiento. Después de liberar y marcar los N-glicanos, se determinó la composición del glicógeno de IgG aislado del plasma mediante análisis de UPLC, como se describe en la sección de pacientes y métodos. El análisis de los perfiles de N-glucano sugirió una falta de importancia en los análisis pareados de la medición de seguimiento inicial versus la primera o la segunda (Tabla 2).

Tabla 1. Comparación clínica básica a lo largo del seguimiento.

	Inicial (M0)	Primer seguimiento (M3)	Segundo seguimiento (M6)	Tercer seguimiento (M12)	p^* (M0– M3)	p^* (M0– M6)	p^* (M0– M12)
Proteína C reactiva (CRP); media $\pm$ SD (min–máx.)	6.54 $\pm$ 7.83 (1– 20.3)	-	3.86 $\pm$ 3.71 (0.6–12)	5.17 $\pm$ 5.83 (0.6–23.1)	-	0.158	0.330
Escala analógica visual del dolor, en reposo; media $\pm$ SD (min–máx.)	3.94 $\pm$ 2.56 (0–8)	1.24 $\pm$ 1.48 (0– 4)	1.17 $\pm$ 1.62 (0–5)	0.56 $\pm$ 1.2 (0– 4)	0.001	<0.001	<0.001
Escala analógica visual del dolor, movimiento; media $\pm$ SD (min–máx.)	7.33 $\pm$ 1.72 (4– 10)	3.82 $\pm$ 2.07 (1– 7)	3.67 $\pm$ 2.03 (0–7)	3.17 $\pm$ 1.98 (0–7)	<0.001	<0.001	<0.001

*Prueba *t* de Student para dos muestras relacionadas; SD: desviación estándar; M: meses.

3.5. Demora en la resonancia magnética de cartílago con gadolinio (dGEMRIC)

En el último paso del análisis, se estimó el cambio porcentual de los resultados de dGEMRIC y se estimó el número de mejoras clínicamente relevantes frente a los deterioros en cada paciente (Figuras suplementarias S1–S15), donde un cambio del 15% se consideró un cambio relevante (basado sobre las tasas de error adquiridas de la literatura disponible y de nuestros propios estudios). De las 331 mediciones totales en ROI, descubrimos 175 valores de índice dGEMRIC donde los resultados de GAG habían mejorado (52.9%) y solo 37 (11.2%) los deterioros de GAG relevante con un valor de p de 2.60×10^{-21} . Los resultados sugieren que este método mejora el contenido de GAG en una escala significativa, con más de la mitad de las mediciones sugiriendo una mejora relevante, e indica que el método resulta en solo un 11% del contenido de GAG, en oposición a la disminución esperada de GAG en el curso natural de la enfermedad. Los cambios en el valor de corte para la relevancia no parecían cambiar la dirección ni la magnitud de los resultados; los cálculos con valores de corte que van de 0.07 a 0.30 indican una mejoría más significativa, con un peor valor de p de 4.71×10^{-9} (Tabla 4).

El índice dGEMRIC se midió en siete facetas articulares diferentes para cada rodilla en el estudio, y los resultados se presentan en una tabla separada para cada paciente (Figuras suplementarias S1–S18). El índice dGEMRIC se presentó en valores absolutos, y el cambio del valor del índice durante el período de estudio se muestra en porcentajes en relación con el

valor del índice de dGEMRIC de referencia. Sin embargo, observamos que hubo un aumento en el valor del índice para la mayoría de las facetas articulares después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado. En 120 (53.57%) de 224 facetas articulares, observamos un aumento en el índice de dGEMRIC 12 meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado. Como era de esperar, en la clasificación de las lesiones de cartílago de la Sociedad Internacional para la Reparación del Cartílago (ICRS) grado IV, no hubo cambios en el valor dGEMRIC durante el período de estudio. En 33 (14.73%) facetas articulares, se encontró una disminución índice dGEMRIC disminuido después de 12 meses en comparación con la línea de base. Solo en cuatro (1,7%) de ellos hubo una mayor disminución del 15% (mayor en el paciente dG14, Figura S12). Esas fueron las facetas conjuntas con la condromalacia ICRS grado III y IV. Por ejemplo, en el paciente dG15 (Figura 1D) con deformidad de varo 4.4° de la rodilla izquierda, hubo un aumento del índice dGEMRIC del cóndilo femoral lateral izquierdo del 45% y un aumento del índice de 83% del cóndilo tibial lateral izquierdo en comparación con el base. También observamos un aumento de 13% y 3% para la faceta rotuliana lateral y medial, respectivamente. Sin embargo, el índice de la tróclea femoral disminuyó en un 4%. En el paciente dG07 (Figura 2D) con deformidad varo de rodilla (rodilla izquierda 9.8° y rodilla derecha 3.5°), observamos un aumento del 26% del índice en el cóndilo medial de la tibia derecha al final del estudio. De manera similar, la elevación se observó en otras áreas.

Tabla 2. Perfiles de glicano en plasma de las mediciones iniciales, primer y segundo seguimiento.

