

Departamento de Biología Celular e Histología

Facultad de Medicina y Odontología

TESIS DOCTORAL

**Investigación pre-clínica *in vitro* en terapias biológicas
aplicadas a patología tendinosa**

Autora:

Eva Rubio Azpeitia

Directora:

Dra. Isabel Andía Ortiz

Investigador Principal Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Sanitaria
BioCruces/Hospital Universitario Cruces

2016

LISTA DE ARTÍCULOS

Esta Tesis Doctoral está basada en los siguientes trabajos experimentales, citados en el texto mediante números romanos:

- I. Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. **Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes.** Clin Orthop Relat Res. 2015 May;473(5):1624-34. doi: 10.1007/s11999-015-4179-z. PubMed PMID: 25670657; PubMed Central PMCID: PMC4385357
- II. Rubio-Azpeitia E, Sánchez P, Delgado D, Andia I. **Three-Dimensional Platelet-Rich Plasma Hydrogel Model to Study Early Tendon Healing.** Cells Tissues Organs. 2015; 200(6):394-404. doi: 10.1159/000441053. Epub 2015 Nov 13. PubMed. PMID: 26562323.
- III. Rubio-Azpeitia E, Bilbao AM, Sánchez P, Delgado D, Andia I. **The Properties of 3 Different Plasma Formulations and Their Effects on Tendinopathic Cells.** Am J Sports Med. 2016 Aug;44(8):1952-61. pii: 0363546516643814. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27161868.
- IV. Rubio-Azpeitia E, Sánchez P, Delgado D, Andia I. **Adult Cells Combined with Platelet-rich Plasma for Tendon Healing: Cell Sources Options.** Journal of Orthopaedic Research. In press. 2016

OTRAS PUBLICACIONES

1: Perez-Zabala E, Basterretxea A, Larrazabal A, Perez-Del-Pecho K, Rubio-Azpeitia E, Andia I. **Biological approach for the management of non-healing diabetic foot ulcers.** J Tissue Viability. 2016 May;25(2):157-63. doi: 10.1016/j.jtv.2016.03.003. Epub 2016 Mar 23. PubMed PMID: 27038643.

2: Larrañaga A, Alonso-Varona A, Palomares T, Rubio-Azpeitia E, Aldazabal P, Martin FJ, Sarasua JR. **Effect of bioactive glass particles on osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on lactide and caprolactone based scaffolds.** J Biomed Mater Res A. 2015 Dec;103(12):3815-24. doi: 10.1002/jbm.a.35525. Epub 2015 Jul 1. PubMed PMID: 26074489.

3: Andia I, Rubio-Azpeitia E. **Angiogenic and innate immune responses triggered by PRP in tendon cells are not modified by hyperuricemia.** Muscles Ligaments Tendons J. 2014 Nov 17;4(3):292-7. eCollection 2014 Jul. PubMed PMID: 25489545; PubMed Central PMCID: PMC4241418.

4: Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. **Hyperuricemic PRP in tendon cells.** Biomed Res Int. 2014;926481. doi: 10.1155/2014/926481. Epub 2014 Sep 8. PubMed PMID: 25276832; PubMed Central PMCID: PMC4170825.

5: Rubio-Azpeitia E, Andia I. **Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience.** Muscles Ligaments Tendons J. 2014 May 8;4(1):52-62. eCollection 2014 Jan. Review. PubMed PMID: 24932448; PubMed Central PMCID: PMC4049651.

7: Figueiredo AG, Figueiredo AR, Alonso-Varona A, Fernandes SC, Palomares T, Rubio-Azpeitia E, Barros-Timmons A, Silvestre AJ, Pascoal Neto C, Freire CS. **Biocompatible bacterial cellulose-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films.** Biomed Res Int. 2013;2013:698141. doi: 10.1155/2013/698141. Epub 2013 Sep 15. PubMed PMID: 24093101; PubMed Central PMCID: PMC3777182

Capítulos de libro:

1: Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. **Potential Links Between Tendon Pathology and Platelet Rich Plasma Biology**. Book Chapter. Platelet Rich Plasma in Musculoskeletal Practice. Springer-Verlag 2016. DOI: 10.1007/978-1-4471-7271-0_10.

2: Andia I, Rubio-Azpeitia E, Martin JJ, Abate M. **Current Concepts and Translational Uses of Platelet Rich Plasma Biotechnology**. Book Chapter. Biotechnology. Intech. April 2015. DOI: 10.5772/59954.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción

- Figuras:

Figura 1. Segmentos anatómicos del tendón.

Figura 2. Organización histológica del tendón observada mediante microscopía electrónica de barrido (A) y mediante microscopio óptico con tinción de Hematoxilina-Eosina.

Figura 3. (A) Dibujo esquemático de la estructura del tendón y observación microscópica de las fibras de colágeno del tendón en estado relajado (B) y cuando se aplica tensión (C).

Figura 4. Composición de la matriz extracelular del tendón dependiendo de la zona anatómica.

Figura 5. Curva típica de estrés-esfuerzo del tendón.

Figura 6. Tendón de Aquiles seccionado en un modelo ovino de lesión tendinosa. Las secciones histológicas que se observan, teñidas con hematoxilina-eosina, ilustran los distintos procesos secuenciales que se dan durante las fases de curación hasta la reparación del tejido.

Figura 7. Dibujo esquemático de la situación de las distintas poblaciones de células residentes en el tendón.

Figura 8. Vascularización del tendón en desarrollo (A), el tendón sano (B) y patológico (C).

Figura 9. Duración de los procesos secuenciales de reparación en tendón.

Figura 10. Entrenamientos excéntricos del tendón de Aquiles. (A) Posición inicial y (B) posición final.

