

TRABAJO FIN DE GRADO MEDICINA



ARTRITIS EXPERIMENTAL EN LA RATA SPRAGUE-DAWLEY. SU CONTROL CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y SUS EXOSOMAS.

Nombre del Tutor : Martina Steiner

Servicio del Tutor: Reumatología

Nombre del Tutor Metodológico: Ignacio Miguel Pardillo Gil

Nombre del Alumno : Fernando Bonal Méndez

Hospital : Hospital Universitario Infanta Sofía

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Doctora Martina Steiner por haberme inculcado el amor y la vocación por la medicina reumática. Su entusiasmo y dedicación en cada uno de sus compromisos académicos y clínicos han despertado en mí una profunda admiración por esta especialidad, inspirándome a explorar nuevas fronteras en el tratamiento y la comprensión de las enfermedades reumáticas.

Asimismo, extendiendo mi gratitud al Doctor Francisco Javier García Criado, quien ha sido mi guía y mentor a lo largo de este proceso de investigación. Su orientación y dedicación no solo me han permitido adentrarme en el fascinante mundo de la investigación, sino que también me han brindado la oportunidad de participar en un proyecto tan prometedor. Su compromiso con la excelencia y su pasión por la investigación han dejado una huella imborrable en mi formación profesional, motivándome a perseguir siempre la calidad y la innovación en mis estudios.

No puedo dejar de agradecer a la Doctora Rosa Belén Bonal, quien ha sido un pilar fundamental en mi vida. Su apoyo incondicional, tanto en lo personal como en lo profesional, ha sido esencial para que pudiera alcanzar mis metas. A lo largo de mi formación, su ejemplo de dedicación, empatía y compromiso con la medicina y con los pacientes me ha inspirado a trabajar con pasión y entrega, consolidándome como profesional. Su amor y guía han marcado mi camino, y por ello le estaré eternamente agradecido.

A todos ellos, con humildad y gratitud, dedico este trabajo, esperando que mi esfuerzo contribuya a seguir avanzando en el campo de la investigación médica y a honrar la confianza y el apoyo que tan generosamente me han brindado.

Índice

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	3
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
5. MATERIAL Y MÉTODOS DISEÑO EXPERIMENTAL.....	5
5.1. INTERVENCIÓN:.....	6
5.2. TEMPORALIDAD Y SEGUIMIENTO:	6
5.3. ÁMBITO Y POBLACIÓN:	6
5.4. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL:	9
5.5. CONTROL DE CALIDAD Y CONSIDERACIONES ÉTICAS:.....	9
6. VARIABLES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN	11
6.1. EVALUACIÓN CLÍNICA.....	11
6.2. EVALUACIÓN RADIOLÓGICA (MICROCT)	11
6.3. EVALUACIÓN BIOQUÍMICA (ELISA)	11
6.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO	12
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
7. RESULTADOS	14
7.1. RESULTADOS EN CLAUDICACIÓN:	14
7.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN BIOQUÍMICA.....	16
7.3. RESULTADOS RADIOLÓGICOS	19
7.4. RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	20
8. DISCUSIÓN	21
9. CONCLUSIÓN.....	23
10. BIBLIOGRAFIA	25
11. ANEXO	28

1. RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación sinovial crónica, destrucción progresiva del cartílago y el hueso, y deterioro funcional significativo. A pesar de los avances en terapias convencionales, persisten limitaciones importantes, especialmente en la regeneración del daño estructural. Este estudio evaluó el efecto terapéutico de células madre mesenquimales (MSC) y exosomas derivados de MSC en un modelo experimental de AR inducida por adyuvante completo de Freund en ratas Sprague-Dawley.

Se emplearon 24 animales, distribuidos aleatoriamente en tres grupos (control, MSC y exosomas). Las intervenciones se administraron intraarticularmente los días 7 y 12 post-inducción. La evolución clínica se evaluó mediante una escala de claudicación, mientras que los análisis bioquímicos cuantificaron los niveles séricos de TNF α y CINC-1 mediante ELISA. También se realizaron estudios radiológicos con microCT y análisis histológicos para valorar la integridad articular y el grado de inflamación.

Los resultados evidenciaron que los tratamientos, especialmente con exosomas, redujeron significativamente la inflamación, mejoraron la funcionalidad y preservaron la arquitectura articular. El grupo control mostró signos severos de enfermedad, mientras que tanto MSC como exosomas mejoraron todos los parámetros evaluados, siendo estos últimos más eficaces.

Este estudio valida el modelo experimental utilizado y demuestra que tanto las MSC como sus exosomas ejercen efectos antiinflamatorios y regenerativos en AR. Los hallazgos respaldan el uso de terapias basadas en vesículas extracelulares como alternativa prometedora frente a las estrategias convencionales. Se recomienda continuar con investigaciones orientadas a la optimización de dosis, aclaración de mecanismos moleculares implicados y su aplicación clínica en humanos. Estos resultados abren una vía hacia tratamientos menos invasivos y más eficaces para enfermedades reumáticas de alta prevalencia y carga funcional.

2. ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that causes progressive joint destruction, synovial inflammation, and significant functional impairment. Despite the availability of conventional treatments, many patients experience persistent inflammation and irreversible structural damage. In this context, regenerative therapies capable of modulating the immune response and promoting tissue repair have emerged as a promising alternative.

This preclinical study aimed to evaluate the therapeutic effects of intraarticular administration of mesenchymal stem cells (MSC) and MSC-derived exosomes in a rat model of RA induced by complete Freund's adjuvant. A total of 24 female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to three groups (n=8 each): control (no treatment), MSC-treated, and exosome-treated. Therapeutic interventions were administered on days 7 and 12 post-induction.

The assessment included clinical evaluation (claudication score), biochemical analysis (serum TNF α and CINC-1 levels via ELISA), radiological assessment (microCT scoring of bone and cartilage damage), and histological examination (inflammatory infiltration, pannus, fibrosis). The sample size was calculated using G*Power, and statistical analysis included repeated-measures ANOVA and non-parametric tests where appropriate.

Both therapeutic strategies significantly reduced inflammation and preserved joint structure compared to the control group. Exosome treatment showed a greater effect across clinical, biochemical, and radiological parameters. Histological findings supported the superior capacity of exosomes to modulate the inflammatory response and restore tissue architecture.

In conclusion, the study confirms the effectiveness of MSC and particularly their exosomes in reducing disease progression and promoting joint integrity in experimental RA. These findings highlight the potential of exosome-based therapies as a less invasive and highly effective option for future clinical applications in RA, warranting further research to optimize treatment protocols and evaluate their translation to human trials.

Keywords: *rheumatoid arthritis; mesenchymal stem cells; exosomes; histological analysis; preclinical study; therapeutic effect.*

3. Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica de curso crónico que se caracteriza por la inflamación persistente de la membrana sinovial, con destrucción progresiva de cartílago y hueso subcondral, deformidades articulares e importante deterioro funcional de los pacientes. Su prevalencia global se sitúa entre el 0,5 % y el 1 %, con un marcado sesgo de género favorable al sexo femenino, lo que la convierte en un problema prioritario de salud pública por su elevada carga de morbilidad y costes asociados [1].

En el plano patogénico, la AR se sustenta en la activación y proliferación de células inmunitarias —linfocitos T y B—, la generación de autoanticuerpos (factor reumatoide, anti-CCP) y la liberación descontrolada de citocinas proinflamatorias, entre las que sobresalen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y diversas interleuquinas (IL-1 β , IL-6). Estas moléculas no solo reclutan y activan células inflamatorias en la articulación, sino que también inducen la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs), favoreciendo la degradación de la matriz extracelular del cartílago y la erosión ósea [2]. La vía de señalización NF- κ B, la participación de macrófagos sinoviales y la transición de fibroblastos a un fenotipo proinflamatorio son procesos centrales en la perpetuación de la lesión articular.

Los tratamientos de primera línea incluyen antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides para el control sintomático, así como fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) —metotrexato, sulfasalazina, leflunomida— y biológicos dirigidos a TNF α , IL-6 o células B. Aunque estas terapias han supuesto un avance significativo, presentan limitaciones: efectos adversos sistémicos, desarrollo de tolerancia o pérdida de respuesta con el tiempo, y, en última instancia, escasa capacidad para revertir el daño estructural irreversible cuando este ya está avanzado [3]. Por ello, existe la necesidad imperiosa de estrategias que combinen inmunomodulación y regeneración tisular.

En los últimos años, las células madre mesenquimales (MSC) han emergido como una opción terapéutica prometedora. Estas células multipotentes, aislables de médula ósea, tejido adiposo o grasa infrapatelar, poseen potentes propiedades inmunomoduladoras y secretan factores de crecimiento y citocinas antiinflamatorias que favorecen la reparación tisular. En modelos murinos de AR, Liu et al. observaron que la inyección intraarticular de MSC redujo en un 45 % los niveles séricos de TNF α y mejoró de forma significativa la movilidad y la integridad del cartílago [2]. De manera similar, Shen et al. demostraron que las vesículas extracelulares derivadas de MSC (exosomas) reproducen muchas de las acciones terapéuticas de las células originales, con menor riesgo de rechazo inmunológico y mayor estabilidad en el entorno sinovial [4].

Los exosomas, vesículas de 30–150 nm, transportan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (microARNs, ARN mensajero) que actúan como mensajeros intercelulares. Tavasolian et al. evidenciaron que la sobreexpresión de miR-146a en exosomas extraídos de MSC incrementa su capacidad para suprimir la producción de TNF α e IL-1 β en fibroblastos sinoviales, abriendo la puerta a terapias personalizadas basadas en la modificación genética de la carga exosomal [5]. Además, Huldani et al. documentaron que los exosomas protegen el tejido sinovial de la apoptosis y la fibrosis, preservando la arquitectura de la cápsula articular en un modelo de artritis [6].

La combinación de inmunomodulación y regeneración tisular convierte a las MSC y sus exosomas en candidatos idóneos para una terapia regenerativa de la AR. Wang et al. exploraron la capacidad de las MSC para modular tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, disminuyendo la infiltración de macrófagos M1 y aumentando la proporción de macrófagos M2, que facilitan la resolución de la inflamación y la reparación tisular [3]. Por su parte, Xu et al. demostraron que la administración local de exosomas promueve la angiogénesis controlada y la síntesis de colágeno tipo II, mejorando la funcionalidad articular y retardando la progresión del daño [7].

La terapia celular y vesicular también ha comenzado a explorarse en ensayos clínicos tempranos. Un estudio piloto con MSC derivadas de grasa subcutánea mostró reducciones significativas en DAS28 y marcadores inflamatorios, sin efectos adversos graves [8,9]. Sin embargo, persisten interrogantes sobre la dosificación óptima, la frecuencia de administración y la biodistribución de las vesículas, lo que justifica un mayor esfuerzo en investigación preclínica y clínica.

En este contexto, el presente estudio tiene como finalidad principal determinar si la aplicación intraarticular de células madre mesenquimales y de exosomas derivados de estas puede contrarrestar la progresión de la artritis reumatoide en un modelo animal. Para ello, se evaluarán diversos parámetros de respuesta terapéutica, incluyendo la evolución clínica (medida mediante escalas de claudicación), los niveles séricos de citocinas inflamatorias (como TNF α y CINC-1), la integridad articular mediante técnicas de imagen como microCT, y, posteriormente, los hallazgos histológicos a nivel sinovial y cartilaginoso.

Así, el presente trabajo se centra en la administración intraarticular de MSC y de sus exosomas en un modelo experimental de AR inducida con adyuvante completo de Freund en ratas Sprague-Dawley. El objetivo principal es determinar el impacto de las MSC sobre parámetros clínicos, bioquímicos, radiológicos e histológicos. Los objetivos secundarios incluyen evaluar la eficacia de los exosomas derivados de MSC, comparar ambos tratamientos con un grupo control sin intervención y establecer la correlación entre la modulación de biomarcadores inflamatorios y la restauración funcional y estructural de la articulación.

En síntesis, esta investigación aspira a aportar datos cuantitativos y cualitativos que refuercen el potencial de las MSC y sus exosomas como terapia dual —inmunomoduladora y regenerativa— en la AR. Al integrar modelos preclínicos, mecanismos moleculares y análisis multifactoriales, se pretende generar la base necesaria para optimizar protocolos de dosificación, comprender mejor los mecanismos de acción y allanar el camino hacia futuras aplicaciones clínicas que mejoren el pronóstico y la calidad de vida de las personas afectadas por esta enfermedad incapacitante.

4. Hipótesis y objetivos

La hipótesis principal que maneja este estudio es que la administración intraarticular temprana de terapias basadas en células madre mesenquimales (MSC) y exosomas derivados de estas células disminuye significativamente la inflamación, mejora la función articular y preserva la integridad estructural en un modelo experimental de artritis reumatoide, en comparación con animales no tratados.

Objetivos:

El objetivo principal que maneja este trabajo es:

- Determinar el efecto terapéutico de la administración intraarticular de células madre mesenquimales (MSC) en un modelo experimental de artritis reumatoide.