Glicano	Medidas iniciales (M0)	Primer seguimiento (M6)	Segundo seguimiento (M12)	p^* (M0–M6)	p^* (M0–M12)
GP1	0.125 ± 0.063 (0.046–0.277)	0.138 ± 0.055 (0.083–0.258)	0.127 ± 0.052 (0.044–0.254)	0.417	0.996
GP2	1.458 ± 0.97 (0.255–4.007)	1.131 ± 0.632 (0.249–2.167)	1.424 ± 0.955 (0.283–3.999)	0.769	0.523
GP3	0.113 ± 0.02 (0.09–0.151)	0.121 ± 0.021 (0.099–0.161)	0.12 ± 0.023 (0.085–0.162)	0.065	0.142
GP4	27.9 ± 8.246 (12.755–46.784)	29.926 ± 7.142 (22.454–43.436)	28.143 ± 7.034 (14.145–43.06)	0.861	0.957
GP5	0.168 ± 0.028 (0.136–0.218)	0.167 ± 0.027 (0.139–0.21)	0.172 ± 0.032 (0.132–0.237)	0.793	0.366
GP6	7.135 ± 1.299 (4.313–9.109)	7.157 ± 1.683 (4.274–10.042)	7.545 ± 1.663 (4.196–10.429)	0.142	0.050
GP7	0.728 ± 0.679 (0.137–2.773)	0.506 ± 0.207 (0.14–0.759)	0.709 ± 0.634 (0.203–2.717)	0.667	0.575
GP8	18.487 ± 2.753 (13.198–24.336)	17.622 ± 2.368 (13.641–20.534)	18.142 ± 2.626 (13.685–23.972)	0.315	0.074
GP9	9.416 ± 1.873 (7.167–14.423)	9.299 ± 2.26 (7.039–14.446)	9.377 ± 1.8 (6.998–14.379)	0.611	0.562
GP10	4.974 ± 0.983 (4.049–7.72)	5.031 ± 1.159 (3.922–7.585)	5.145 ± 0.991 (4.072–7.557)	0.742	0.374
GP11	0.657 ± 0.082 (0.476–0.756)	0.672 ± 0.093 (0.526–0.785)	0.695 ± 0.13 (0.47–0.977)	0.753	0.169
GP12	0.973 ± 0.773 (0.186–3.166)	0.712 ± 0.298 (0.189–1.078)	0.953 ± 0.732 (0.265–3.121)	0.600	0.152
GP13	0.276 ± 0.049 (0.2–0.356)	0.251 ± 0.041 (0.189–0.31)	0.275 ± 0.046 (0.207–0.37)	0.034	0.841
GP14	10.123 ± 3.266 (3.746–15.708)	9.512 ± 3.073 (4.507–13.431)	9.94 ± 2.932 (4.349–14.829)	0.550	0.691
GP15	1.506 ± 0.27 (0.999–1.974)	1.475 ± 0.253 (1.092–1.867)	1.517 ± 0.221 (1.158–1.875)	0.197	0.786
GP16	2.939 ± 0.592 (2.209–4.089)	2.929 ± 0.613 (2.248–4.007)	2.878 ± 0.547 (2.263–3.912)	0.057	0.143
GP17	0.956 ± 0.186 (0.611–1.159)	0.904 ± 0.181 (0.664–1.186)	0.939 ± 0.194 (0.658–1.232)	0.198	0.992
GP18	6.668 ± 1.498 (3.225–8.798)	6.682 ± 1.786 (3.503–9.145)	6.566 ± 1.449 (3.412–9.026)	0.822	0.961
GP19	1.675 ± 0.534 (0.487–2.582)	1.802 ± 0.366 (1.271–2.326)	1.682 ± 0.482 (0.481–2.416)	0.941	0.755
GP20	0.283 ± 0.066 (0.138–0.393)	0.257 ± 0.055 (0.169–0.33)	0.274 ± 0.06 (0.14–0.343)	0.100	0.460
GP21	0.48 ± 0.106 (0.312–0.577)	0.477 ± 0.114 (0.286–0.647)	0.458 ± 0.091 (0.27–0.578)	0.886	0.151
GP22	0.133 ± 0.049 (0.041–0.191)	0.129 ± 0.037 (0.079–0.19)	0.131 ± 0.04 (0.046–0.178)	0.164	0.765
GP23	1.278 ± 0.414 (0.48–2.001)	1.375 ± 0.432 (0.753–2.048)	1.243 ± 0.437 (0.489–1.996)	0.331	0.903
GP24	1.55 ± 0.542 (0.427–2.266)	1.723 ± 0.39 (1.076–2.238)	1.544 ± 0.521 (0.407–2.515)	0.453	0.748

*Prueba *t* de Student para dos muestras relacionadas; GP: pico de Glicano; M: meses.

Tabla 4. Análisis de sensibilidad para los cambios de los valores de corte para la relevancia clínica y los valores de p correspondientes.