Figura 11. Apariencia del tendón de Aquiles observado mediante ultrasonidos antes (A) y después (B) de un programa de ejercicio a largo plazo con entrenamientos excéntricos.

Figura 12. Utilización de los PRPs a lo largo de la historia.

Figura 13. Origen de las plaquetas a partir de células progenitoras que derivan en megacariocitos que dan lugar a las plaquetas.

Figura 14. Tipos de gránulos plaquetarios.

Figura 15. Activación de las plaquetas observada mediante microscopía de contraste de fases (A, B, C), microscopía electrónica de barrido (D, E, F) y de transmisión (G, H, I).

Figura 16. Formación del coágulo plaquetario.

Figura 18. (A) Fotografía de un gel de fibrina de PRP (barra = 5mm). (B) Estructura del gel de fibrina vista mediante microscopia de fluorescencia.

Figura 19. Efecto del pool molecular presente en el PRP durante la reparación temprana de los tendones.

- **Tablas:**

Tabla 1. Etiología de la tendinopatía: factores intrínsecos y extrínsecos.

Tabla 2. Enfermedades sistémicas que afectan a la estructura de la matriz extracelular del tendón comprometiendo su función.

Tabla 3. Sistemas comerciales disponibles para la preparación de PRPs con distintas formulaciones.

Tabla 4. Activadores e inhibidores de la angiogénesis presentes en el PRP.

Tabla 5. Estudios del efecto del PRP en células de tendón humanas *in vitro*.

Tabla 6. Estudios clínicos en epicondilitis, tendinopatía de hombro, de tendón rotuliano y de tendón de Aquiles utilizando como tratamiento distintos tipos de terapias celulares.

Materiales y Métodos

Tabla 7. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los cebadores utilizados para las PCRs cuantitativas realizadas para los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

Resultados

Artículo I

- **Figuras**

Figura 20. Expresión génica relativa, obtenida tras el tratamiento con PRP de las células de tendón durante 72 horas, calculada con respecto a los valores obtenidos con el tratamiento con IL-1 β , de proteínas relacionadas con la matriz extracelular (A, B) (*COL1A1*, *COL3A1*, *HAS2*, *ADAMTS4*, *MMP1*, *MMP3*, *TIMP1*) y de moduladores de la inflamación (C, D) (*IL1 β* , *IL1 β R*, *IL6*, *IL6r*, *IL8*, *TGF β* , *COX2*).

Figura 21. Secreción relativa de moléculas inflamatorias y angiogénicas (IL-6, IL-8, GRO- α , MCP-1, HGF, VEGF, PGE2, GAG, RANTES) por células de tendón tras el tratamiento con PRP durante 72 h, comparadas con las medidas de concentración obtenidas tras la exposición a 1ng/ml de IL1- β .

Figura 22. Morfología celular observada al microscopio de contraste de fases, de células derivadas de tendones sanos (A, B, C) y derivadas de tendones tendinopáticos (D, E, F) tras 30h de cultivo con privación de suero (A, D), tras 48h de tratamiento con 1ng/ml de IL1- β (B, E) y tras 72 horas de tratamiento con PRP (C, F).

Figura 23. Comparación de la secreción de las interleucinas moduladoras de la inflamación IL-6, IL-8 y MCP-1 entre células sanas y tendinopáticas inflamadas tratadas con PRP.

Figura 24. Comparación de la secreción de los mediadores de la respuesta inmune GRO- α y RANTES, además de la cantidad total de GAGs por células sanas y células tendinopáticas.

Figura 25. Comparación de la secreción de los factores HGF y VEGF, además del enzima mediador de la inflamación PGE2, por células sanas y células tendinopáticas.

Artículo II

- Figuras

Figura 26. Fotografía macroscópica del modelo de cultivo en 2D (parte superior de la imagen) con DMEM F12 y PRP con heparina, y en 3D (parte inferior) con DMEM F12 y PRP sin heparina.

Figura 27. Colonización del gel de PRP por las células de tendón. Seguimiento mediante microscopía de contraste de fases durante 24 horas a 10x aumentos.

Figura 28. Aspecto del cultivo tras 4 días suplementado con 10% de PRP líquido (A y B) y en hidrogel de 10% de PRP (C, D).

Figura 29. Expresión génica de los genes marcadores de tendón *TNMD*, *SCX* y *MKX*.

Figura 30. Expresión génica de las moléculas de matriz extracelular *COL1A1*, *COL3A1*, *FN* (A), *ACAN*, *VCAN*, *DCN* y *HAS2* (B) expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Figura 31. Expresión génica de *FMOD* y *COMP* en células en cultivos en 2D (blanco) y en 3D (gris) expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Figura 32. Expresión génica de las integrinas *ITGA2*, *ITGA5*, *ITGA11* e *ITGB11* expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión

constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Figura 33 a y b. Array de proteínas en soporte de cristal. a) Imágenes representativas de los arrays de proteínas en medio de células de tendón cultivadas en 3D (izquierda) y en 2D (derecha). Debajo, mapa del posicionamiento de cada proteína en el array. b) Detección semi-cuantitativa de la cantidad de cada proteína expresada mediante intensidad de la fluorescencia detectada en el array.

Figura 34. Secreción proteica en mg/ml, normalizada mediante la cuantificación indirecta de la cantidad celular con XTT, de las citoquinas IL-6, IL-8, MCP-1 y el factor de crecimiento VEGF. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

- **Tablas:**

Tabla 8. Media \pm error estándar de la expresión génica de marcadores de tendón expresada como $2^{-\Delta Ct}$, calculada en relación a los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*.