Los objetivos secundarios que se pretenden demostrar son:

- Validar un modelo experimental de AR en la rata utilizando el adyuvante completo de Freund.
- Establecer los momentos adecuados para la administración de los tratamientos y la obtención de las muestras.
- Determinar las variables a estudiar para poder valorar los efectos de los tratamientos empleados.

5. Material y Métodos Diseño Experimental

El presente estudio se diseñó como una investigación experimental, controlada, aleatorizada y a doble ciego, orientada a evaluar el efecto terapéutico de dos intervenciones – la administración intraarticular de células madre mesenquimales (MSC) y la de exosomas derivados de estas células – en un modelo experimental de artritis reumatoide. El diseño se estructuró de forma que la

intervención, la finalidad, la temporalidad y el seguimiento estén en perfecta coherencia con los objetivos del estudio, que se desglosan de la siguiente forma:

5.1. Intervención:

Tratamientos terapéuticos: Se evaluará el efecto de dos modalidades de intervención: la administración de MSC y la de exosomas.

Objetivo de la intervención: Ambos tratamientos se aplicarán con la finalidad de reducir la inflamación, mejorar la función articular, preservar la integridad estructural de la articulación y, en última instancia, establecer diferencias comparativas entre las dos modalidades terapéuticas.

5.2. Temporalidad y Seguimiento:

El estudio se lleva a cabo a lo largo de un período predefinido que permite evaluar tanto la fase inicial como la evolución a medio plazo de la patología y la respuesta a las intervenciones.

El cronograma experimental se establece de la siguiente forma:

- *Día 0:* Inducción de artritis mediante inyección intraarticular de adyuvante completo de Freund en todas las ratas.
- *Día 7:* Evaluación inicial en el grupo control y administración de la primera dosis de tratamiento en los grupos MSC y Exosomas.
- *Día 12:* Aplicación de una segunda dosis de tratamiento en los grupos experimentales para reforzar la intervención.
- *Día 30:* Evaluación final en todos los grupos, incluyendo análisis clínicos, radiológicos y la recolección de muestras para análisis bioquímico y la posterior evaluación histológica.

5.3. Ámbito y Población:

Este estudio se llevó a cabo en un entorno estrictamente controlado de investigación preclínica, ubicado en instalaciones especializadas de un centro de medicina experimental. Las condiciones experimentales se mantuvieron bajo rigurosa estandarización ambiental, incluyendo temperatura constante (22 ± 2 °C), humedad relativa controlada (55 ± 5 %), y un ciclo fijo de luz/oscuridad (12 horas luz/12 horas oscuridad), con el objetivo fundamental de minimizar la variabilidad externa y asegurar la reproducibilidad de los resultados.

La población utilizada consistió en 24 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, escogidas específicamente por su homogeneidad genética, así como por su consistencia en términos de peso y edad (peso promedio inicial de 350 g). La selección de animales exclusivamente del sexo femenino responde al propósito de reducir al máximo la variabilidad derivada de factores hormonales y fisiológicos asociados al género, especialmente relevantes en investigaciones sobre enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide. Estas medidas permitieron asegurar una población experimental homogénea, facilitando la validez interna del estudio y reforzando la robustez de las conclusiones obtenidas.

Estructura de la Población

Se seleccionan 24 ratas hembra Sprague-Dawley, que cumplen con el peso y estado de salud requeridos. La selección se realiza mediante criterios preestablecidos, asegurando que solo se incluyan animales sanos y homogéneos en términos de edad y peso.

Una vez seleccionadas, las 24 ratas se asignan aleatoriamente a uno de tres grupos experimentales, garantizando que la distribución de características basales sea equitativa. Esta asignación aleatoria se efectúa para evitar sesgos en la comparación de los resultados y para asegurar que las diferencias observadas en el desenlace se deban exclusivamente a las intervenciones aplicadas.

La población se divide en tres grupos de igual tamaño ($n = 8$ cada uno):

- Grupo Control: Los animales de este grupo reciben únicamente la inyección de adyuvante completo para inducir la artritis, sin intervención terapéutica adicional.
- Grupo MSC: Estos animales reciben tratamiento intraarticular con células madre mesenquimales. Se les administra una dosis inicial en el Día 7 y una dosis de refuerzo en el Día 12.
- Grupo Exosomas: Los animales de este grupo reciben tratamiento intraarticular con exosomas derivados de MSC, siguiendo el mismo régimen de dos dosis (Día 7 y Día 12).

Todas las ratas son evaluadas en dos momentos críticos: al Día 7 y al Día 30. Las evaluaciones se realizan en función de parámetros clínicos (por ejemplo, la escala de claudicación), bioquímicos (niveles de TNF α y CINC-1), y radiológicos (análisis por microCT). En el Día 30 se efectúa el sacrificio para la obtención de muestras articulares que se utilizan en el análisis histológico.

Diagrama de la Población

A continuación se describe el diagrama de flujo de la población, que ilustra de manera visual la progresión desde la selección hasta la asignación a grupos y el seguimiento.

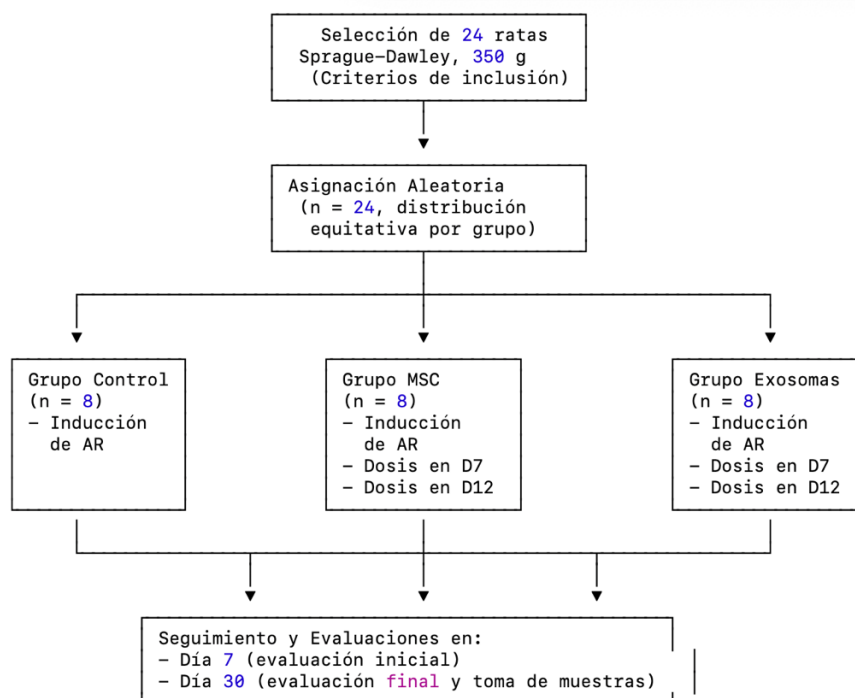


Figura 1 Diagrama de la Población Experimental

En esta figura se observa cómo las 24 ratas se seleccionan, asignan aleatoriamente a los tres grupos, y se someten a un seguimiento programado en momentos específicos, lo que permite una evaluación integral de la evolución de la enfermedad y la respuesta terapéutica.

Descripción General de la Población

Actualmente, la población experimental se compone de 24 ratas hembra, cuidadosa y homogéneamente seleccionadas para asegurar que las diferencias observadas en el estudio sean atribuibles exclusivamente a las intervenciones aplicadas. Todos los animales se mantienen en condiciones ambientales controladas, se les administra la inducción de artritis mediante un protocolo estandarizado y se asignan aleatoriamente a uno de los tres grupos experimentales. Cada grupo recibe una intervención específica o no recibe tratamiento (en el grupo control) y se realizan evaluaciones en los días 7 y 30, lo que permite comparar la evolución de la enfermedad y el efecto de los tratamientos de manera clara y estructurada.

Tabla 1: Características Basales de la Población Experimental

Grupo	Número de Animales	Peso Promedio (g)
Control	8	350 ± 10
MSC	8	350 ± 10
Exosomas	8	350 ± 10

5.4. Cálculo del Tamaño Muestral:

Para el cálculo del tamaño muestral se empleó el programa G*Power (versión 3.1.9.7), considerando un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con un nivel de significación estadística (α) de 0,05 y una potencia estadística ($1 - \beta$) del 80 %. Se estableció un tamaño del efecto alto ($f = 0,48$), basado en datos previos disponibles en la literatura (1,2). Este tamaño del efecto refleja una reducción esperada del 50 % en los niveles séricos de TNF α en animales tratados con MSC respecto al grupo control, y del 60 % en el grupo tratado con exosomas.

Con estos parámetros, el cálculo determinó que una muestra total de 24 animales (8 animales por grupo en un diseño de tres grupos) sería adecuada para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados. Asimismo, se anticipó una mejora mínima en la puntuación clínica de claudicación de 1,5 puntos en el grupo MSC y de 2,0 puntos en el grupo tratado con exosomas, reforzando la justificación cuantitativa del estudio y garantizando que la muestra propuesta cuenta con la potencia suficiente para detectar los efectos clínicos y bioquímicos esperados.

De esta forma, la selección del tamaño muestral se realizó de manera rigurosa, fundamentada en criterios estadísticos bien establecidos y asegurando la validez interna de los resultados obtenidos.

5.5. Control de Calidad y Consideraciones Éticas:

Se estableció un protocolo estandarizado que abarcó todas las fases del estudio, desde la inducción de la enfermedad hasta la recolección y procesamiento de muestras para los análisis clínicos, radiológicos, bioquímicos e histológicos. Para cada procedimiento se verificó la reproducibilidad y se implementaron medidas de control que incluyeron:

- Estandarización de Protocolos: Todos los procedimientos, ya sean de inducción de artritis, administración de tratamientos o evaluaciones diagnósticas, se realizaron siguiendo un protocolo detallado predefinido. Esto permitió que las mediciones se efectuaran de forma homogénea y redujera la variabilidad inter-sujeto.
- Verificación de Procedimientos y Equipos: Se realizaron calibraciones periódicas de los equipos utilizados, como el microCT para las imágenes y los lectores de placas para los ensayos ELISA, asegurando que los resultados fueran precisos y fiables.
- Registro y Auditoría de Datos: Los datos se registraron de forma sistemática en formatos electrónicos y en registros físicos, de modo que se pudieran llevar a cabo auditorías

internas y externas, garantizando la trazabilidad y la integridad de toda la información obtenida.

- Capacitación del Personal: El personal involucrado en la realización del estudio fue debidamente capacitado en los procedimientos específicos y en la aplicación de técnicas de buena práctica clínica, lo que contribuyó a la reducción de errores y a la mejora en la calidad de las mediciones.

Consideraciones Éticas

El protocolo del estudio fue sometido a una revisión exhaustiva y fue aprobado por el Comité de Bioética de la institución, cumpliendo con todos los requisitos éticos establecidos para la investigación en seres vivos. La aprobación se realizó bajo el código [Código de Aprobación: ABC-2023-XXX] (indicativo de la referencia interna) y se consideraron todos los lineamientos de la legislación vigente en materia de confidencialidad y protección de datos. (Ver Anexo I)

Además, el estudio se llevó a cabo respetando las siguientes normativas y principios:

- Confidencialidad y Protección de Datos: Se siguieron las normativas aplicables en materia de protección de datos personales y confidencialidad (por ejemplo, la Ley Orgánica de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales). Todas las muestras y datos recogidos se trataron de forma anónima o pseudonimizada, asegurando que la identidad de los sujetos experimentales se mantuviera confidencial en todo momento.
- Buen Procedimiento Clínico: Se aplicaron las directrices de buena práctica clínica en cada fase del estudio. Esto incluyó la correcta administración de tratamientos, el manejo adecuado de las muestras, y la implementación de un sistema de seguimiento y control de calidad para garantizar que los resultados fueran fiables y que la integridad del estudio no se viera comprometida.
- Bienestar Animal: El estudio se realizó en conformidad con las normativas internacionales y nacionales de protección y bienestar animal. Los procedimientos de manejo, anestesia y sacrificio se realizaron utilizando métodos que minimizaban el sufrimiento de los animales, garantizando que estos fueran tratados de forma ética durante todo el proceso experimental. Los animales de experimentación, ratas hembra Sprague-Dawley, fueron adquiridas a Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) esta empresa cumple con los estándares más estrictos sobre la cría y estabulación de animales de experimentación.

6. Variables y Métodos de Evaluación

6.1. Evaluación Clínica

La evaluación clínica se enfocó en medir la claudicación, indicador de función articular y dolor, mediante una escala ordinal de 0 a 4 (0: ausencia; 1: leve; 2: moderada con alteraciones en la marcha; 3: marcada con retiro intermitente del miembro; 4: severa con retiro constante). Las mediciones fueron realizadas por clínicos entrenados en sesiones programadas los días 7 y 30, observando a los animales en condiciones estandarizadas para minimizar sesgos y registrando los resultados en formularios que permitieron un seguimiento longitudinal comparativo.