Glicano	Medición inicial (M0)	Medición final (M12)	p^*
GP1	0.16 ± 0.06 (0.09–0.29)	0.16 ± 0.05 (0.09–0.26)	0.698
GP2	1.22 ± 0.61 (0.23–2.06)	1.15 ± 0.51 (0.26–1.91)	0.146
GP3	0.13 ± 0.02 (0.11–0.17)	0.14 ± 0.02 (0.1–0.17)	0.620
GP4	31.05 ± 6.46 (22.45–46.8)	30.45 ± 6.74 (22.52–45.05)	0.945
GP5	0.17 ± 0.03 (0.13–0.26)	0.18 ± 0.03 (0.14–0.27)	0.171
GP6	7.43 ± 1.47 (4.26–10.88)	7.68 ± 1.62 (4.29–10.53)	0.049
GP7	0.52 ± 0.21 (0.12–0.77)	0.51 ± 0.19 (0.15–0.79)	0.514
GP8	17.39 ± 1.98 (13.2–20.59)	17.66 ± 2.2 (13.4–20.54)	0.980
GP9	9.41 ± 1.69 (7.19–14.29)	9.06 ± 1.97 (7.11–14.55)	0.105
GP10	4.89 ± 0.99 (4.08–7.73)	5.3 ± 1.23 (4.02–7.6)	0.158
GP11	0.71 ± 0.11 (0.53–0.99)	0.73 ± 0.12 (0.53–0.98)	0.045
GP12	0.72 ± 0.33 (0.16–1.2)	0.72 ± 0.32 (0.18–1.18)	0.562
GP13	0.28 ± 0.06 (0.18–0.43)	0.28 ± 0.06 (0.18–0.42)	0.541
GP14	8.96 ± 2.58 (3.78–13.55)	9.28 ± 2.76 (4.01–13.61)	0.928
GP15	1.45 ± 0.26 (1.03–2.08)	1.5 ± 0.28 (1.11–1.94)	0.576
GP16	3.01 ± 0.57 (2.27–4.19)	2.85 ± 0.58 (2.25–4.04)	0.152
GP17	0.95 ± 0.17 (0.67–1.21)	0.94 ± 0.18 (0.68–1.31)	0.975
GP18	5.96 ± 1.38 (3.15–8.54)	6 ± 1.52 (3.01–8.26)	0.895
GP19	1.82 ± 0.34 (1.25–2.38)	1.75 ± 0.28 (1.25–2.16)	0.232
GP20	0.31 ± 0.06 (0.22–0.41)	0.33 ± 0.1 (0.2–0.48)	0.664
GP21	0.45 ± 0.07 (0.32–0.55)	0.47 ± 0.18 (0.24–0.94)	0.675
GP22	0.15 ± 0.04 (0.1–0.2)	0.15 ± 0.04 (0.1–0.22)	0.943
GP23	1.17 ± 0.35 (0.57–1.77)	1.07 ± 0.37 (0.53–1.78)	0.015
GP24	1.71 ± 0.4 (1.04–2.33)	1.63 ± 0.36 (1.01–2.35)	0.501

* prueba t para muestras relacionadas.

Tabla 3. Perfiles de glicanos sinoviales de la medición inicial (M0) frente a la medición final (M12).

Corte	n (Progresos)	n (Deterioro)	Chi cuadrado para aleatoriedad
0.07	175	37	2.60×10^{-21}
0.15	123	13	4.01×10^{-21}
0.20	77	8	7.20×10^{-14}
0.25	57	6	1.32×10^{-10}
0.30	45	4	4.71×10^{-9}

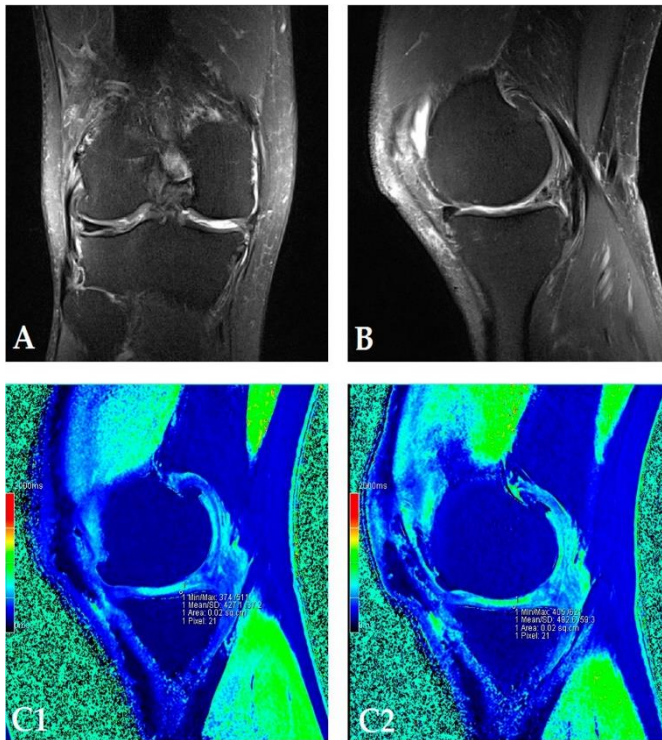
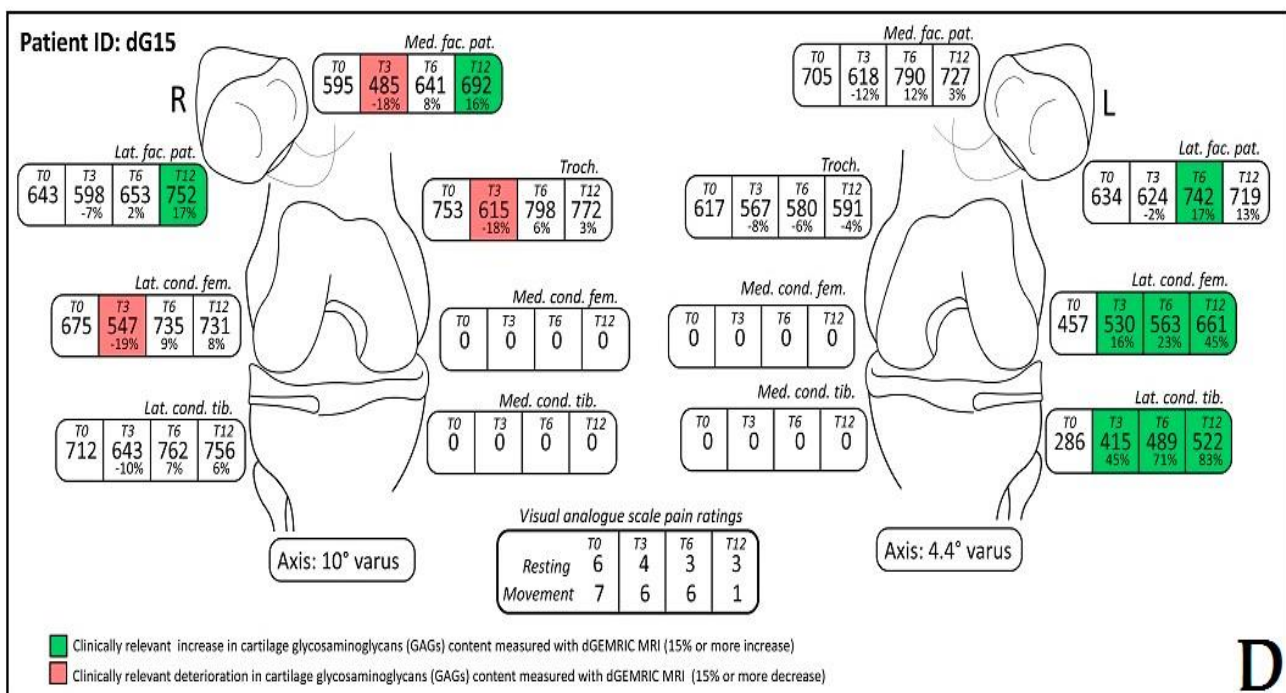