Artículo III

- **Figuras**

Figura 35. Gráficas representativas de la migración de células tendinopáticas hacia gradientes de PPP (A: PPP/DMEM), de PRP (B: PRP/DMEM) y L-PRP (C: L-PRP/DMEM) y de un control negativo (D: DMEM/DMEM).

Figura 36. Gráfica que muestra el movimiento de las células hacia un gradiente de PPP (A) y hacia un gradiente de PPP suplementado con 10ng/ml de SDF-1 α (B).

Figura 37. (A-C) Fotografías realizadas mediante microscopio de contraste de fases. Células embebidas en hidrogel en 3D de PPP (A), de PRP (B) y L-PRP (C). D: Gráfica que muestra la proliferación celular a 96 horas.

Figura 38. Expresión génica relativa a la media de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*, expresada como $2^{-\Delta Ct}$, de los genes *COL1A1*, *COL3A1* (A) y *MMP1* (B).

Figura 40. Expresión génica relativa de *ADAMTS4* y *ADAMTS5*, con respecto a la media de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*, expresada como $2^{-\Delta Ct}$.

Figura 41. Patrones de secreción de proteínas inflamatorias. (A) MCP-1 y RANTES, (B) IL-6 e IL-8, (C) VEGF y (D) CTGF.

- **Tablas:**

Tabla 9. Contenido en plaquetas, leucocitos y eritrocitos de cada formulación de plasma expresados en media \pm desviación estándar.

Tabla 10. Parámetros que describen el movimiento celular desde 0 a 24 horas.

Artículo IV

- Figuras:

Figura 42. Expresión génica relativa de los genes *COL1A1* (A), *COL2A1*, *ACAN*, *Sox-9* (B), *Scx*, *TNMD* (C), *TGF β 1* y *COX-2* (D). Fotografías de las células de tendón (E), BM-MSCs (F) y fibroblastos de piel (G) a los 15 días de cultivo en hidrogeles de PRP, a 10 aumentos obtenidas mediante una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases.

Figura 43. Secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1, en cultivos en hidrogeles de PRP en 3D durante 15 días, producida por las células de tendón, las BM-MSCs y los fibroblastos de piel expresada en ng/ml.

Figura 44. Gráficas representativas de la migración de las células de tendón (A), de las BM-MSCs (B) y de los fibroblastos de piel (C) hacia el medio condicionado (MC).

Figura 45. Expresión génica relativa de células de tendón (A, B), BM-MSCs (D, E) y fibroblastos de piel (G, H) cultivados en hidrogeles suplementados con MC, de los genes *COL1A1*, *COL2A1*, *COL3A1*, *ACAN*, *DCN*, *TNMD*, *Scx*, *Sox-9*, *TGF β 1* y *COX-2*, *IL-33*, *HGF* e *IGF*. Fotografías de las células de tendón (C), BM-MSCs (F) y fibroblastos de piel (I) a los 15 días de cultivo en hidrogeles de PRP suplementados con MC.

Figura 46. Secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1, en cultivos en hidrogeles de PRP en 3D suplementados con un 50% de MC durante 15 días, producida por las células de tendón, las BM-MSCs y los fibroblastos de piel expresada en ng/ml.

- Tablas:

Tabla 11. Expresión génica relativa en células de tendón, BM-MSCs y fibroblastos de moléculas relacionadas con la matriz extracelular en tejido musculo-esquelético.

Tabla 12. Tiempos de duplicación (en horas) de las poblaciones de células de tendón, BM-MSCs y de fibroblastos de piel expuestos a PRP, MC y DMEM sin suplementar.

Tabla 13. Parámetros que describen el movimiento celular hacia un gradiente de un compuesto quimiotáctico, en este caso el medio condicionado de células de tendón (+/-). Se muestran también los controles positivo (+/+) y negativo (-/-).

ABREVIATURAS

Abreviaturas utilizadas en el Artículo I

<i>ADAMTS4</i>	Gen de desintegrina y metaloproteasa con motivos trombospondina 4
<i>COL1A1</i>	Gen del colágeno 1 hélice alfa 1
<i>COL3A1</i>	Gen del colágeno 3 hélice alfa 1
<i>COX2</i>	Gen de la ciclooxigenasa 2
GAGs	Glicosaminoglicanos
<i>GAPDH</i>	Gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GRO- α	Proteína alfa regulada por crecimiento (proteína)
<i>HAS2</i>	Gen de la ácido hialurónico sintasa 2
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (proteína)
<i>IL1β</i>	Gen de la interleucina 1 beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta (proteína)
<i>IL6</i>	Gen de la interleucina 6
IL-6	Interleucina-6 (proteína)
<i>IL6R</i>	Gen del receptor soluble de la interleucina 6
<i>IL8</i>	Gen de la interleucina 8
IL-8	Interleucina-8 (proteína)
MCP-1	Proteína quimiotáctica para monocitos-1 (proteína)
MEC	Matriz extracelular
<i>MMP1</i>	Gen de la matriz metaloproteasa 1
<i>MMP3</i>	Gen de la matriz metaloproteasa 3
PGE-2	Prostaglandina-E2 (proteína)
PRP	Plasma rico en plaquetas
RANTES	Regulada por activación, expresada y secretada por células T (proteína)
<i>TBP</i>	Gen de la proteína de unión a caja TATA
<i>TGFβ</i>	Gen de factor de crecimiento transformante beta
<i>TIMP1</i>	Gen del inhibidor tisular de metaloproteasas
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial (proteína)