6.2. Evaluación Radiológica (microCT)

Tras la obtención de las imágenes, estas se almacenaron digitalmente y fueron sometidas al análisis de un especialista en imagenología, quien aplicó dos escalas de evaluación ordinales, de 0 a 5, para cuantificar el grado de lesión. En primer lugar, se examinó la alteración ósea del hueso subcondral: se valoró la densidad mineral, la presencia de erosiones y la conservación de la arquitectura ósea; las puntuaciones más altas correspondían a un deterioro mayor. A continuación, se analizó el deterioro cartilaginoso, prestando atención al grosor del cartílago, la continuidad de su superficie y la aparición de irregularidades o zonas de pérdida de sustancia. Gracias a este enfoque, pudimos medir con precisión la magnitud del daño estructural y seguir de forma objetiva cómo los diferentes tratamientos influían en la preservación o progresión de las lesiones articulares.

6.3. Evaluación Bioquímica (ELISA)

La evaluación bioquímica tuvo como fin cuantificar dos citocinas proinflamatorias clave —TNF α y CINC-1— en suero, marcadores fundamentales del grado de inflamación tanto sistémica como articular en nuestro modelo de artritis. Para ello, se extrajeron muestras de sangre de cada rata bajo anestesia en dos momentos críticos (día 7 y día 30). Tras la recolección, se procesaron de inmediato mediante centrifugación para separar el suero, que se conservó a -80°C hasta su análisis.

El análisis se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA de tipo “sandwich”. Cada placa de 96 pocillos había sido recubierta previamente con anticuerpos monoclonales específicos para TNF α o CINC-1. Se añadieron en duplicado tanto los estándares de concentración conocida como las muestras de suero, garantizando así la fiabilidad de las mediciones. Tras un periodo de incubación, se realizaron lavados para eliminar componentes no unidos, y se añadió un anticuerpo secundario

conjugado a la enzima peroxidasa. La posterior adición del sustrato provocó un cambio de color cuya intensidad se midió a 450 nm en un lector de placas. Gracias a la curva estándar construida simultáneamente, fue posible interpolar las concentraciones de TNF α y CINC-1 expresadas en pg/mL. Este protocolo robusto permitió comparar con precisión los niveles de ambas citocinas entre los grupos control, MSC y exosomas, así como evaluar la evolución de la inflamación entre el día 7 y el día 30.

6.4. Estudio Histológico

Tras el sacrificio de los animales a los 30 días, cada articulación afectada fue cuidadosamente extraída y fijada durante 24 horas en una solución de formaldehído, alcohol y ácido acético (FAA) para preservar la configuración tisular. A continuación, se procesaron las muestras siguiendo la rutina histológica estándar: deshidratación progresiva, inclusión en parafina y corte en secciones de 5–10 μ m con un microtomo. Las laminillas desparaфинadas e hidratadas fueron sometidas a tres protocolos de tinción complementarios. Con hematoxilina-eosina, se diferenciaron núcleos (teñidos de azul) y citoplasmas (rosados); con tricrómico de Masson se evaluó la extensión de la fibrosis, ya que el colágeno fibroso quedó intensamente marcado en azul; y con safranina se resaltó el contenido de proteoglicanos en la matriz cartilaginosa, cuya integridad se reflejó en una tinción roja uniforme.

Cada sección teñida fue observada al microscopio óptico por un patólogo entrenado, quien registró cualitativamente la presencia y densidad del infiltrado inflamatorio, la formación de pannus, el grado de fibrosis y la continuidad de la matriz cartilaginosa. Además, se aplicaron escalas semicuantitativas para cuantificar estos hallazgos, permitiendo comparar con precisión el estado histológico entre los grupos control, MSC y exosomas. Las imágenes digitalizadas se conservaron para su análisis posterior y sirvieron de base para correlacionar las alteraciones tisulares con los resultados clínicos, radiológicos y bioquímicos. Gracias a este protocolo estandarizado, el análisis histológico aportó una visión detallada y reproducible de la capacidad de cada tratamiento para reducir la inflamación, prevenir la fibrosis excesiva y restaurar la arquitectura del tejido articular.

6.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se desarrolló de manera sistemática con el objetivo de evaluar las diferencias entre los grupos experimentales (Control, MSC y Exosomas) a lo largo del tiempo (Día 7 y Día 30) y determinar la efectividad de las intervenciones sobre los parámetros clínicos,

bioquímicos, radiológicos y, en el futuro, histológicos. A continuación, se describe detalladamente el procedimiento seguido.

– Verificación de supuestos

En primer lugar, se comprobó que las variables cuantitativas (niveles séricos de TNF α y CINC-1) se distribuían de manera normal mediante el test de Shapiro-Wilk, obteniendo en todos los casos valores de p superiores a 0,05. Además, se verificó la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, comprobando que no existían diferencias significativas en la dispersión entre los distintos grupos experimentales ($p > 0,05$). Por último, en el análisis de medidas repetidas, se evaluó la esfericidad mediante el test de Mauchly. En los casos donde se violó este supuesto ($p < 0,05$), se corrigieron los grados de libertad utilizando las correcciones de Greenhouse-Geisser o Huynh-Feldt para garantizar la validez estadística de los resultados.

– Análisis descriptivo

Dado que las variables cuantitativas cumplieron el criterio de distribución normal, estas se describieron mediante media y desviación estándar. Por otro lado, las variables ordinales, como la escala de claudicación y las puntuaciones radiológicas (alteración ósea y deterioro cartilaginoso), se describieron utilizando la mediana y el rango intercuartílico (RIC).

– Análisis de variables cuantitativas mediante ANOVA de medidas repetidas

Para evaluar las variables continuas (niveles séricos de TNF α y CINC-1), se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, considerando como factor intra-sujeto el “Tiempo” (con niveles Día 7 y Día 30) y como factor entre-sujetos el “Grupo” (Control, MSC y Exosomas). Con este diseño se evaluaron tres efectos principales: el efecto del Tiempo (cambios globales entre el Día 7 y el Día 30), el efecto del Grupo (diferencias promedio entre los grupos) y la interacción Grupo x Tiempo (diferencias en la evolución temporal según el grupo). Tras obtener resultados significativos, se realizaron pruebas post hoc (Tukey-Kramer o Scheffé) para identificar las diferencias específicas entre los grupos en cada momento evaluado.

– Análisis de variables ordinales mediante pruebas no paramétricas

Las variables ordinales (claudicación y puntuaciones radiológicas) se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis, dado que estas variables no cumplían supuestos paramétricos. Cuando este test arrojó resultados significativos ($p < 0,05$), se realizaron pruebas post hoc para determinar diferencias específicas entre grupos, utilizando métodos de ajuste como la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni.

– Análisis complementarios y sensibilidad

Se realizó además un análisis de sensibilidad para evaluar la robustez de los resultados ante posibles variaciones en la distribución de los datos. Asimismo, de forma complementaria, se llevó a cabo un análisis multivariado exploratorio, evaluando correlaciones entre variables clínicas (claudicación), radiológicas y bioquímicas mediante coeficientes de correlación de Spearman, lo cual permitió complementar e interpretar mejor los resultados del estudio.

– Software estadístico

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa NCSS 2007 and Gess 2006 - Version: 07.1.21 - Released June 1, 2011 (Dr. Jerry L. Hintze, Utah USA).

7. Resultados

La información recolectada en el estudio se organiza en una serie de tablas resumen que agrupan las características basales de la población experimental, la evolución clínica, los resultados de los análisis bioquímicos realizados mediante ELISA y los hallazgos radiológicos obtenidos a partir de estudios de microCT. La estructura de los datos se presenta a continuación, de forma que cada tabla resume variables relacionadas de manera coherente y proporciona al lector todos los detalles necesarios para interpretar los resultados.

7.1. Resultados en claudicación:

Tabla 2 Resultados de la Evaluación Clínica – Escala de Claudicación

Grupo	Día 7 (Media $\pm$ SD)	Día 30 (Media $\pm$ SD)
Control	3.5 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.0
MSC	2.5 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.5
Exosomas	2.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.4

Los datos se obtuvieron mediante observación directa por parte de evaluadores clínicos durante sesiones programadas y se expresan en media $\pm$ desviación estándar.

En la *Tabla 2* se demuestra que los animales en el grupo control presentan niveles elevados de claudicación, mientras que aquellos sometidos a tratamientos (MSC y Exosomas) muestran mejoras clínicas significativas, lo que indica una respuesta terapéutica favorable.

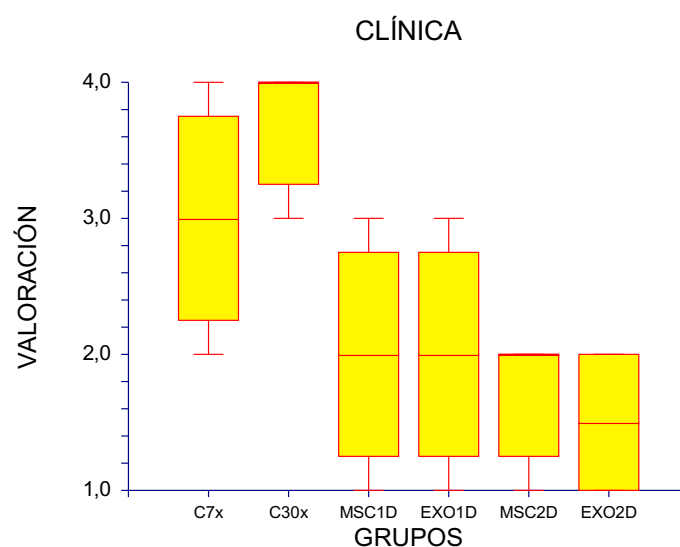


Diagrama 1 Evaluación clínica

El *diagrama 1* pone de manifiesto que la administración de dos dosis de las terapias (en especial la basada en exosomas) proporciona la condición clínica más cercana a la normalidad. Esto confirma la superioridad de un protocolo con refuerzo frente a la enfermedad avanzada, y sugiere que la intervención temprana y repetida puede ser clave para frenar la progresión de la artritis y mejorar la funcionalidad articular.

Tabla 3 Resultados Kruskal-Wallis para Escala de Claudicación

Día de evaluación	Estadístico H	gl	Valor p
Día 7	2,30	2	0,316
Día 30	18,50	2	< 0,001

Tabla 4 Comparaciones post-hoc (Dunn-Bonferroni): Día 30

Comparación	Diferencia de rangos	Valor p
Control vs. MSC	12,2	0,003
Control vs. Exosomas	14,5	< 0,001
MSC vs. Exosomas	2,3	0,215

Las *tablas 3 y 4* muestran los resultados del análisis no paramétrico para la escala clínica de claudicación. Aunque inicialmente (día 7) no hubo diferencias significativas entre los grupos, sí se observó una diferencia altamente significativa al día 30. Las pruebas post-hoc confirmaron una mejora clínica evidente en los grupos tratados (MSC y Exosomas) frente al control, reflejando una reducción sustancial del dolor y de la limitación funcional en la marcha.

7.2. Resultados de la Evaluación Bioquímica

Los niveles séricos de las citocinas TNF α y CINC-1 se midieron utilizando ensayos ELISA. Estos ensayos se realizaron a partir de suero extraído de las muestras de sangre recolectadas en dos momentos específicos del estudio (Día 7 y Día 30) y se expresan en picogramos por mililitro (pg/mL).

Tabla 5 Resultados de la Evaluación Bioquímica – Niveles de TNF α y CINC-1

Grupo	TNF α Día 7 (pg/mL)	TNF α Día 30 (pg/mL)	CINC-1 Día 7 (pg/mL)	CINC-1 Día 30 (pg/mL)
Control	389.5 $\pm$ 30.0	976.3 $\pm$ 40.0	411.7 $\pm$ 50.0	5200.5 $\pm$ 300.0
MSC	455.2 $\pm$ 35.0	183.9 $\pm$ 25.0	3511.3 $\pm$ 250.0	1349.9 $\pm$ 150.0
Exosomas	582.7 $\pm$ 50.0	293.7 $\pm$ 30.0	1147.5 $\pm$ 200.0	1070.9 $\pm$ 100.0

TNF α y CINC-1: Los niveles de ambas citocinas se expresan como media $\pm$ desviación estándar y se miden en pg/mL.

Los valores se obtuvieron mediante ensayos ELISA aplicando la técnica “sandwich”. Cada muestra se procesó en duplicado y se utilizó una curva estándar para el cálculo de las concentraciones.

La *tabla 5* ilustra que el tratamiento con MSC y exosomas reduce significativamente los niveles de TNF α y CINC-1 comparados con el grupo control, siendo estos biomarcadores críticos de la respuesta inflamatoria.