Figura 1. (Paciente dG15) La imagen coronal (A) y sagital (B) de la resonancia magnética (MR) muestran pérdida completa del cartilago articular de los cóndilos femoral y tibial medial (condromalacia de grado IV de la International Cartilage Repair Society (ICRS)) fisuras superficiales del cartilago articular en los cóndilos femorales y tibiales laterales (condromalacia ICRS grado IV), osteofitos de borde y derrame articular. Imágenes de RM con los valores del índice dGEMRIC en cuatro puntos de tiempo (T0: línea de base, T3: tres meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado; T6: seis meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado; T12: 12 meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado) (C1-C4). El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articuladas a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de la escala analógica visual (VAS) en T0, T3, T6, T12 (D).



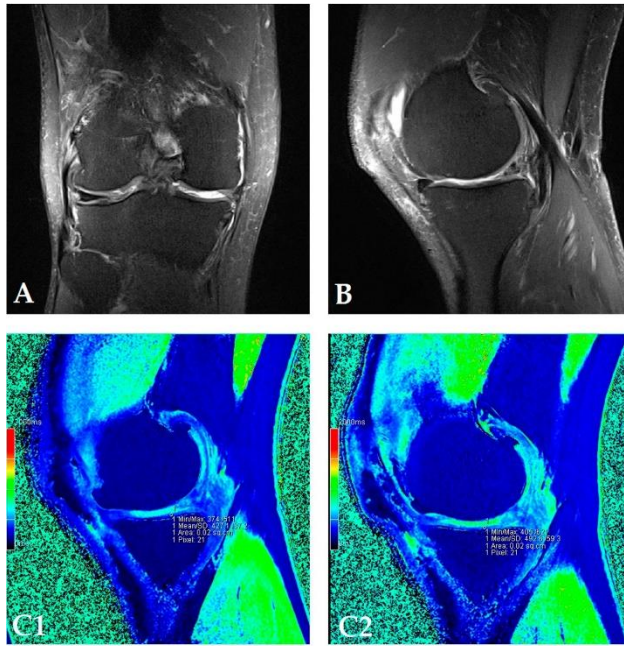
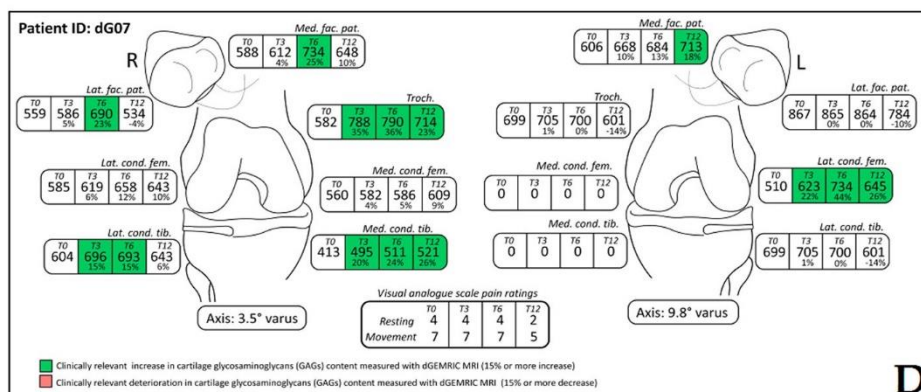
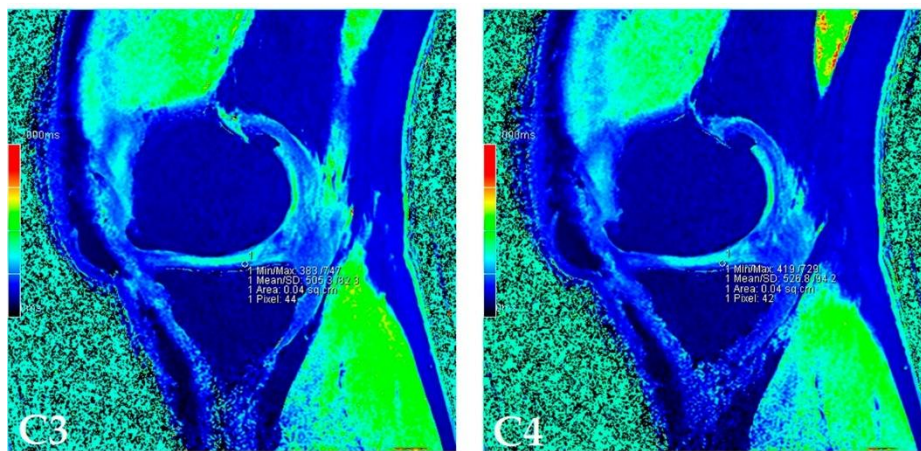


Figura 2. (Paciente dG07) La resonancia magnética coronal (A) y sagital (B) muestran la pérdida completa del cartílago articular de los cóndilos femoral y tibial medial (condromalacia ICRS grado IV), adelgazamiento y fisuras superficiales del cartílago articular en la parte lateral femoral y cóndilos tibiales (condromalacia ICRS grado IV), osteofitos de borde y derrame articular. La RM con los valores del índice dGEMRIC en cuatro puntos (T0: basal; T3: tres meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado; T6: seis meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado; T12: 12 meses después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado) (C1-C4). El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinados con clasificaciones de la escala VAS en T0, T3, T6, T12 (D).