Abreviaturas utilizadas en el Artículo II

2D	2 dimensiones
3D	3 dimensiones
<i>ACAN</i>	Gen del agrecano
<i>COL1A1</i>	Gen del colágeno 1 hélice alfa 1
<i>COL3A1</i>	Gen del colágeno 3 hélice alfa 1
<i>COMP</i>	Gen de la proteína de la matriz oligomérica de cartílago
<i>DCN</i>	Gen de la decorina
DMEM	Medio de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
<i>FMOD</i>	Gen de la fibromodulina
<i>FN</i>	Gen de la fibronectina
<i>GAPDH</i>	Gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<i>HAS2</i>	Gen de la ácido hialurónico sintasa 2
IL-6	Interleucina 6 (proteína)
IL-8	Interleucina 8 (proteína)
MCP-1	Proteína quimiotáctica para monocitos 1 (proteína)
RANTES	Regulada por Regulada por activación, expresada secretada por células T (prot.)
GRO	Proteína alfa regulada por crecimiento (proteína)
<i>ITGA</i>	Gen de la subunidad alfa de las integrinas
<i>ITGB</i>	Gen de la subunidad beta de las integrinas
MEC	Matriz extracelular

<i>MKX</i>	Gen de la Mohawk homeobox
<i>PRP</i>	Plasma rico en plaquetas
<i>SCX</i>	Gen del factor de transcripción scleraxis
<i>TBP</i>	Gen de la proteína de unión a caja TATA
<i>TNMD</i>	Gen de la tenomodulina
<i>VCAN</i>	Gen del versicano
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento vascular endotelial (proteína)

Abreviaturas utilizadas en el Artículo III

<i>ACAN</i>	Gen del agrecano
<i>ADAMTS-4</i>	Gen de desintegrina y metaloproteasa con motivos trombospondina 4
<i>ADAMTS-5</i>	Gen de desintegrina y metaloproteasa con motivos trombospondina 5
<i>COL1A1</i>	Gen del colágeno 1 hélice alfa 1
<i>COL3A1</i>	Gen del colágeno 3 hélice alfa 1
<i>DCN</i>	Gen de la decorina
<i>DMEM</i>	Medio de cultivo “Dulbecco’s modified Eagle Medium”
<i>FN</i>	Gen de la fibronectina
<i>GAPDH</i>	Gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<i>IL-1β</i>	Interleucina 1 beta (proteína)
<i>IL-6</i>	Interleucina 6 (proteína)
<i>IL-8</i>	Interleucina 8 (proteína)
<i>MCP-1</i>	Proteína quimiotáctica para monocitos 1 (proteína)
<i>RANTES</i>	Regulada por Regulada por activación, expresada secretada por células T (prot.)
<i>CTGF</i>	Factor de crecimiento de tejido conectivo (proteína)
<i>L-PRP</i>	Plasma rico en plaquetas y leucocitos
<i>MMP-1</i>	Gen de la matriz metaloproteasa 1
<i>MMP-3</i>	Gen de la matriz metaloproteasa 3
<i>PPP</i>	Plasma pobre en plaquetas
<i>PRP</i>	Plasma rico en plaquetas
<i>TBP</i>	Gen de la proteína de unión a caja TATA
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento vascular endotelial (proteína)

Abreviaturas utilizadas en el Artículo IV

<i>ACAN</i>	Gen del agrecano
<i>BM-MSCs</i>	Células mesenquimales derivadas de médula ósea
<i>COL1A1</i>	Gen del colágeno 1 hélice alfa 1
<i>COL2A1</i>	Gen del colágeno 2 hélice alfa 1
<i>COL3A1</i>	Gen del colágeno 3 hélice alfa 1
<i>COX2</i>	Gen de la ciclooxigenasa 2
<i>DCN</i>	Gen de la decorina
<i>DMEM</i>	Medio de cultivo “Dulbecco’s modified Eagle Medium”
<i>GAPDH</i>	Gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<i>HGF</i>	Gen del factor de crecimiento de hepatocitos
<i>IGF1</i>	Gen del factor de crecimiento insulínico tipo 1
<i>IL33</i>	Gen de la interleucina 33
<i>IL-6</i>	Interleucina 6 (proteína)
<i>MC</i>	Medio Condicionado de células de tendón (cultivo 96 horas en 3D hidrogel de PRP)
<i>PRP</i>	Plasma rico en plaquetas
<i>Scx</i>	Gen del factor de transcripción Scleraxis
<i>Sox9</i>	Gen del factor de transcripción Sox-9

<i>TBP</i>	Gen de la proteína de unión a caja TATA
<i>TGFβ</i>	Gen del factor de crecimiento transformante beta
<i>TNMD</i>	Gen de tenomodulina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL TENDÓN NORMAL: Función, estructura, y propiedades mecánicas

1.1.1 Función

Los tendones son una parte esencial del aparato locomotor que se compone de tejido conectivo fibroso cuya función principal es unir los músculos a los huesos transmitiendo las cargas tensiles, permitiendo así el movimiento o el mantenimiento de la postura corporal. En la unidad de movimiento básica, un músculo tiene dos tendones, uno proximal y otro distal. Los tendones poseen tres zonas específicas en toda su longitud: el punto de unión músculo-tendón, que se denomina unión miotendinosa (UMT), la zona media o cuerpo del tendón, y la unión del tendón al hueso que recibe el nombre de unión oseotendinosa (UOT) o entesis, y que puede presentar una zona de transición de fibrocartílago.



Figura 1. Segmentos anatómicos del tendón: Unión miotendinosa (tendón-músculo), cuerpo del tendón y entesis (unión tendón-hueso).

A nivel histológico, los tendones son tejidos escasamente vascularizados, con baja celularidad y actividad metabólica, y una matriz extracelular abundante, lo que provoca que su recambio fisiológico sea muy escaso. La matriz extracelular (MEC) de los tendones está compuesta de fibras de colágeno bien alineadas y una fracción de elastina, embebidos en una matriz hidratada de proteoglicanos. El papel principal de las fibras de colágeno es el de resistir a la tensión, mientras los proteoglicanos son responsables de las propiedades visco elásticas del tendón.