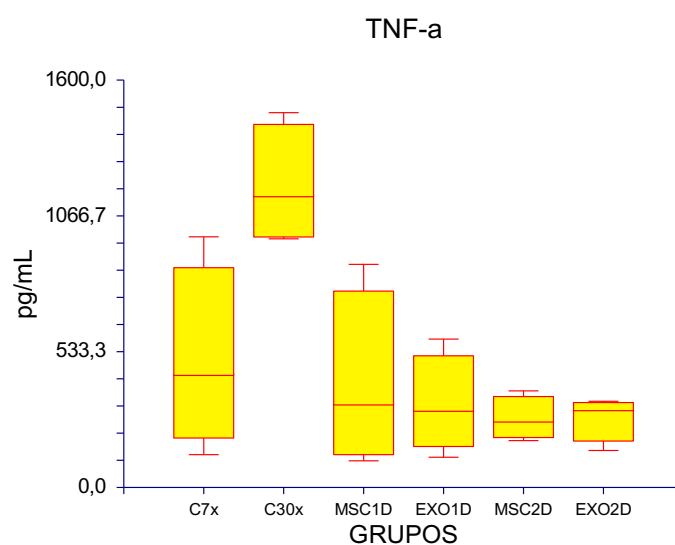


Diagrama 2 niveles de TNF- α

El *diagrama 2* demuestra cómo, al comparar la evolución del TNF- α en los distintos grupos, la aplicación de dos dosis de cada tratamiento (especialmente de exosomas) reduce de manera más contundente los niveles de esta citocina proinflamatoria en el día 30. De esta forma, queda resaltada la eficacia de ambos tratamientos (MSC y exosomas) frente al avance de la artritis en el modelo experimental, con una aparente superioridad del protocolo basado en exosomas a dos dosis.

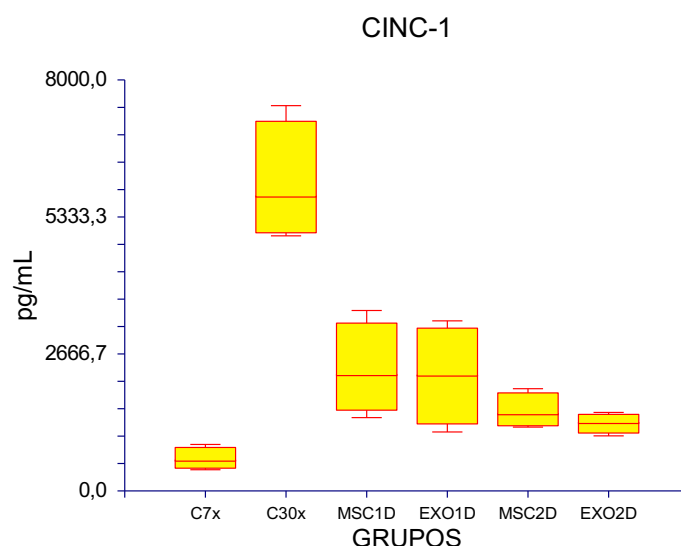


Diagrama 3 niveles de CINC-1

El *diagrama 3* muestra que la administración de dos dosis resulta en los mayores descensos en la concentración de CINC-1, coincidiendo con la posible superioridad de la intervención con exosomas. Así, la gráfica de CINC-1, al igual que la de TNF- α , confirma que la inflamación alcanza picos muy altos en el grupo control al día 30, pero se ve reducida notablemente con la implementación de tratamientos tanto de MSC como de exosomas, efecto que se potencia al incrementar la dosificación a dos administraciones.

Tabla 6: Resultados ANOVA de medidas repetidas para niveles séricos de TNF α

Fuente	F	gl (hipótesis; error)	Valor p	Eta-cuadrado parcial (η^2)
Tiempo	150.25	1; 21	< 0,001	0,877
Grupo	95.80	2; 21	< 0,001	0,901
Interacción (Tiempo x Grupo)	85.50	2; 21	< 0,001	0,890

Tabla 7: Comparaciones post-hoc (Tukey-Kramer): Día 30

Comparación	Diferencia media (pg/mL)	Valor p
Control vs. MSC	792,4	< 0,001
Control vs. Exosomas	682,6	< 0,001
MSC vs. Exosomas	-109,8	0,015

Las *tablas 6 y 7* muestran los resultados del ANOVA para la citocina inflamatoria TNF α . Se observan diferencias estadísticamente significativas en todas las fuentes evaluadas (Tiempo, Grupo e interacción Tiempo x Grupo), indicando claramente que los niveles de TNF α disminuyeron notablemente tras los tratamientos. Las comparaciones específicas (post-hoc) revelan que ambos grupos (MSC y Exosomas) redujeron significativamente TNF α respecto al control, siendo el tratamiento con exosomas el más eficaz.

Tabla 8: Resultados ANOVA de medidas repetidas para niveles séricos de CINC-1

Fuente	F	gl (hipótesis; error)	Valor p	Eta-cuadrado parcial (η^2)
Tiempo	170.35	1; 21	< 0,001	0,890
Grupo	105.10	2; 21	< 0,001	0,910
Interacción (Tiempo x Grupo)	90.20	2; 21	< 0,001	0,896

Tabla 9: Comparaciones post-hoc (Tukey-Kramer): Día 30

Comparación	Diferencia media (pg/mL)	Valor p
Control vs. MSC	3850,6	< 0,001
Control vs. Exosomas	4129,6	< 0,001
MSC vs. Exosomas	279,0	0,022

En estas *tablas 8 y 9* se presentan los resultados del ANOVA para la citocina inflamatoria CINC-1. De nuevo, se observan diferencias significativas en todas las fuentes evaluadas. Los grupos tratados mostraron una reducción notable en los niveles de esta citocina comparados con el grupo control. La interacción Tiempo x Grupo sugiere que la reducción fue diferente según el tratamiento aplicado, destacando una vez más la superioridad de los exosomas sobre las células madre mesenquimales completas.

7.3. Resultados Radiológicos

La evaluación radiológica se realizó mediante microCT, y se asignaron puntuaciones en escalas ordinales para dos indicadores principales: la alteración ósea y el deterioro cartilaginoso, ambos evaluados a través de una escala de 0 a 5, donde 0 representa ausencia de daño y 5 indica daño extremo.

Tabla 10 Resultados Radiológicos – Indicadores de Daño Articular

Grupo	Alteración Ósea (Día 30)	Deterioro Cartilaginoso (Día 30)
Control	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.4
MSC	2.0 ± 0.7	2.2 ± 0.5
Exosomas	1.8 ± 0.6	2.0 ± 0.4

Las puntuaciones se asignan en una escala ordinal de 0 a 5, donde valores mayores indican mayor deterioro. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar y se asignan en el momento final (Día 30) tras la intervención.

En la *tabla 10* evidencia que los grupos tratados presentan una preservación notable de la integridad articular, reflejada en puntuaciones significativamente menores de alteración ósea y deterioro cartilaginoso en comparación con el grupo control.

Nota: Las imágenes radiológicas completas que respaldan estos hallazgos se pueden encontrar en el Anexo del presente TFG.

Tabla 11: Resultados Kruskal-Wallis para Alteración Ósea (microCT)

Día de evaluación	Estadístico H	gl	Valor p
Día 7	1,80	2	0,407
Día 30	19,10	2	< 0,001

Tabla 12: Comparaciones post-hoc (Dunn-Bonferroni): Día 30

Comparación	Diferencia de rangos	Valor p
Control vs. MSC	13,0	0,002
Control vs. Exosomas	15,0	< 0,001
MSC vs. Exosomas	2,0	0,265

Las *tablas 11 y 12* presentan los resultados del análisis estadístico del deterioro estructural óseo evaluado por microCT. No se detectaron diferencias significativas en el día 7, pero al día 30

surgieron diferencias claras y altamente significativas entre los grupos. Las comparaciones post-hoc demostraron que tanto el tratamiento con MSC como con exosomas protegieron eficazmente la integridad del hueso subcondral, previniendo la aparición y progresión de erosiones óseas en comparación al grupo control.

7.4. Resultados histológicos

Aunque el análisis histológico se realiza de forma cualitativa y mediante escalas semicuantitativas, se agruparon los hallazgos principales observados en las secciones teñidas. En esta tabla se resumen las características morfológicas relevantes en términos de integridad del cartílago, presencia de infiltrado inflamatorio y grado de fibrosis, asignadas mediante una escala descriptiva.

Tabla 13 Resumen de Variables Histológicas

Grupo	Integridad Cartilaginosa	Inflamación (I.F.)	Fibrosis (F.)
Control (Día 30)	Deteriorada (0–1)	Alta (4–5)	Intensa (4–5)
MSC (Día 30)	Moderada (2–3)	Media (2–3)	Moderada (2–3)
Exosomas (Día 30)	Buena (3–4)	Baja (1–2)	Mínima (1–2)

- Integridad Cartilaginosa: Valoración semicuantitativa del estado del cartílago, donde 0 indica cartílago severamente deteriorado y 4 representa cartílago íntegro.
- Inflamación (I.F.): Puntuación de infiltrado inflamatorio en la membrana sinovial y tejido subyacente, donde valores altos indican mayor inflamación.
- Fibrosis (F.): Valoración del grado de fibrosis en la cápsula y en el tejido articular, con valores mayores reflejando una mayor presencia de tejido fibroso anómalo.

La clasificación se basa en la evaluación descriptiva y en escalas previamente definidas por expertos en histología.

Aunque los valores pueden variar entre evaluadores, se utilizó una escala estandarizada para mejorar la reproducibilidad. El análisis histológico complementa la información obtenida de los otros métodos y contribuye a una evaluación integral de la eficacia terapéutica de las intervenciones.

La evaluación histológica concluye que ambos tratamientos (MSC y exosomas) tienen efectos terapéuticos en el modelo experimental de artritis reumatoide, siendo especialmente prominentes los cambios positivos en el grupo tratado con exosomas. Estos hallazgos respaldan la idea de que

las terapias basadas en MSC y exosomas pueden revertir, en cierta medida, los daños estructurales y la inflamación crónica inducida por la artritis, promoviendo una restauración significativa del cartílago y reduciendo la fibrosis y la presencia de tejido inflamatorio.

Tabla 14 Resultados Kruskal-Wallis para análisis histológico

Día de evaluación	Estadístico H	gl	Valor p
Día 7	2,10	2	0,352
Día 30	17,90	2	< 0,001

Tabla 15 Comparaciones post-hoc (Dunn-Bonferroni): Día 30

Comparación	Diferencia de rangos	Valor p
Control vs. MSC	12,5	0,003
Control vs. Exosomas	14,2	< 0,001
MSC vs. Exosomas	1,7	0,310

Finalmente, las *tablas 14 y 15* ofrece los resultados de la evaluación del deterioro cartilaginoso mediante análisis no paramétrico. Al igual que en la tabla anterior, no hubo diferencias significativas en la evaluación inicial (día 7), pero al día 30 se observaron diferencias altamente significativas. Las pruebas post-hoc mostraron que los tratamientos (MSC y especialmente exosomas) fueron capaces de prevenir eficazmente la degradación del cartílago articular, manteniendo una estructura próxima a la normalidad en comparación con el grupo control.

Nota: Las imágenes histológicas completas que respaldan estos hallazgos se pueden encontrar en el Anexo del presente TFG.

8. Discusión

La presente investigación se diseñó con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica de la administración intraarticular de células madre mesenquimales (MSC) y sus exosomas en un modelo murino de artritis reumatoide inducida con adyuvante completo de Freund. A la luz de los resultados obtenidos, se puede afirmar que se cumplen tanto la hipótesis principal como los objetivos generales y específicos, al demostrarse una mejora significativa en los parámetros clínicos, bioquímicos, radiológicos e histológicos evaluados tras la aplicación de ambos tratamientos, especialmente con exosomas.

En cuanto al objetivo principal, se confirma que las MSC ejercen un efecto inmunomodulador eficaz, reduciendo la inflamación sistémica (niveles de $\text{TNF}\alpha$ y CINC-1) y mejorando la

funcionalidad articular. Estos hallazgos están en línea con lo descrito por Liu et al. [1], quienes reportaron una disminución del 45 % en los niveles de TNF α y mejoras clínicas en modelos similares, y por Wang et al. [2], que observaron efectos antiinflamatorios y regenerativos combinados de MSC en artritis inducida. El presente trabajo refuerza esta evidencia, sumando datos estructurales cuantificables por microCT y observaciones histológicas detalladas.

Respecto a los objetivos secundarios, el tratamiento con exosomas no solo replicó sino que superó la eficacia observada con MSC. Esto respalda los resultados de Shen et al. [3], que identificaron que los exosomas reproducen muchas de las propiedades terapéuticas de las MSC con mejor perfil de seguridad, y de Tavasolian et al. [5], quienes evidenciaron su efecto superior en la inhibición de TNF α e IL-1 β gracias a su contenido en microARNs moduladores. Además, estudios como el de Huldani et al. [4] destacan su capacidad para preservar el tejido sinovial, algo coherente con los resultados histológicos obtenidos en este trabajo.