4. Discusión

Alcanzar la adherencia en el tratamiento de OA es un gran desafío. Nuestro estudio ha demostrado que la inyección intraarticular de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado en pacientes con osteoartritis de rodilla no se asoció con ningún evento adverso, incluida la condroxicidad. Estos resultados se encuentran en concordancia con otros estudios lo cual demuestra que el concepto de la administración intraarticular de ASCs es seguro para tratar la osteoartritis. La novedad de este enfoque es el uso de tejido en lugar de células evitando: (1) restricciones regulatorias y (2) uso de un tejido con nicho intacto. Además, los pacientes demostraron unas puntuaciones de la VAS significativamente mejoradas en el punto temporal de 12 meses sin cambios significativos en los parámetros de CRP.

La cohorte de pacientes incluidos en el estudio padecía una OA de rodilla de grados III y IV, lo que significa que pudimos documentar diversos estados de la capa de cartílago dentro de la articulación en las imágenes por resonancia magnética. Pudimos seguir los efectos del tratamiento en las capas de cartílago de grosor completo, así como en capas de cartílago completamente destruidas con exposición del hueso subcondral esclerótico. Este enfoque ha demostrado ser muy descriptivo para evaluar los efectos del tratamiento. La literatura explora dos posibles mecanismos de las MSC para el tratamiento de la OA. El primer camino podría ser la diferenciación directa de las MSCs en los condrocitos. Aunque existen estudios que han demostrado que las MSC contribuyen a la reparación de los defectos del cartílago a través de la orientación, el injerto y la producción de la matriz

extracelular del cartílago, no pudimos mostrar las áreas de destrucción completa del cartílago con la exposición del hueso, dentro las articulaciones de la rodilla cubiertos con cartílago recién formado al final del período de 12 meses. Las áreas de destrucción completa del cartílago se asemejaban a un patrón de sobrecarga mecánica en las rodillas mal alineadas, como se documentó con la radiografía FLWB estando de pie. La segunda trayectoria terapéutica de las MSCs para la OA es paracrina con secreción de factores bioactivos. Nuestro estudio demostró que se puede esperar una respuesta eficiente de los condrocitos y de la síntesis de los proteoglicanos con el tratamiento mediante el autotrasplante de tejido graso microfragmentado. Obviamente, este tejido sirve como un buen vehículo terapéutico, dejando ASCs y pericitos viables y efectivos en su nicho. La viabilidad de las MSCs y de los pericitos a lo largo del procedimiento quirúrgico es crucial para cualquier efecto biológico esperado. Una vez que las MSC activas y los pericitos obtienen y detectan el entorno de la articulación de rodilla seleccionada, comienzan a secretar factores bioactivos que son inmunomoduladores, cicatrizantes, antiapoptóticos, angiogénicos y tróficos (regenerativos), lo que significa que estas células crean "farmacias terapéuticas" in situ. Los efectos principales del tratamiento dentro de nuestro estudio, medido mediante Imágenes de Resonancia Magnética dGEMRIC. Al inicio del estudio se pudo observar algo de espesor del tejido del cartílago en las áreas de la articulación de la rodilla.

El cartílago articular en la rodilla OA está sujeto a reacciones catabólicas debido a la presencia de varias citoquinas, que pueden surgir de la sinovia o de los condrocitos. Estas citoquinas inflamatorias son responsables de la producción de proteinasas y de la regulación decreciente de la producción de agregano. El

envejecimiento causa cambios significativos en la matriz extracelular del cartílago, particularmente en el nivel y la estructura de los proteoglicanos. La reducción de el GAG del cartílago se ha relacionado con los agreganos y disminuye la hidratación del cartílago articular, así como la capacidad del cartílago para responder a las cargas mecánicas. En el estudio realizamos seguimiento durante un período de 12 meses a los pacientes, observando un aumento significativo del contenido de proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago. Esto inevitablemente refleja la actividad de los condrocitos y desafía el curso natural de los procesos relacionados con el envejecimiento y la OA con pérdida de proteoglicanos en la matriz extracelular (MEC).

La degeneración del cartílago debido a OA no es visible mediante radiografía hasta décadas después del inicio de la enfermedad, cuando los cambios en el cartílago a menudo son irreparables. Además, solo existe una asociación débil entre los signos radiográficos de artrosis de rodilla y sus síntomas. El sistema Kellgren Lawrence es la herramienta de puntuación aplicada más comúnmente utilizada para evaluar la gravedad de la osteoartritis de rodilla en una radiografía simple. Los fármacos solubles en cualquier tratamiento intraarticular salen rápidamente de las articulaciones. Existe evidencia de que las nuevas técnicas cuantitativas de MRI se pueden utilizar para evaluar la pérdida de macromoléculas, tales como las moléculas GAG en el cartílago durante las primeras etapas de la OA. También hay indicios de que existe una mejor correlación entre los resultados obtenidos con estas nuevas técnicas cuantitativas de MRI y los síntomas que entre los hallazgos y síntomas radiográficos o de rutina de la IRM. En los últimos años, la técnica dGEMRIC ha mostrado potencial en la evaluación del estado macromolecular del