La unidad estructural más pequeña es la fibrilla de colágeno (Fig. 2 y 3) Cada fibrilla está compuesta de moléculas solubles de procolágeno que forman uniones cruzadas entre ellas para crear moléculas insolubles de tropocolágeno o microfibrillas, que van agregando para formar fibrillas y finalmente fibras de colágeno. Estas fibras se unen en paquetes o fascículos que, a su vez, se unen por capas finas de tejido conectivo llamadas epi- y endo-tendón que llevan en su interior los vasos sanguíneos, los nervios y los vasos

linfáticos, y permiten el deslizamiento de los haces de fibras entre ellos con una mínima fricción. Todos ellos están rodeados por otra fina capa de tejido conectivo llamado para-tendón (que es la vaina sinovial en ciertos lugares). El epi-tendón y para-tendón forman el llamado peri-tendón que reduce la fricción con los tejidos adyacentes ayudado por una molécula lubricante llamada lubricina. Toda esta estructura tridimensional jerárquica entre las fibras permite el alineado de los haces de fibras a lo largo del eje del tendón, lo que dota al tendón de resistencia a fuerzas tensiles de alta intensidad y previene los daños y la separación de las fibras tras el estrés mecánico. Esta estructura de las fibras aparece al microscopio en histología como un patrón ondulado o “crimp pattern” claramente distinguible (1, 2, 3).

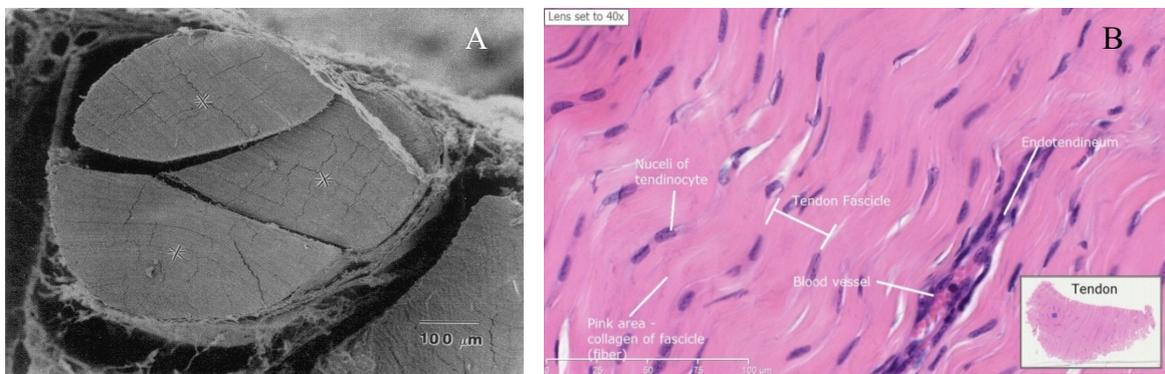


Figura 2. Organización histológica del tendón. (A) sección histológica de tendón observada mediante microscopía electrónica de barrido en la que se observan los fascículos formados por las fibras de colágeno (1). (B) Sección histológica de tendón teñida mediante tinción de hematoxilina Eosina observada al microscopio óptico. En ella se observan las fibras de colágeno y los fascículos en color rosa claro, así como los tenocitos o células de tendón y los vasos sanguíneos formados por células endoteliales en color morado (1).

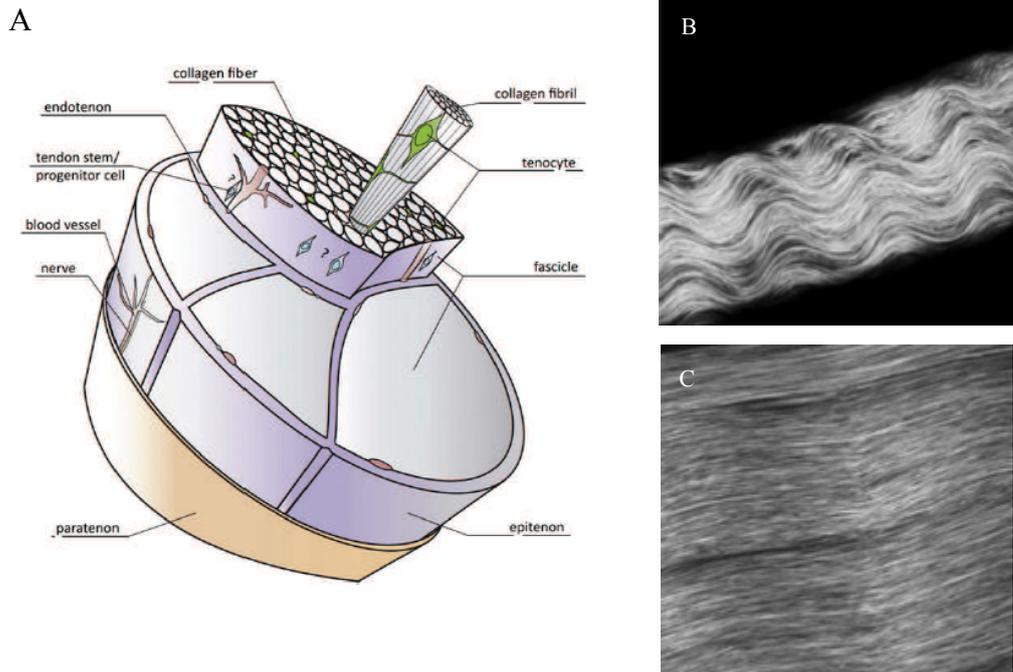


Figura 3. (A) Dibujo esquemático de la estructura del tendón (2). Las moléculas de colágeno están organizadas jerárquicamente en fibrillas, fibras y fascículos. Las células principales son los tenocitos, pero también se han detectado células progenitoras o precursoras de tendón. Se pueden observar las distintas capas que rodean al tendón como el endo-tendón, el para-tendón y el epi-tendón, así como los nervios y los vasos sanguíneos. (B) y (C), observación microscópica de las fibras de colágeno del tendón en estado relajado (B) y cuando se aplica tensión (C) (4).