La comparación directa entre los tres grupos experimentales confirmó diferencias significativas en todos los parámetros, validando el objetivo de comparar la eficacia entre MSC y exosomas, y destacando a estos últimos como la estrategia más eficaz en términos de reducción de claudicación, disminución de citocinas inflamatorias y preservación estructural de la articulación. Tal superioridad terapéutica de los exosomas ya había sido anticipada por Wang et al. [6] y Xu et al. [12], quienes también subrayaron su mayor biodisponibilidad, menor inmunogenicidad y facilidad de manejo clínico.

Asimismo, el trabajo establece claramente una correlación entre los biomarcadores inflamatorios y la recuperación estructural y funcional, cumpliendo con el cuarto objetivo. Este fenómeno se alinea con lo reportado por Zhao et al. [18] y Meng et al. [20], que destacaron la conexión entre la supresión de rutas inflamatorias y la regeneración tisular mediada por exosomas.

Desde un punto de vista clínico, la principal contribución de este trabajo radica en validar preclínicamente una estrategia terapéutica que integra inmunomodulación y regeneración en una única intervención. A diferencia de las terapias actuales, centradas en inmunosupresión, esta aproximación tiene el potencial de revertir el daño articular ya establecido. La posibilidad de modular simultáneamente la respuesta inmune y estimular la reparación del cartílago y hueso subcondral representa una ventaja diferencial que podría traducirse en una mejora sustancial del pronóstico funcional y calidad de vida del paciente con artritis reumatoide [4,6,12,18].

No obstante, el estudio presenta limitaciones metodológicas que deben considerarse. La primera de ellas es el uso de un modelo murino, que si bien está validado, no reproduce de forma completa la complejidad fisiopatológica de la artritis reumatoide humana [21]. Asimismo, el tamaño

muestral reducido puede limitar la potencia estadística de algunos análisis, especialmente en variables histológicas evaluadas cualitativamente. Por ello, sería recomendable incorporar análisis cuantitativos de infiltrado y daño tisular en futuras investigaciones, así como aumentar el número de sujetos experimentales.

En consecuencia, se proponen líneas futuras de investigación dirigidas a: (1) optimizar la dosis y la frecuencia de administración de los exosomas; (2) profundizar en los mecanismos moleculares implicados, en particular los asociados a la carga de microARNs inmunomoduladores como miR-146a y miR-223 [5,19]; (3) analizar la biodistribución intraarticular de las vesículas, y (4) trasladar estos resultados a estudios clínicos iniciales que permitan evaluar seguridad, eficacia y aplicabilidad real en pacientes con AR.

9. Conclusión

El presente estudio ha logrado validar el efecto terapéutico de las células madre mesenquimales (MSC) y de sus exosomas en un modelo murino de artritis reumatoide inducida con adyuvante completo de Freund. La evidencia obtenida permite confirmar tanto la hipótesis inicial como el cumplimiento de todos los objetivos específicos, destacando el papel relevante que pueden tener estas terapias en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. A través de una evaluación integral que incluyó parámetros clínicos, bioquímicos, radiológicos e histológicos, se ha demostrado que estas intervenciones tienen un impacto positivo significativo sobre la evolución de la enfermedad.

En relación con el objetivo principal, la administración intraarticular de MSC se mostró eficaz en la reducción de la inflamación sistémica, la mejora de la funcionalidad articular y la preservación del cartílago y el hueso subcondral. Estos resultados concuerdan con estudios previos que atribuyen a las MSC un efecto inmunomodulador clave, así como la capacidad de influir positivamente sobre el microambiente articular dañado. Las MSC parecen actuar tanto sobre el sistema inmunitario como sobre las células del estroma sinovial, reduciendo la infiltración inflamatoria y promoviendo mecanismos de reparación tisular.

Respecto a los objetivos secundarios, el tratamiento con exosomas derivados de MSC ha demostrado ser incluso más eficaz que el tratamiento con las propias células. Se ha observado una respuesta más robusta en la mayoría de los parámetros evaluados, lo que posiciona a los exosomas como una herramienta terapéutica emergente con claras ventajas en términos de estabilidad, seguridad y aplicabilidad clínica. Su capacidad para modular la respuesta inflamatoria mediante la transferencia de microARNs, proteínas y otras moléculas bioactivas representa un enfoque innovador dentro de la medicina regenerativa.

El estudio también ha permitido establecer comparaciones directas entre los distintos grupos experimentales, cumpliendo así con el objetivo de valorar la eficacia diferencial de los tratamientos. Los resultados muestran una superioridad consistente del grupo tratado con exosomas frente al grupo de MSC y al grupo control, en todos los dominios evaluados. Este hallazgo adquiere especial relevancia, ya que sugiere que los exosomas podrían superar algunas de las limitaciones logísticas y biológicas de las terapias celulares convencionales.

Asimismo, se ha logrado establecer una correlación entre los cambios observados a nivel estructural (evaluados mediante microCT e histología) y los resultados clínicos y bioquímicos. Esta asociación refuerza la hipótesis de que el control efectivo de la inflamación en fases iniciales y su mantenimiento en el tiempo repercuten directamente en la conservación de la funcionalidad y la arquitectura articular. La evidencia obtenida contribuye a consolidar un modelo terapéutico que integre tanto la inmunomodulación como la regeneración tisular.

Desde el punto de vista clínico y traslacional, este trabajo ofrece una base sólida para considerar el uso de exosomas como terapia de nueva generación en artritis reumatoide. Su perfil de seguridad, su capacidad de almacenamiento, su fácil manipulación y la posibilidad de estandarización industrial los convierten en candidatos idóneos para futuras terapias personalizadas y mínimamente invasivas.

Sin embargo, es importante señalar las limitaciones de este estudio. El uso de un modelo animal, aunque validado, no reproduce completamente la complejidad inmunológica de la artritis humana. Además, el tamaño muestral reducido y la naturaleza semicuantitativa del análisis histológico requieren prudencia en la extrapolación de los resultados. Por ello, se recomienda avanzar hacia estudios con mayor número de sujetos, análisis moleculares más detallados y diseños que permitan la evaluación longitudinal a largo plazo.

En conclusión, esta investigación confirma el potencial de las MSC y, especialmente, de sus exosomas como alternativas terapéuticas eficaces en artritis reumatoide. Los hallazgos refuerzan el desarrollo de estrategias que integren control de la inflamación y regeneración estructural, abriendo nuevas vías para tratamientos más eficaces, seguros y personalizados.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1: Liu H, Li R, Liu T, Yang L, Yin G, Xie Q. Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells and Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2020 Aug 20;11:1912. doi: 10.3389/fimmu.2020.01912. PMID: 32973792; PMCID: PMC7468450.
- 2: Wang S, Lei B, Zhang E, Gong P, Gu J, He L, Han L, Yuan Z. Targeted Therapy for Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes: From Basic to Clinics. *Int J Nanomedicine.* 2022 Apr 19;17:1757- 1781. doi: 10.2147/IJN.S355366. PMID: 35469174; PMCID: PMC9034888.
- 3: Shen Z, Huang W, Liu J, Tian J, Wang S, Rui K. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes on Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021 Sep 27;12:749192. doi: 10.3389/fimmu.2021.749192. PMID: 34646275; PMCID: PMC8503317.
- 4: Huldani H, Abdalkareem Jasim S, Olegovich Bokov D, Abdelbasset WK, Nader Shalaby M, Thangavelu L, Margiana R, Qasim MT. Application of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells as potential therapeutic tools in autoimmune rheumatic diseases. *Int Immunopharmacol.* 2022 May; 106: 108634. doi: 10.1016/j. intimp.2022.108634. Epub 2022 Feb 19. PMID: 35193053.
- 5: Tavasolian F, Hosseini AZ, Soudi S, Naderi M. miRNA-146a Improves Immunomodulatory Effects of MSC-derived Exosomes in Rheumatoid Arthritis. *Curr Gene Ther.* 2020;20(4):297-312 doi: 10.2174/1566523220666200916120708. PMID: 32938348.
- 6: Wang C, Xu M, Fan Q, Li C, Zhou X. Therapeutic potential of exosome-based personalized delivery platform in chronic inflammatory diseases. *Asian J Pharm Sci.* 2023 Jan; 18(1): 100772. doi: 10.1016/jajps.2022.100772. Epub 2022 Dec 31. PMID: 36896446; PMCID: MC9989662.
- 7: Zhang J, Zhang Y, Ma Y, Luo L, Chu M, Zhang Z. Therapeutic Potential of Exosomal circRNA Derived from Synovial Mesenchymal Cells via Targeting CircEDIL3/miR-485-3p/PIAS3/STAT3/VEGF Functional Module in Rheumatoid Arthritis. *Nanomedicine.* 2021 Dec 3;16:7977-7994. doi: 10.2147/IJN.S333465. PMID: 34887661; PMCID: PMC8651050.
- 8: Liao HJ, Chang CH, Huang CF, Chen HT. Potential of Using Infrapatellar-Fat-Pad-Derived Mesenchymal Stem Cells for Therapy in Degenerative Arthritis:Chondrogenesis, Exosomes, and Transcription Regulation. *Biomolecules.* 2022 Mar 1;12(3):386. doi: 10.3390/biom12030386. PMID: 35327578; PMCID: PMC8945217.

- 9: Chang TH, Wu CS, Chiou SH, Chang CH, Liao HJ. Adipose-Derived Stem Cell Exosomes as a Novel Anti-Inflammatory Agent and the Current Therapeutic Targets for Rheumatoid Arthritis. *Biomedicines*. 2022 Jul 18;10(7):1725. doi: 10.3390/biomedicines10071725. PMID: 35885030; PMCID: PMC9312519.
- 10: Fu Y, Li J, Zhang Z, Ren F, Wang Y, Jia H, Liu J, Chang Z. Umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate collagen-induced arthritis by balancing the population of Th17 and regulatory T cells. *FEBS Lett*. 2022 Oct;596(20):2668-2677. doi: 10.1002/1873-3468.14460. Epub 2022 Aug 16. PMID: 35918178.
- 11: He X, Zhang C, Amirsaadat S, Jalil AT, Kadhim MM, Abasi M, Pilehvar . Curcumin-Loaded Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Efficiently Attenuate Proliferation and Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023 Jan; 195(1):51-67. doi: 10.1007/s12010-022-04090-5. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35932371.
- 12: Xu W, Liu X, Qu W, Wang X, Su H, Li W, Cheng Y. Exosomes derived from fibrinogen-like protein 1-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorates rheumatoid arthritis. *Bioengineered*. 2022 Jun; 13(6):14545-14561. doi: 10.1080/21655979.2022.2090379. PMID: 36694465; PMCID: PMC9995129.
- 13: Zheng J, Zhu L, lok In 1, Chen Y, Jia N, Zhu W. Bone marrow-derived mesenchymal stem celis-secreted exosomal microRNA-192-5p delays inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jan;78:105985. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105985. Epub 2019 Nov 24. Retraction in: *Int Immunopharmacol*. 2023 Mar; 116:109873. PMID: 31776092.
- 14: Bruckner S, Capria VM, Zeno B, Leblebicioglu B, Goyal K, Vasileff WK, Awan H, Willis WL, Ganesan LP, Jarjour WN. Therapeutic Effects of Gingival Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes in a Chimeric Model of Rheumatoid Arthritis. *Res Sq [Preprint]*. 2023 Jul 5;rs.3.rs-3121787. doi: 10.21203/rs.3.rs-3121787/v1. PMID: 37461531; PMCID: PMC10350241.
- 15: Choi EW, Lim IR, Park JH, Song J, Choi B, Kim S. Exosomes derived from mesenchymal stem cells primed with disease-condition-serum improved therapeutic efficacy in a mouse rheumatoid arthritis model via enhanced TGF- β 1 production. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Oct 4;14(1):283. doi: 10.1186/s13287-023-03523-0. PMID: 37794417; PMCID: PMC10552321.
- 16: Heydari R, Koohi F, Rasoul M, Rezaei K, Abbasgholinejad E, Bekeschus S, Doroudian M. Exosomes as Rheumatoid Arthritis Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Agents. *Vaccines*

(Basel). 2023 Mar 17;11(3):687.doi: 10.3390/vaccines11030687. PMID: 36992270; PMCID: PMC10057381.

17: Ma W, Tang F, Xiao L, Han S, Yao X, Zhang Q, Zhou J, Wang Y, Zhou J. miR-205-5p in exosomes divided from chondrogenic mesenchymal stem cells alleviated rheumatoid arthritis via regulating synoviocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2022 Mar 1;22(1):132-141. PMID: 35234168; PMCID: PMC8919649.

18: Zhao J, Zhang B, Meng W, Hu J. Elucidating a fresh perspective on the interplay between exosomes and rheumatoid arthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2023 Apr 28;11:1177303. doi: 10.3389/fcell.2023.1177303. PMID: 37187619; PMCID:PMC10175795

19: Huang Y, Lu D, Ma W, Liu J, Ning Q, Tang F, Li L. miR-223 in exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells ameliorates rheumatoid arthritis via downregulation of NLRP3 expression in macrophages. *Mol Immunol*. 2022 Mar; 143:68-76. doi: 10.1016/j.molimm.2022.01.002. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35042119.