cartílago articular normal, degenerado y regenerado. En lo que a los autores concierne, este es el primer estudio en evaluar los efectos de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado en el cartílago articular de las facetas de la articulación de la rodilla utilizando la técnica dGEMRIC con una evaluación longitudinal durante 12 meses del contenido de moléculas GAG en el cartílago. Las mayores diferencias entre varias mediciones con el mismo ROI en nuestro estudio fueron inferiores al 7% (rango de 0,1 a 5,4%), lo cual se corresponde a los datos publicados. No hubo influencia en la relaxividad del agente de contraste MRI administrado en el valor del índice dGEMRIC, porque siempre se aplicó el mismo agente de contraste MRI, y la administración siempre se realizó en las mismas condiciones: temperatura del agente de contraste, concentración del campo magnético y el contraste. Cada paciente tenía un valor individual de medición dGEMRIC en una región de interés específica de la rodilla al inicio del estudio con la distribución respectiva de la carga y el patrón de desgaste del cartílago. La tendencia general en OA durante el período de 12 meses fue del deterioro de la ECM del cartílago y la disminución en el contenido de proteoglicanos; sorprendentemente, en nuestro estudio, solo el 3,93% de las mediciones mostraron una disminución del contenido de moléculas GAG con el análisis mediante MRI dGEMRIC, dado que un cambio del 15% fue considerado como relevante. Este resultado sugiere efectos positivos de las ASCs.

Es necesario un cambio de paradigma en el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con osteoartritis. Los criterios de referencia en términos de evaluación radiológica con radiografías estándar de la rodilla en dos planos y la clasificación de Kellgren Lawrence es claramente insuficiente para la evaluación de los

efectos del tratamiento a pacientes con ASCs.

El glicoma IgG es uno de los biomarcadores más sensible. El mismo varía en numerosas enfermedades. En general, la composición del glucógeno IgG equilibra la inflamación crónica y se cree que este contribuye al deterioro del tejido a través de un proceso inflamatorio. Con el objetivo de evaluar los efectos del tratamiento a nivel sistémico, hemos analizado la composición del glicoma IgG al inicio (antes de la inyección de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado) y en dos períodos de seguimiento. El IgG se aisló del líquido sinovial y el plasma sanguíneo de los pacientes, y los glicanos n-ligados se liberaron y se analizaron por UPLC como se describe en la sección de *Pacientes y Métodos*. La comparación de la composición de glicógeno IgG antes y después de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado no mostró ningún cambio estadísticamente significativo que se produjera como resultado del tratamiento. Esto indica la ausencia de cualquier efecto sistémico sobre el glicoma IgG en el líquido sinovial o en el plasma sanguíneo (tablas 2 y 3). La principal importancia de esta observación es la indicación de que el aumento observado en los niveles de proteoglicanos es solo local, y una consecuencia muy específica de la inyección de tejido adiposo autólogo y micro-fragmentado sin ningún cambio sistémico observable en la glicosilación. La composición del IgG glicoma es un biomarcador muy sensible el cual cambia en múltiples afecciones, incluidas las inflamaciones crónicas y agudas, este resultado indica la ausencia de procesos inflamatorios a nivel local (líquido sinovial) y sistémico (plasma sanguíneo).

En nuestra opinión, los efectos positivos de la inyección de tejido adiposo autólogo y microfragmentado empleada intraarticularmente, inducen a la

proliferación de condrocitos del huésped y producen una matriz extracelular muy probablemente a través de mecanismos tróficos e inmunomoduladores, que influyen en los cambios estructurales y bioquímicos en el cartílago. Además, nuestros datos sugieren que el aumento de la producción de GAG influye directamente en la calidad del cartílago hialino, en lugar del grosor del cartílago. La limitación de este estudio es la falta de comparación con el curso regular del deterioro de la ECM del cartílago medido por MRI dGEMRIC, durante un período de 12 meses.

Los futuros estudios clínicos deberían centrarse en mejorar los criterios para la selección de pacientes. No es difícil imaginar que un estudio observacional siguiendo el curso natural de la OA de rodilla durante los 12 meses de evaluación mediante MRI dGEMRIC, sería beneficioso para el fortalecimiento de los resultados de nuestro estudio.

Materiales complementarios:

Los siguientes están disponibles en línea en www.mdpi.com. Figura S1: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares durante el período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con las calificaciones de la escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG01; Figura S2: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de la escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG02; Figura S3: el esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG03; Figura S4: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinados con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente

dG04; Figura S5: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG05; Figura S6: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG06; Figura S7: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG08; Figura S8: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG09; Figura S9: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinados con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG10; Figura S10: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG11; Figura S11: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG12; Figura S12: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG14; Figura S13: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinado con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6,

T12 para el paciente dG16; Figura S14: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares a lo largo del período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinados con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG17; Figura S15: El esquema del índice dGEMRIC con diferentes facetas articulares durante el período de estudio en T0, T3, T6 y T12 combinados con clasificaciones de escala VAS en T0, T3, T6, T12 para el paciente dG18.

Agradecimientos:

No se recibió financiación para apoyar la investigación o el análisis de datos en este artículo

Contribuciones del autor:

D.H. y D.P. concibieron y diseñaron los experimentos; D.H., I.B., E.R., T.V., I.T.-A. y Z.J. realizaron los experimentos; O.P. y G.L. analizaron los datos; M.P. tales como reactivos/ materiales/ herramientas de análisis aportados; D.H., D.P., I.B. y G.L. escribieron el documento.

Conflictos de interés:

los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias.