1.1.2 Estructura

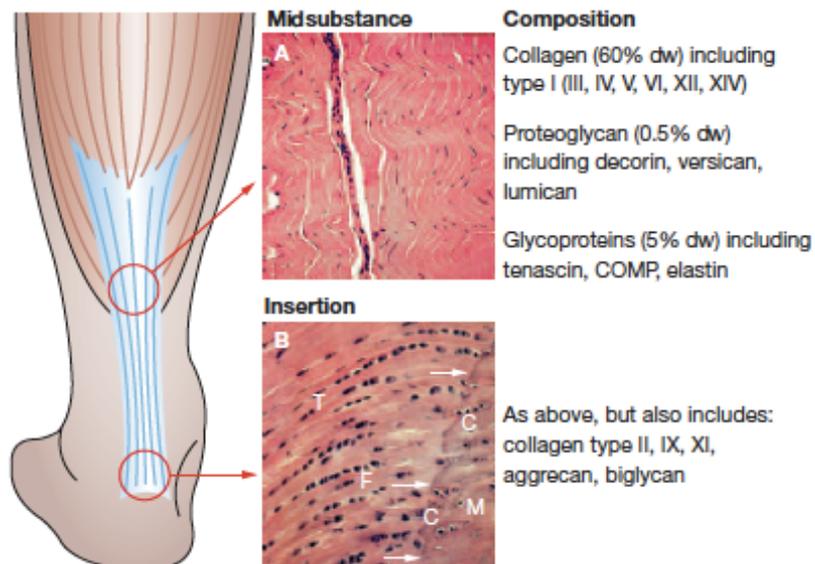


Figura 4. Composición de la matriz extracelular del tendón dependiendo de la zona anatómica. En la zona media predominan los colágenos de tipo I y III, por el contrario en

la entesis aparece colágeno II y componentes de la matriz extracelular asociados al cartílago (5) .

El tendón está compuesto de colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas, agua y células. El componente más abundante es el colágeno, especialmente el colágeno tipo I, que constituye el 60% de la materia seca del tendón y el 95% del colágeno total (6). El 5% restante se compone de colágeno tipo III y V. El colágeno tipo III forma fibrillas más pequeñas y menos organizadas, que pueden tener como resultado una disminución en la resistencia a fuerzas mecánicas, por lo que es importante que se mantenga el equilibrio colágeno I / colágeno III. El colágeno tipo V se intercala entre las fibrillas de colágeno I y regula el crecimiento de dichas fibras. (7). Otros colágenos minoritarios, como los del tipo II, VI, IX, X y XI también están presentes en los tendones (Fig. 4). Además de las fibras de colágeno, la MEC del tendón está compuesta por otros componentes, como las fibras elásticas, que otorgan flexibilidad, extensibilidad y elasticidad, permitiendo que los tendones sean deformables en un gran rango y después puedan recuperar su forma de reposo sin la necesidad de aporte energético. También se cree que están involucradas en la recuperación del patrón ondulado o “crimp pattern” tras el estiramiento de las fibras. La sustancia básica del tendón también comprende al hialuronano y a proteoglicanos y glicoproteínas como agregano, decorina, Fibronectina, fibromodulina, tenomodulina y otros componentes minoritarios. El agregano retiene el agua en el fibrocartílago y, así, participa en la resistencia a la compresión. La decorina se localiza en la superficie de las zonas medias de las fibras de colágeno y se cree que facilita el desplazamiento de las fibras durante la deformación mecánica además de participar en el ensamblaje de las fibras de colágeno junto a la fibromodulina y otras proteínas. La fibronectina se localiza sobre las fibrillas de colágeno y participa en la interacción de las células con la MEC. El contenido en proteoglicanos y glicoproteínas depende de la naturaleza del tendón, de la exposición a las fuerzas mecánicas y del tipo de fuerzas que se ejercen sobre él (compresión vs tensión por ejemplo) (8, 9). La naturaleza altamente viscosa y hidrofílica de la sustancia base del tendón provee de espacio y soporte a las fibras de colágeno. El agua compone el 60-80% de la masa total del tendón, mientras que los proteoglicanos componen el 1-2%.

A nivel celular, los tendones son tejidos muy acelulares, es decir, con baja densidad celular. Aproximadamente el 90-95% del contenido celular comprende unas células específicas de tendón descritas como fibroblastos de tendón o tenocitos. Además, se

encuentran las células sinoviales de los tejidos conectivos de capas externas, las células condroides de los lugares de inserción con fibrocartílago y las células endoteliales vasculares. Los tenocitos tienen capacidad de sintetizar todos los componentes de la MEC y se ha observado un aumento de su actividad metabólica y de síntesis de colágeno en respuesta a estímulos mecánicos. En 2007, Bi et al. (10) identificaron en tendones isquiotibiales las llamadas células madre o progenitoras de tendón, tanto en las capas externas como en el propio tendón, con capacidad de diferenciación a tres linajes y marcadores propios de tendón, pero su función y naturaleza exacta no ha sido totalmente esclarecida y sigue siendo objeto de estudio.