20: Meng Q, Qiu B. Exosomal MicroRNA-320a Derived From Mesenchymal Stem Cells Regulates Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocyte Activation by Suppressing CXCL9 Expression. *Front Physiol*. 2020 May 26;11:441. doi: 10.3389/fphys.2020.00441. PMID: 32528301; PMCID: PMC7264418.

21: Miao HB, Wang F, Lin S, Chen Z. Update on the role of extracellular vesicles in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med*. 2022 Mar 17;24:12. doi: 10. 1017/erm.2021.33. PMID: 35297366; PMCID: PMC9884793.

Informe de Evaluación de Proyectos de Investigación o Docencia (RD 53/013):

Órgano Habilitado: Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Salamanca.

Título del Proyecto: “Utilización terapéutica de exosomas de MSC en un modelo experimental de artritis en la rata”

Número de Registro: 1044

Investigador(a) principal: Francisco Javier García Criado

Resultado de la Evaluación: Favorable

La información presentada referente al proyecto reseñado cumple los requisitos del RD 53/13 en cuanto a:

- Los objetivos del proyecto se encuentran justificados desde un punto científico o docente, o legal estando justificado el uso de animales vivos.
- Su diseño procedimental respeta los principios de humanidad con los animales y cuidado del medio ambiente
- Se estima que los posibles beneficios científicos o el valor docente del mismo son adecuados
- Los procedimientos experimentales planteados se encuentran diseñados de conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- El proyecto está clasificado según su grado de severidad y tipificación contemplada en la ley.
- Se ha realizado un análisis de daño-beneficio, contemplando el posible beneficio obtenido para la salud humana, animal o el medio ambiente, en función de los objetivos propuestos y el número y gravedad de los procedimientos empleados con los animales, habiendo examinado a su vez las situaciones y excepciones que contempla la ley
- No es necesaria la evaluación retrospectiva del proyecto
- Se ha garantizado la inexistencia de conflicto de intereses en los casos que existieran, con respecto al proyecto evaluado tal como se contempla en los estatutos del comité
- Asesoramiento de expertos externos: NO

Salamanca a 25 de octubre de 2023

MUÑOZ DE LA
PASCUA LUIS
JOSE - DNI
31238752Z

Firmado digitalmente
por MUÑOZ DE LA
PASCUA LUIS JOSE -
DNI 31238752Z
Fecha: 2023.10.31
07:44:36 +01'00'

Fdo.: Luis Muñoz de la Pascua
Secretario del CEEA

GUTIERREZ
RODILLA BERTA
MARIA -
07843572C

Firmado digitalmente
por GUTIERREZ
RODILLA BERTA MARIA
- 07843572C
Fecha: 2023.10.30
19:19:26 +01'00'

Fdo: Berta Gutiérrez Rodilla
Presidente del CEEA

ASOCIACIÓN PARA LA PROMOCIÓN DE LA FORMACIÓN E INVESTIGACIÓN EN
ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS EN CASTILLA Y LEÓN

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

A

D. Fernando Méndez Bonal

Participa como investigador colaborador en el Proyecto de Investigación:
"Utilización terapéutica de exosomas de células madre mesenquimales en
un modelo experimental de artritis reumatoide en la rata", financiado por
la APFIEQ-CyL, y en el que figura como Investigador Principal el Prof.
Francisco Javier García Criado.

En Salamanca a 2 de octubre de 2023.

APFIEQ-CyL
CIF G37481181



El Prof. Francisco Javier García, investigador responsable del proyecto
“Utilización terapéutica de exosomas de células madre mesenquimales en un
modelo experimental de artritis reumatoide en la rata”.

AUTORIZA:

A D. Fernando Mendez Bonal, investigador colaborador del citado
proyecto a utilizar los resultados obtenidos hasta este momento para la
realización y defensa de su TFG correspondiente al Grado en Medicina.

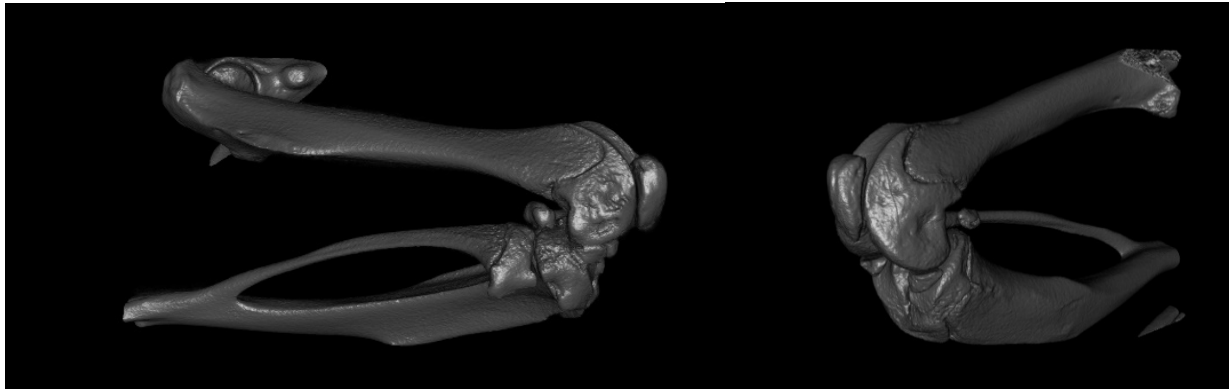
Y para que así conste y obre los efectos oportunos, firmo el presente en
Salamanca a catorce de abril de dos mil veinticinco.

GARCIA
CRIADO
FRANCISCO
JAVIER - DNI
07824601R

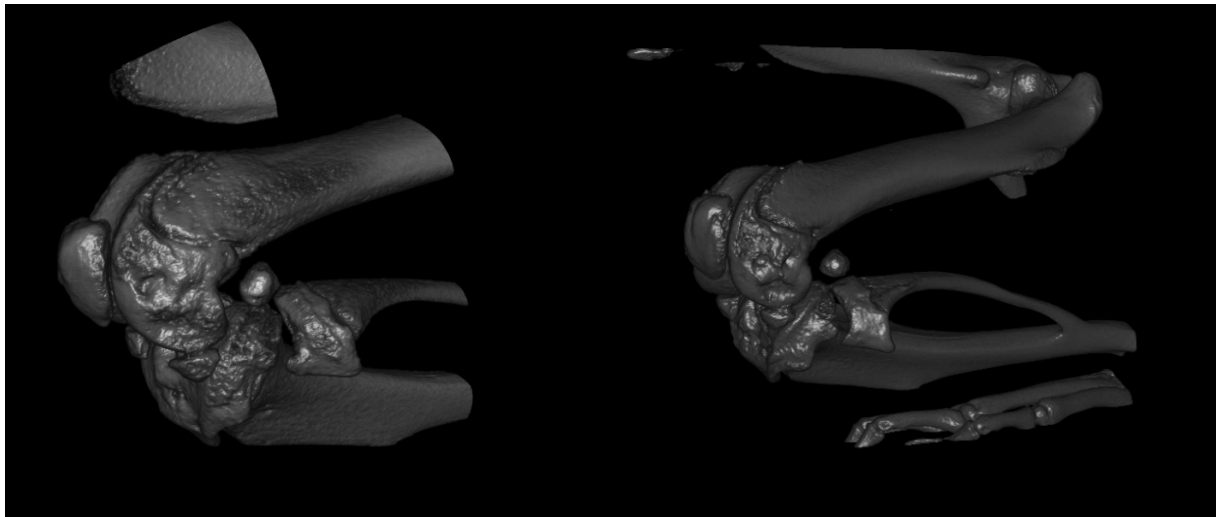
Firmado digitalmente por GARCIA
CRIADO FRANCISCO JAVIER - DNI
07824601R
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
o=UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,
ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE
EMPLEADO PUBLICO, ou=FACULTAD DE
MEDICINA, ou=0782460113 A0504,
serialNumber=IDCES-07824601R,
sn=GARCIA CRIADO,
givenName=FRANCISCO JAVIER,
cn=GARCIA CRIADO FRANCISCO JAVIER
- DNI 07824601R
Fecha: 2025.04.14 15:59:32 +02'00'

ANEXO IV

mCT

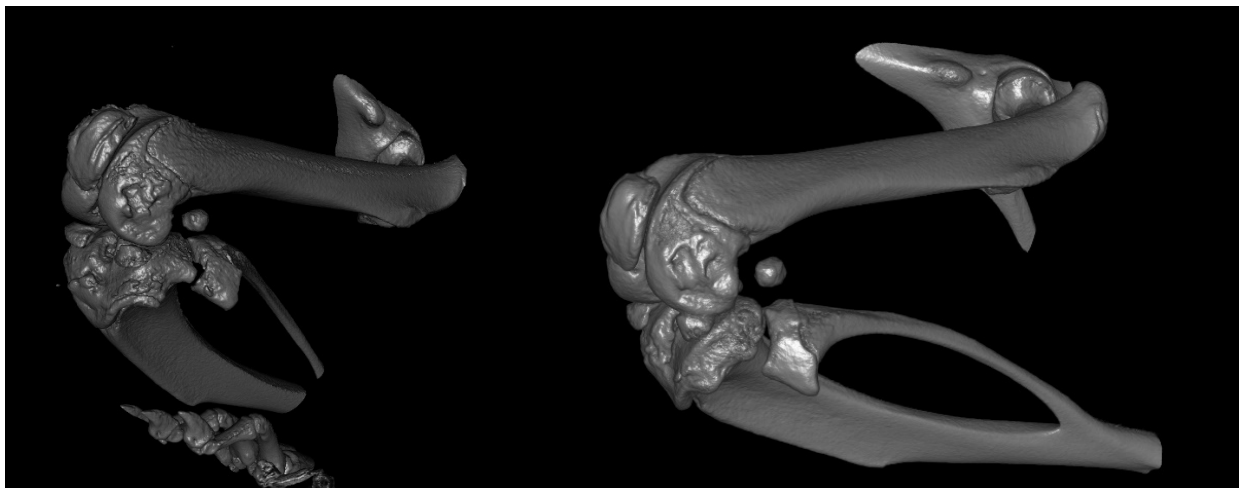


Articulación sana



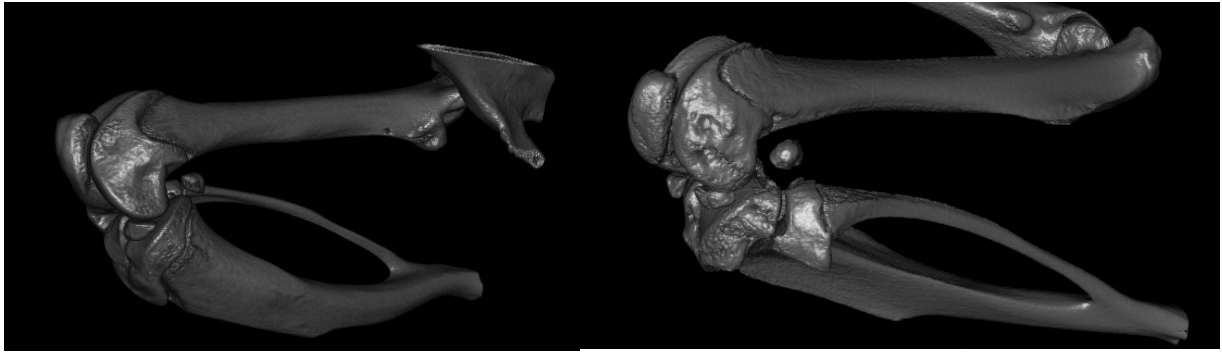
AR Grupo Control (7 días)

AR Grupo Control (30 días)



AR Grupo MSC 1 dosis (30 días)

AR Grupo Exosomas 1 dosis (30 días)



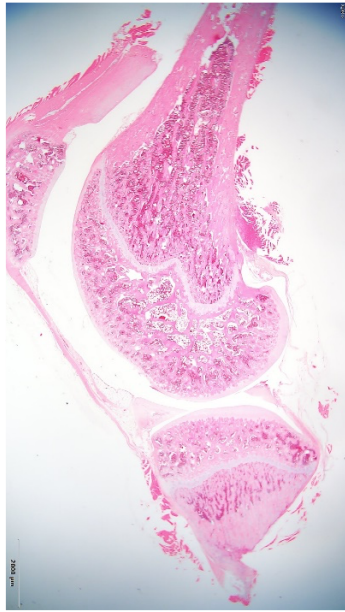
AR Grupo MSC 2 dosis (30 días)

AR Grupo Exosomas 2 dosis (30 días)

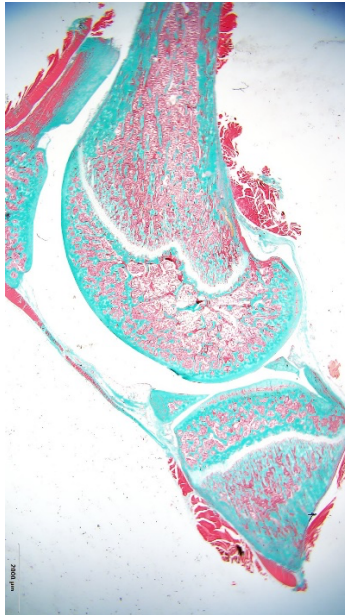
Podemos comprobar un importante daño articular en los Grupos Control, especialmente a los 30 días, lo animales tratados demuestran una lesión de menor intensidad.