- Kurz, B.; Lemke, A.K.; Fay, J.; Pufe, T.; Grodzinsky, A.J.; Schunke, M. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann. Anat.* **2005**, *187*, 473–485.
- Boshuizen, H.C.; Poos, M.J.; van den Akker, M.; van Boven, K.; Korevaar, J.C.; de Waal, M.W.; Biermans, M.C.; Hoeymans, N. Estimating incidence and prevalence rates of chronic diseases using disease modeling. *Popul. Health Metr.* **2017**, *15*, 13, doi:10.1186/s12963-12017-10130-12968.
- Hunter, D.J.; Schofield, D.; Callander, E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10*, 437–441.
- Orchard, J.; Moen, M.H. Has reimbursement for knee osteoarthritis treatments now reached ‘postfact’ status? *Br. J. Sports Med.* **2017**, *29*, 2017-097605, doi:10.1136/bjsports-2017-097605.
- Primorac, D.; Stover, M.L.; Clark, S.H.; Rowe, D.W. Molecular basis of nanomelia, a heritable chondrodystrophy of chicken. *Matrix Biol.* **1994**, *14*, 297–305.
- Primorac, D.; Johnson, C.V.; Lawrence, J.B.; McKinstry, M.B.; Stover, M.L.; Schanfield, M.S.; Andjelinovic, S.; Tadic, T.; Rowe, D.W. Premature termination codon in the aggrecan gene of nanomelia and its influence on mrna transport and stability. *Croat. Med. J.* **1999**, *40*, 528–532.
- Horton, W.E., Jr.; Bennion, P.; Yang, L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2006**, *6*, 379–381.
- Rahmati, M.; Nalesso, G.; Mobasheri, A.; Mozafari, M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *40*, 20–30.
- Brinker, M.R.; O’Connor, D.P. Articular tissues. In *Review of Orthopaedics*, 6th ed.; Miller, M.; Thompson, S.; Hart, J., Eds.; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2012; pp. 39–48.
- Buckwalter, J.A.; Woo, S.L.; Goldberg, V.M.; Hadley, E.C.; Booth, F.; Oegema, T.R.; Eyre, D.R. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1993**, *75*, 1533–1548.
- Mobasheri, A.; Matta, C.; Zakany, R.; Musumeci, G. Chondroscenescence: Definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* **2015**, *80*, 237–244.
- Greene, M.A.; Loeser, R.F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1966–1971.
- Nguyen, L.T.; Sharma, A.R.; Chakraborty, C.; Saibaba, B.; Ahn, M.E.; Lee, S.S. Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E601, doi:10.3390/ijms18030601.
- Mobasheri, A.; Henrotin, Y. Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers* **2015**, *20*, 513–518.
- Lauc, G.; Pezer, M.; Rudan, I.; Campbell, H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1860*, 1574–1582.
- Drake, P.M.; Cho, W.; Li, B.; Prakobphol, A.; Johansen, E.; Anderson, N.L.; Regnier, F.E.; Gibson, B.W.; Fisher, S.J. Sweetening the pot: Adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 223–236.
- Evans, C.H.; Kraus, V.B.; Setton, L.A. Progress in intra-articular therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10*, 11–22.
- Derendorf, H.; Mollmann, H.; Gruner, A.; Haack, D.; Gyselby, G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glucocorticoid suspensions after intra-articular administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1986**, *39*, 313–317.
- Fraser, J.R.; Kimpton, W.G.; Pierscionek, B.K.; Cahill, R.N. The kinetics of hyaluronan in normal and acutely inflamed synovial joints: Observations with experimental arthritis in sheep. *Sem. Arthritis Rheum.* **1993**, *22*, 9–17.
- Caplan, A.L. Adult mesenchymal stem cells: When, where, and how. *Stem Cells Int.* **2015**, *2015*, 628767, doi:10.1155/2015/628767.
- Cuti, T.; Antunovic, M.; Marijanovic, I.; Ivkovic, A.; Vukasovic, A.; Matic, I.; Pecina, M.; Hudetz, D. Capacity of muscle derived stem cells and pericytes to promote tendon graft integration and ligamentization following anterior cruciate ligament reconstruction. *Int. Orthop.* **2017**, *41*, 1189–1198.
- Jo, C.H.; Lee, Y.G.; Shin, W.H.; Kim, H.; Chai, J.W.; Jeong, E.C.; Kim, J.E.; Shim, H.; Shin, J.S.; Shin, I.S.; et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: A proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells* **2014**, *32*, 1254–1266.
- Pers, Y.M.; Rackwitz, L.; Ferreira, R.; Pullig, O.; Delfour, C.; Barry, F.; Sensebe, L.; Casteilla, L.; Fleury, S.; Bourin, P.; et al. Adipose mesenchymal stromal cell-based therapy for severe osteoarthritis of the knee: A phase I dose-escalation trial. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 847–856.
- Tremolada, C.; Colombo, V.; Ventura, C. Adipose tissue and mesenchymal stem cells: State of the art and Lipogems® technology development. *Curr. Stem Cell Rep.* **2016**, *2*, 304–312.
- Schreiner, M.M.; Mlynarik, V.; Zbyn, S.; Szomolanyi, P.; Apprich, S.; Windhager, R.; Trattnig, S. New technology in imaging cartilage of the ankle. *Cartilage* **2017**, *8*, 31–41.
- Eagle, S.; Potter, H.G.; Koff, M.F. Morphologic and quantitative magnetic resonance imaging of knee articular cartilage for the assessment of post-traumatic osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* **2017**, *35*, 412–423.
- Tiderius, C.J.; Olsson, L.E.; Nyquist, F.; Dahlberg, L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after an anterior cruciate ligament injury: Delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage and synovial fluid analysis. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52*, 120–127.