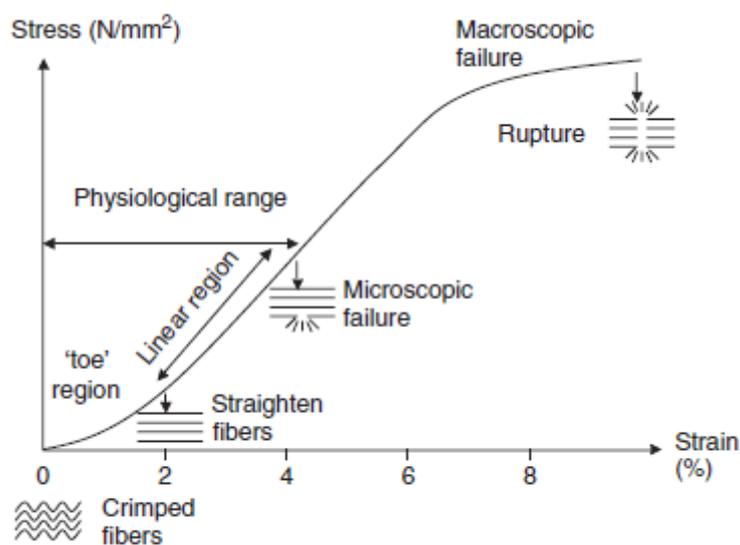


Figura 5. Curva típica de estrés-esfuerzo del tendón (11). Cuando se aplica tensión a un tendón, las fibras curvas se estiran causando una deformación elástica en una región lineal dentro de las condiciones fisiológicas. Mayores niveles de tensión resultan en microrroturas primero y en roturas completas más tarde. Dependiendo de la localización anatómica de cada tendón la resistencia a la tensión es diferente.

1.1.3 Propiedades mecánicas

Los tendones están sometidos a fuerzas mecánicas dinámicas, por lo que presentan patrones de sus fibras y propiedades visco-elásticas características. Dichas características se representan típicamente mediante una curva de estrés-esfuerzo (stress-strain) (Fig. 5). La zona inicial o “toe región” representa el momento de estiramiento del “crimp pattern”, o sea el 2% de la capacidad de estiramiento del tendón en el que las fibras se estiran y se alinean. Este patrón es variable dependiendo del tipo de tendón y su longitud varía, modificando así las propiedades mecánicas de cada tendón. En la zona lineal de la curva,

en la que las fibras se estiran menos de un 4%, las fibras pierden el “crimp pattern” y es la zona en la que la pendiente de la recta se corresponde con el módulo de Young que define la relación entre fuerza por unidad de área y deformación del tendón. Si el tendón se estira más de un 4%, se comienzan a producir micro roturas de las fibras. Más allá de un 8-10% de tensión, se produce un fallo a nivel macroscópico y un estiramiento mayor de un 10% produce la ruptura mecánica del tendón. Estos valores son ligeramente variables dependiendo del tipo de tendón y de otros factores como la edad y el sexo del paciente (12).

1.2 EL TENDÓN PATOLÓGICO

El término tendinopatía se refiere, hoy en día, a una patología crónica degenerativa que afecta al tendón y se manifiesta clínicamente con dolor e incapacidad funcional. Se han sustituido los términos tendinitis y tendinosis por tendinopatía, ya que este término no hace conjeturas sobre la patología subyacente que provoca dicha tendinopatía. Así, el término tendinopatía se ha propuesto para el diagnóstico de un tendón que presenta dolor, acompañado de una disminución de su función y en ocasiones de hinchazón.

1.2.1 Histopatología

Los tendones tendinopáticos presentan cambios notables a nivel microscópico fácilmente observables en biopsias comparado con los tendones sanos. Las fibras de colágeno se desorganizan, se separan y desempaquetan, pierden su orientación paralela, y se observa una disminución tanto en la cantidad total de colágeno como en el diámetro de las fibras. En las zonas con micro roturas de las fibras, se observa presencia de eritrocitos, fibrina y fibronectina. También se observa un aumento de colágeno tipo III en detrimento del colágeno tipo I, asociado comúnmente con mecanismos de reparación. Además, la cantidad de sustancia base mucosa del tendón aumenta, con mayor concentraciones de proteoglicanos, observables mediante tinciones específicas. La cantidad de células también aumenta, observándose hiper celularidad, y el metabolismo de los tenocitos aumenta, por lo que su forma parece cambiada, mas redondeada y con núcleos más activos, perdiéndose la forma de huso. De acuerdo con esta mayor actividad en los núcleos, se ha observado un aumento de la expresión de genes de colágeno I y III en muestras de tendón tendinopático comparadas con tendón sano, así como un aumento de expresión de metaloproteinasas (MMPs) y ciertas citoquinas pro-inflamatorias, todo ello como respuesta del tejido a la lesión. Finalmente, se observa un claro aumento de la

vascularización que también concuerda con un aumento del metabolismo del tejido. Ocasionalmente se pueden observar calcificaciones, fibrocartilago o metaplasias óseas (13, 14).

En los tendones que han sufrido una rotura repentina, se observan similares cambios histopatológicos pero no se observa hiper celularidad, sino aumento de la apoptosis y necrosis y tampoco se observa aumento significativo de la vascularización (14, 15).