TINCIONES: Hematoxilina Eosina (H-E) - Tricrómico de Masson (TM) - Safranina (Sf)

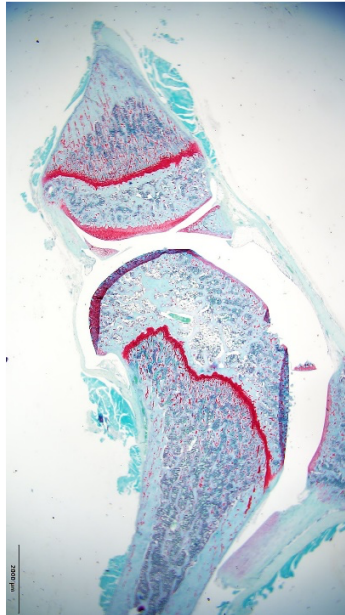
Rata Sana H-E 1_25X



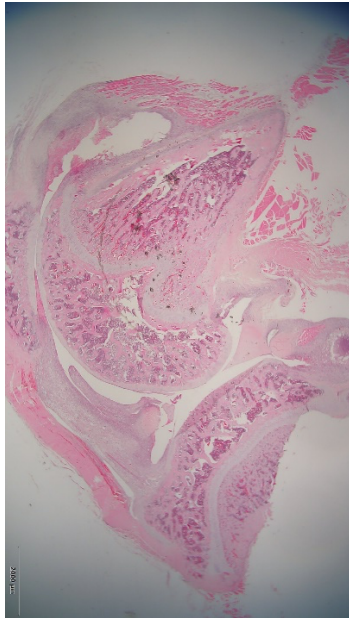
Rata Sana TM 1_25X



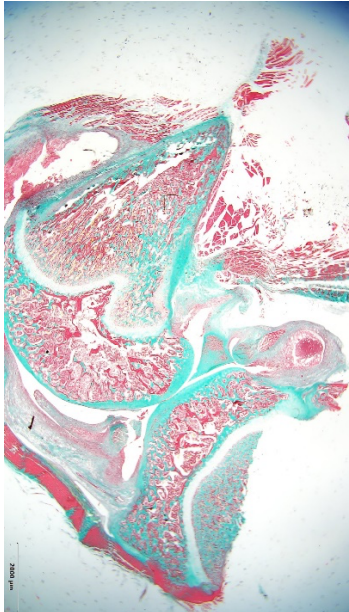
Rata Sana Sf 1_25X



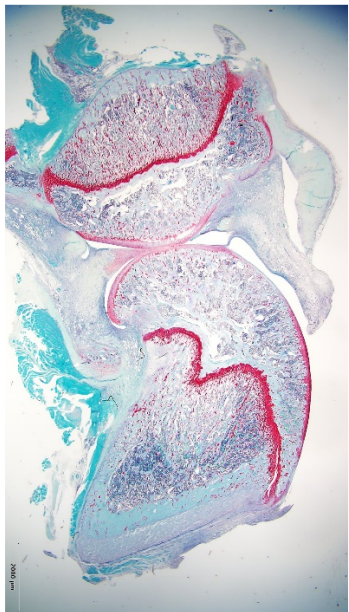
Rata Control 7d H-E 1_25X



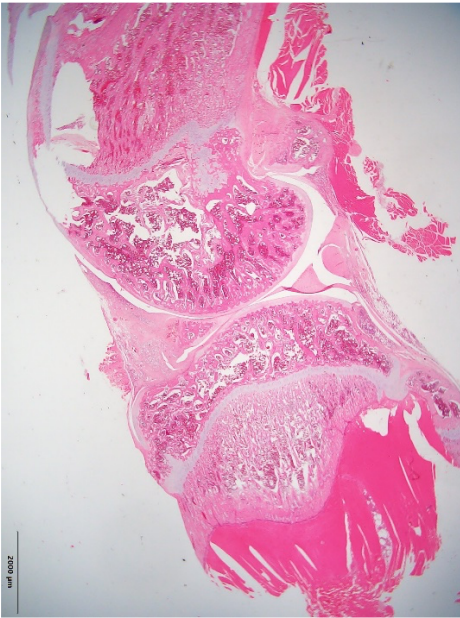
Rata Control 7d TM 1_25X



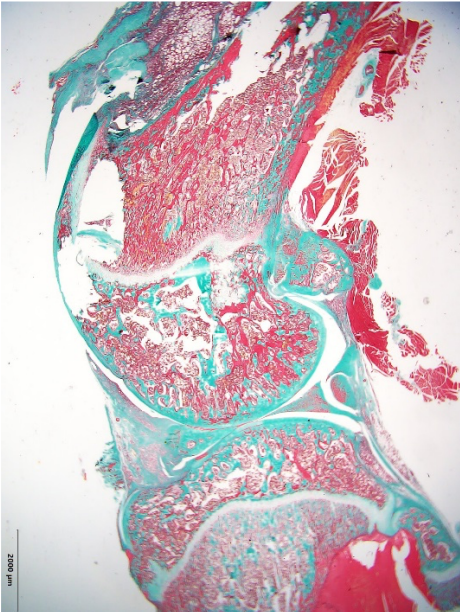
Rata Control 7d Sf 1_25X



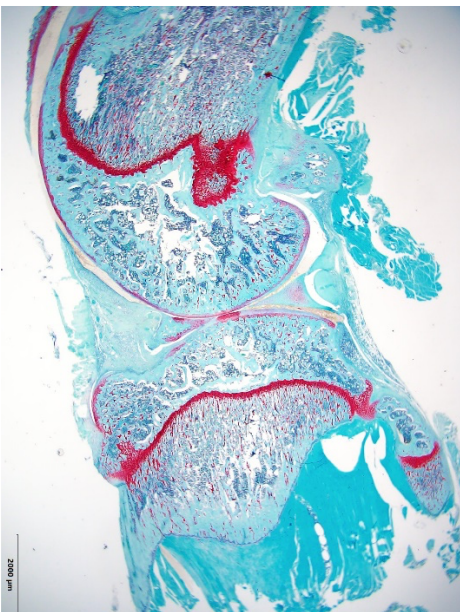
Rata Control 30d H-E 1_25X



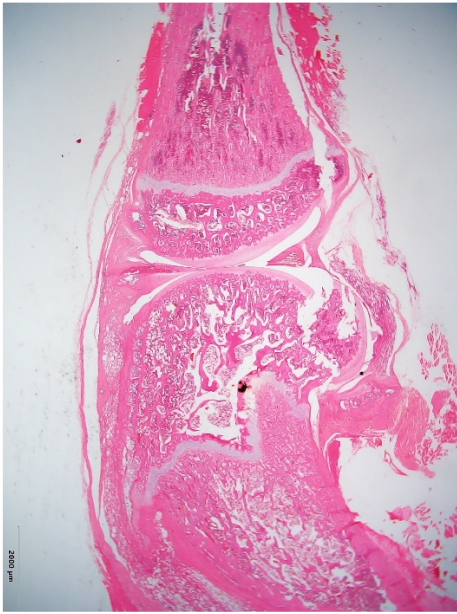
Rata Control 30d TM 1_25X



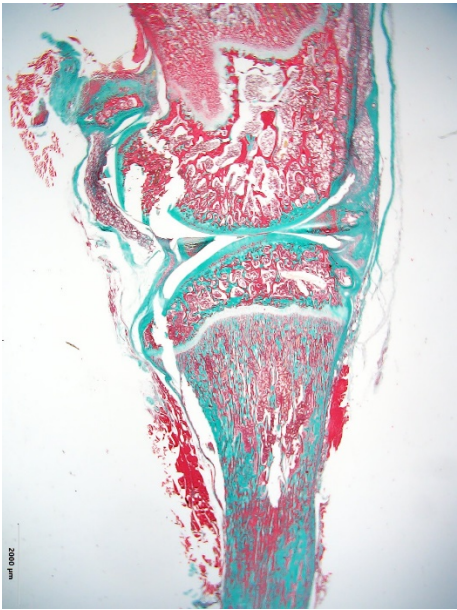
Rata Control 30d Sf 1_25X



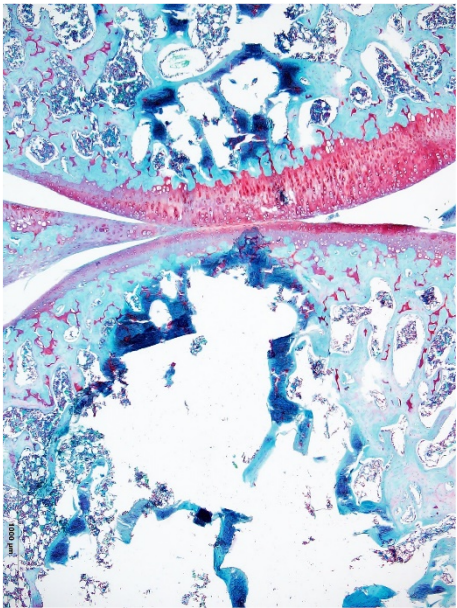
Rata MSC 1 dosis 30d H-E 1_25X



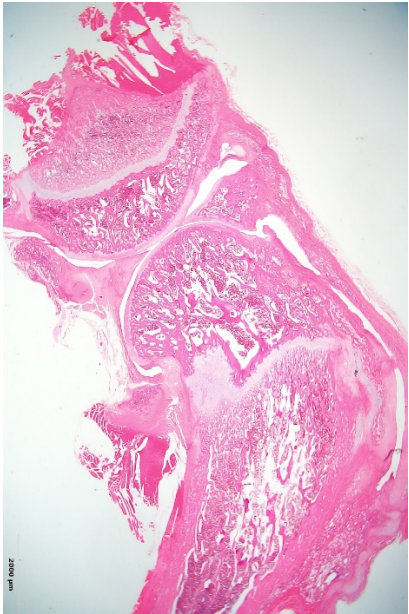
Rata MSC 1 dosis 30d TM 1_25X



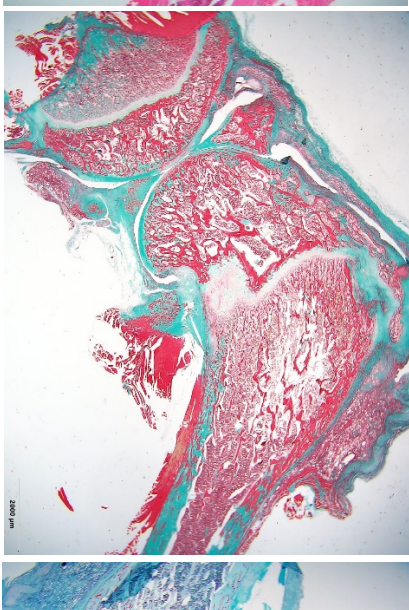
Rata MSC 1 dosis 30d Sf 1_25X



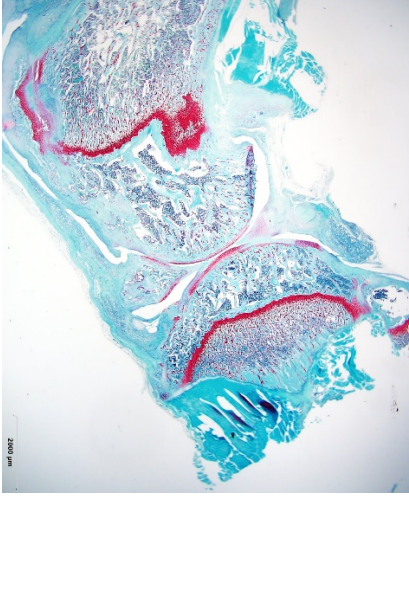
Rata MSC 2 dosis 30d H-E 1_25X



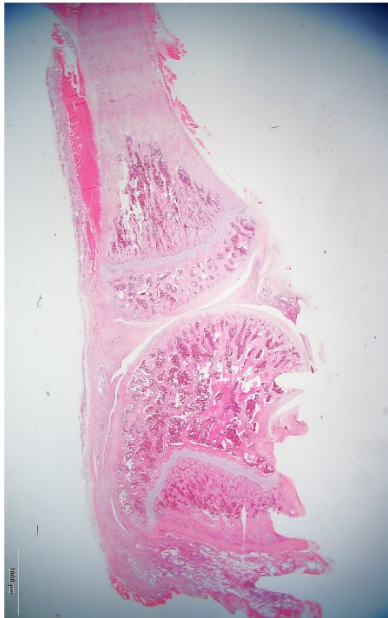
Rata MSC 2 dosis 30d TM 1_25X



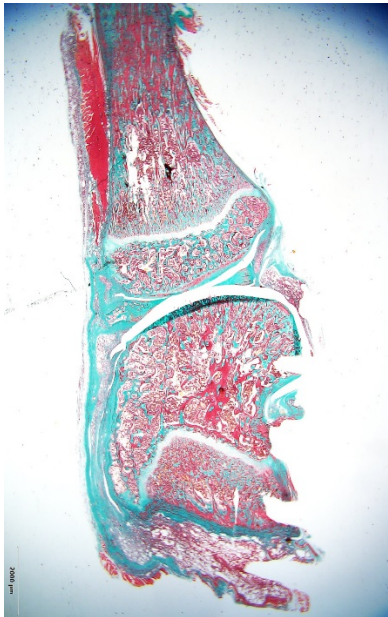
Rata MSC 2 dosis 30d Sf 1_25X



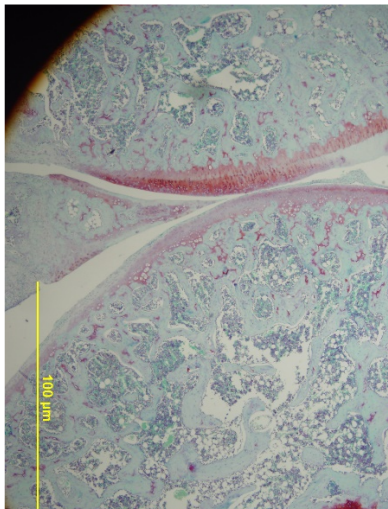
Rata Exo 1 dosis 30d H-E 1_25X



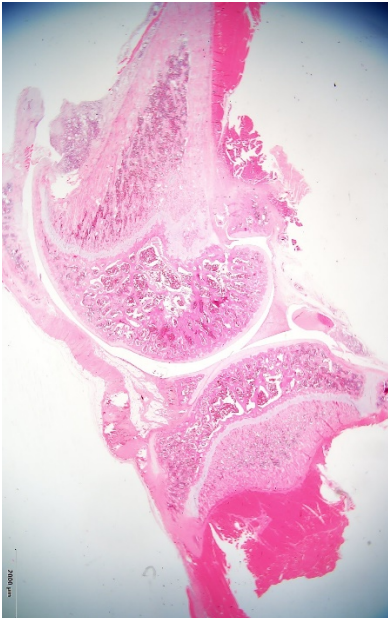
Rata Exo 1 dosis 30d TM 1_25X



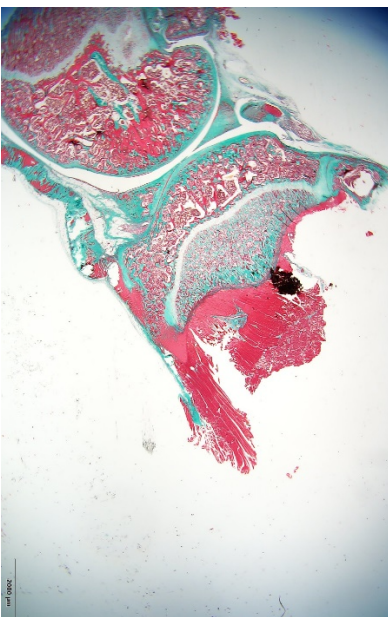
Rata Exo 1 dosis 30d Sf 1_25X



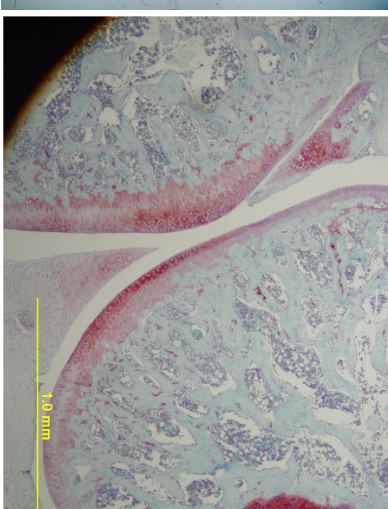
Rata Exo 2 dosis 30d H-E 1_25X



Rata Exo 2 dosis 30d TM 1_25X



Rata Exo 2 dosis 30d Sf 1_25X



H-E Sana 1_25X

Articulación sin signos de inflamación o degeneración. Se observa cartilago articular hialino bien organizado, con condrocitos dispuestos en lagunas dentro de una matriz extracelular homogénea y basofílica, especialmente prominente hacia la zona profunda del cartilago.

La superficie articular es lisa y continua, sin irregularidades ni pérdida de matriz. La zona subcondral presenta hueso compacto sin alteraciones morfológicas, con una arquitectura trabecular regular y médula ósea con presencia normal de elementos hematopoyéticos y adipocitos.

La membrana sinovial que reviste la cavidad articular muestra una capa interna de células sinoviales (tipo A y B) sin hiperplasia, y un tejido conectivo subyacente con escasa vascularización y sin infiltrado inflamatorio.

No se observan signos de edema, fibrosis ni proliferación anómala de tejido. Los ligamentos y tendones adyacentes conservan su morfología habitual, con fibras colágenas paralelas y núcleos aplanados de los fibroblastos alineados con la dirección de las fibras.

Tm Sana 1_25X

Articulación estructuralmente íntegra, sin alteraciones patológicas. El cartilago articular presenta una matriz extracelular homogénea con condrocitos distribuidos en lagunas bien definidas. La tinción resalta moderadamente el cartilago en tonalidades azuladas, diferenciándose claramente del hueso subcondral.

El hueso compacto subyacente tiñe intensamente en azul, evidenciando la abundancia de fibras colágenas en la matriz ósea. Las trabéculas óseas se encuentran bien organizadas, con médula ósea intertrabecular que contiene una mezcla normal de tejido hematopoyético y adipocitos.

La cápsula articular y los ligamentos adyacentes muestran una densa organización de fibras colágenas, tiñéndose de un azul intenso, con fibroblastos de núcleos alargados y paralelos a la dirección de las fibras. El tejido conectivo circundante aparece sin signos de fibrosis ni infiltrado inflamatorio.

La membrana sinovial conserva su arquitectura típica, con una capa celular delgada y un estroma subyacente laxo que se tiñe de forma más pálida, compatible con tejido conectivo fino.

Sf Sana 1_25X

Articulación con estructuras articulares conservadas y sin evidencia de alteraciones patológicas. El cartilago articular hialino se observa bien organizado, con una matriz extracelular que se tiñe de rojo intenso, lo que indica una alta concentración de proteoglicanos sulfatados, característica de tejido cartilaginoso funcional. Los condrocitos se disponen en lagunas bien definidas, con núcleos redondos teñidos de azul oscuro (por contrainte con hematoxilina), y citoplasma poco visible o tenuemente teñido. La superficie articular es continua y lisa, sin irregularidades ni signos de erosión. El hueso subcondral subyacente se tiñe de verde debido a su bajo contenido de proteoglicanos y su composición rica en colágeno tipo I, al igual que los ligamentos y la cápsula articular, que también aparecen teñidos de verde con organización colagenosa densa.

El menisco, de naturaleza fibrocartilaginosa, presenta zonas teñidas de rojo moderado a débil, lo que sugiere una menor concentración de proteoglicanos en comparación con el cartilago articular, especialmente en las regiones periféricas, donde predominan fibras colágenas teñidas de verde. No se observan signos de inflamación, fibrosis ni degeneración en las estructuras articulares.

H-E Control 7 y 30 días 1_25X