28. Young, A.A.; Stanwell, P.; Williams, A.; Rohrsheim, J.A.; Parker, D.A.; Giuffre, B.; Ellis, A.M. Glycosaminoglycan content of knee cartilage following posterior cruciate ligament rupture demonstrated by delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of cartilage (dGEMRIC). A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2005**, *87*, 2763–2767.
 29. Williams, A.; Gillis, A.; McKenzie, C.; Po, B.; Sharma, L.; Micheli, L.; McKeon, B.; Burstein, D. Glycosaminoglycan distribution in cartilage as determined by delayed gadolinium-enhanced mri of cartilage (dGEMRIC): Potential clinical applications. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2004**, *182*, 167–172.
 30. Burstein, D.; Velyvis, J.; Scott, K.T.; Stock, K.W.; Kim, Y.J.; Jaramillo, D.; Boutin, R.D.; Gray, M.L. Protocol issues for delayed Gd(DTPA)²⁻-enhanced MRI (dGEMRIC) for clinical evaluation of articular cartilage. *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 36–41.
 31. Tiderius, C.J.; Olsson, L.E.; Leander, P.; Ekberg, O.; Dahlberg, L. Delayed gadolinium-enhanced mri of cartilage (dGEMRIC) in early knee osteoarthritis. *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 488–492.
 32. Bianchi, F.; Maioli, M.; Leonardi, E.; Olivi, E.; Pasquinelli, G.; Valente, S.; Mendez, A.J.; Ricordi, C.; Raffaini, M.; Tremolada, C.; et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transp.* **2013**, *22*, 2063–2077.
 33. Trbojevic-Akmacic, I.; Ugrina, I.; Lauc, G. Comparative analysis and validation of different steps in glycomics studies. *Methods Enzymol.* **2017**, *586*, 37–55.
 34. Pucic, M.; Knezevic, A.; Vidic, J.; Adamczyk, B.; Novokmet, M.; Polasek, O.; Gornik, O.; Supraha-Goreta, S.; Wormald, M.R.; Redzic, I.; et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteom.* **2011**, *10*, M111.010090, doi:010010.011074/mcp.M010111.010090.
 35. Kellgren, J.H.; Lawrence, J.S. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* **1957**, *16*, 494–502.
 36. Crema, M.D.; Roemer, F.W.; Marra, M.D.; Burstein, D.; Gold, G.E.; Eckstein, F.; Baum, T.; Mosher, T.J.; Carrino, J.A.; Guermazi, A. Articular cartilage in the knee: Current mr imaging techniques and applications in clinical practice and research. *Radiographics* **2011**, *31*, 37–61.
 37. Sonin, A.H.; Pensy, R.A.; Mulligan, M.E.; Hatem, S. Grading articular cartilage of the knee using fast spinecho proton density-weighted mr imaging without fat suppression. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2002**, *179*, 1159–1166.
 38. Tiderius, C.J.; Tjornstrand, J.; Akeson, P.; Sodersten, K.; Dahlberg, L.; Leander, P. Delayed gadoliniumenhanced mri of cartilage (dGEMRIC): Intra- and interobserver variability in standardized drawing of regions of interest. *Acta Radiol.* **2004**, *45*, 628–634.
 39. Bittersohl, B.; Hosalkar, H.S.; Haamberg, T.; Kim, Y.J.; Werlen, S.; Siebenrock, K.A.; Mamisch, T.C. Reproducibility of dgemric in assessment of hip joint cartilage: A prospective study. *J. Magn. Reson. Imag.* **2009**, *30*, 224–228.
 40. Barry, F.; Murphy, M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2013**, *9*, 584–594.
 41. Caplan, A.I.; Dennis, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98*, 1076–1084.
 42. Mokbel, A.N.; El Tookhy, O.S.; Shamaa, A.A.; Rashed, L.A.; Sabry, D.; El Sayed, A.M. Homing and reparative effect of intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in osteoarthritic animal model. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2011**, *12*, 259, doi:10.1186/1471-2474-1112-1259.
 43. Sato, K.; Moy, O.J.; Peimer, C.A.; Nakamura, T.; Howard, C.; Ko, S.H.; Lee, T.C.; Nishiwaki, Y. An experimental study on costal osteochondral graft. *Osteoarthr. Cartil.* **2012**, *20*, 172–183.
 44. Caplan, A.I.; Correa, D. The msc: An injury drugstore. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 11–15.
 45. Goldring, S.R.; Goldring, M.B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2004**, S27–S36, doi:10.1097/01.blo.0000144854.66565.8f.
 46. Roughley, P.J.; Mort, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* **2014**, *1*, 8, doi:10.1186/s40634-014-0008-7.
 47. Gray, M.L.; Burstein, D.; Kim, Y.J.; Maroudas, A. 2007 elizabeth winston lanier award winner. Magnetic resonance imaging of cartilage glycosaminoglycan: Basic principles, imaging technique, and clinical applications. *J. Orthop. Res.* **2008**, *26*, 281–291.
 48. Rohrer, M.; Bauer, H.; Mintorovitch, J.; Requardt, M.; Weinmann, H.J. Comparison of magnetic properties of mri contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investig. Radiol.* **2005**, *40*, 715–724.
 49. Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflammaging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244–254.
 50. Novokmet, M.; Lukic, E.; Vuckovic, F.; Ethuric, Z.; Keser, T.; Rajsl, K.; Remondini, D.; Castellani, G.; Gasparovic, H.; Gornik, O.; et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4347, doi:10.1038/srep04347.
- Gornik, O.; Lauc, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis. Markers* **2008**, *25*, 267–278.