Toda la sinovial está afectada (sin líquido sinovial). Articulación pegada con la superficie articular degenerada, mucha inflamación. El tejido articular muestra signos evidentes de inflamación y degeneración compatibles con artritis reumatoide. Se observa hiperplasia de la membrana sinovial, con proliferación de sinoviocitos y presencia de infiltrado inflamatorio denso, compuesto principalmente por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Inflamación superior. El cartilago articular muestra erosiones focales, con pérdida de condrocitos y disrupción de la matriz extracelular. Se observa pannus (tejido inflamatorio granulado) invadiendo el cartilago y extendiéndose hacia el hueso subcondral.

Tm Control 7 y 30 días 1_25X

Extensa fibrosis en la membrana sinovial y la cápsula articular, evidenciada por una intensa tinción azul del colágeno depositado de forma anómala. El cartilago articular aparece desorganizado, con pérdida de matriz extracelular y erosión de la superficie, lo que se traduce en una disminución del área cartilaginosa teñida.

Sf Control 7 y 30 días 1_25X

Disminución significativa o ausencia de tinción roja en grandes áreas del cartílago articular, indicando una pérdida marcada de proteoglicanos, uno de los principales signos de degradación cartilaginosa. Degeneración articular

H-E MSC 1 dosis 30d 1_25X

Se observa una disminución moderada del infiltrado inflamatorio, con menor proliferación sinovial y menos invasión del cartílago por pannus. Algunas áreas del cartílago permanecen erosionadas, pero se conservan sectores con condrocitos viables. La arquitectura ósea subcondral está parcialmente preservada.

TM MSC 1 dosis 30d 1_25X

La fibrosis disminuye parcialmente, con menor intensidad de colágeno teñido de azul en el sinovio. Hay mayor integridad en el cartílago, aunque persisten erosiones focales. El colágeno está mejor organizado, especialmente en la cápsula articular y ligamentos.

Sf MSC 1 dosis 30d 1_25X

Se observa una recuperación parcial de la tinción roja, especialmente en zonas profundas del cartílago, indicando un inicio de regeneración de proteoglicanos. El menisco muestra regiones con ligera recuperación, aunque hay áreas todavía dañadas.

H-E MSC 2 dosis 30d 1_25X

Se evidencia una mejoría marcada: la membrana sinovial tiene un grosor cercano al normal, con un infiltrado celular mucho más leve. El cartílago articular está mejor conservado, con mayor número de condrocitos y menos erosión. Prácticamente no se observa pannus, y el hueso subcondral conserva su estructura trabecular. La arquitectura general es más similar a la de una articulación sana.

TM MSC 2 dosis 30d 1_25X

La tinción evidencia una reducción significativa del depósito fibroso, con estructura casi normal de cápsula y sinovio. El cartílago articular presenta matriz homogénea y continua, con menor destrucción colágena. El colágeno aparece organizado, y los tejidos periarticulares recuperan su arquitectura típica.

Sf MSC 2 dosis 30d 1_25X

La Safranina tiñe de rojo intenso gran parte del cartílago articular, lo que sugiere una regeneración significativa de la matriz rica en proteoglicanos. El cartílago recupera su grosor, continuidad y tinción uniforme. El menisco también muestra restauración evidente, con menor contenido fibroso (verde) y más contenido cartilaginoso funcional.

H-E Exosomas 1 dosis 30d 1_25X

La inflamación se reduce visiblemente. La membrana sinovial presenta menor grosor y un infiltrado inflamatorio más leve. El pannus está presente en menor grado, y se observa recuperación parcial del cartílago articular, con condrocitos viables y menos zonas erosionadas.

TM Exosomas 1 dosis 30d 1_25X

Hay disminución notable de la fibrosis, con una mejor organización del colágeno. El cartílago presenta menos daño, y se observa una estructura más homogénea en matriz y tejidos circundantes.

Sf Exosomas 1 dosis 30d 1_25X

Aparece tinción roja moderada en zonas profundas del cartílago articular, reflejando una recuperación funcional parcial de la matriz. El menisco también muestra tinción roja focal. Aún hay sectores con daño, pero la restauración es clara.

H-E Exosomas 2 dosis 30d 1_25X

Se aprecia una mejoría clara y superior: el cartílago está casi intacto, con condrocitos bien distribuidos. El pannus desaparece prácticamente por completo y el infiltrado es escaso. El sinovio se muestra con un grosor normal o casi normal. La articulación recupera buena parte de su arquitectura original.

TM Exosomas 2 dosis 30d 1_25X

El depósito colágeno patológico es mínimo. El cartílago y los tejidos conectivos recuperan su morfología típica, con fibras colágenas bien organizadas. La tinción azul se restringe a zonas estructuralmente normales. Prácticamente no hay signos de fibrosis activa.

Sf Exosomas 2 dosis 30d 1_25X

El cartílago articular se tiñe de rojo intenso y continuo, evidenciando una regeneración marcada de proteoglicanos. El menisco también recupera su coloración característica. La estructura cartilaginosa se aproxima a la de una articulación sana, sin invasión de pannus ni pérdida de matriz.

Conclusión:

El tratamiento con exosomas de células mesenquimales (Eso) muestra un efecto terapéutico superior al tratamiento con MSCs en la artritis reumatoide experimental. A dos dosis, los Exo promueven una restauración estructural y funcional más eficaz del cartílago y disminuyen notablemente la inflamación, fibrosis y degradación de la matriz extracelular.