1.2.2 Epidemiología y principales tendinopatías

Las lesiones de tendón pueden afectar a personas de todas las edades y comprometer su calidad de vida y actividad física, tanto en el ámbito laboral como deportivo. La incidencia exacta de las tendinopatías en la población general es difícil de determinar, pero se ha estimado que aproximadamente un 30% de las consultas médicas relacionadas con dolor en el aparato locomotor están relacionadas con lesiones en los tendones (16). La AAOS (*American Association of Orthopaedic Surgeons*) estima que casi 2 millones de personas consultaron a su médico por dolor en el manguito rotador en 2008. Dependiendo de la edad, el sexo y la actividad física, ya sea relacionada con el trabajo o con el deporte, la prevalencia varía mucho. Además, debido a que hay grandes diferencias culturales relacionadas con la práctica del deporte entre cada país, es difícil realizar un estudio epidemiológico a nivel internacional relativo a la tendinopatía, por lo cual, se deberían realizar a nivel de cada país para desarrollar planes de prevención adaptados a la necesidad de cada uno. Los tendones más susceptibles de desarrollar tendinopatías son el tendón de Aquiles, y el rotuliano, en miembro inferior. En miembro superior, los tendones relacionados con la epicondilitis o codo de tenista y la epicondilitis medial o codo de golfista y los tendones del manguito rotador del hombro son los más comúnmente afectados (17).

- Tendinopatía del tendón de Aquiles

La tendinopatía de tendón de Aquiles es la de mayor prevalencia del miembro inferior. Está muy relacionada con la práctica de deporte, con una frecuencia del 5.9% en personas sedentarias y de un 50% en deportistas de resistencia de élite (18,19). La causa aceptada como más común en tendinopatía de Aquiles es la sobrecarga excesiva y repetitiva (20) y los deportes más relacionados con ella son los que implican correr y saltar (frecuencia del 53% dentro de un grupo de deportistas profesionales (21). Los trastornos más comunes del Aquiles son las tendinopatías de zona media (55-65%), seguidos de

problemas en la inserción (20-25%). Parece que los hombres tienen más frecuentemente lesiones en el Aquiles que las mujeres (89%), pero esto puede ser debido a las diferencias en la práctica de deporte entre ambos sexos. También parece que su prevalencia aumenta con la edad en atletas (21).

- Tendinopatías de rodilla

Aproximadamente un tercio de las patologías tratadas en deportistas implican a la rodilla, de ellas, un cuarto se diagnostica como una tendinopatía. En Europa, las mayores incidencias de tendinopatía de rodilla relacionadas con el deporte se dan en fútbol (21%), carreras de larga distancia (13%), voleibol (12%), carreras de orientación (8%) y hockey sobre hielo (7%). La patología más común es la tendinopatía de sobrecarga del tendón rotuliano o rodilla de saltador, con una incidencia de un 7 - 40% (19) seguida de la enfermedad de Osgood-Schlatter, de la tenosinovitis del tendón de la corva y del síndrome de la banda iliotibial.

- Epicondilitis lateral o codo de tenista

El codo de tenista es muy común en deportistas y trabajadores de todas las edades que tengan actividad física que implique movimientos de elevación o repetitivos del codo, (22) y se caracteriza por dolor en la cara externa del codo, en la región del epicóndilo provocada por micro roturas originadas por sobrecarga de los tendones que se insertan en el epicóndilo. Los tendones implicados pueden ser cualquiera de los tendones extensores que se insertan en el epicóndilo, pero el más comúnmente implicado es el tendón del músculo extensor radial corto del carpo (18). Hasta un 40% de los tenistas sufren este tipo de patología y un 1-3% de la población general también la padece. La incidencia de esta patología también aumenta con la edad, siendo 2 – 3.5 veces más alta en pacientes mayores de 40 años, así como con el índice de masa corporal, también se relaciona con un historial de síndrome de túnel carpiano y con posiciones difíciles, exigentes y repetitivas de las articulaciones relacionadas.

- Epicondilitis medial o codo de golfista

La epitrocleitis ó codo de golfista es menos común que la afección anteriormente descrita y se caracteriza por la presencia de dolor en la cara interna del codo, más concretamente en la inserción del músculo flexor-pronador en el epicóndilo del húmero, también provocado por micro roturas producidas por sobrecarga repetitiva. Se presenta muy habitualmente en jugadores de béisbol, en golfistas y en lanzadores de jabalina (17) y se suele deber a una sobrecarga en los músculos del antebrazo, la muñeca y los flexores de los dedos.

- Tendinopatía de manguito rotador del hombro

El manguito rotador sostiene la cabeza del húmero en la escápula y se compone de los tendones que insertan cuatro músculos: el supra espinoso, el infra espinoso, el redondo menor y el subescapular. En patología de manguito rotador, el tendón más comúnmente afectado es el del musculo supra espinoso. La sobrecarga de este grupo de tendones suele deberse a movimientos repetitivos del hombro sobre la cabeza como en deportes que implican lanzamientos (jabalina, béisbol, tenis, voleibol...) y en natación; y representa el 18% de las patologías relacionadas con sobrecargas en atletas adultos (23). También se asocia con determinados trabajos que exigen movimientos repetitivos. Esta patología también puede deberse a desgarros provocados por el levantamiento repentino de peso o por el desgaste a lo largo del tiempo. Se ha asociado también con el aumento del IMC y con la edad (18).

1.2.3 Etiología

Las tendinopatías pueden tener varias causas que se clasifican como intrínsecas y extrínsecas (Tabla 1) (24) pero su etiología suele ser multifactorial, involucrando diversos factores que actúan de forma combinada para producir la patología.

El factor extrínseco reconocido como más común para desarrollar una tendinopatía es la sobrecarga o la carga anormal repetitiva del tendón, que causa micro roturas, lo cual provoca, progresivamente, daños en la matriz extracelular y supera la capacidad de las células residentes de reparar los defectos estructurales, por lo que se produce una tendinopatía que puede, con el tiempo, degenerar en la ruptura del tendón. Por ello, la patología del tendón se asocia tanto a factores mecánicos como a la capacidad de respuesta de las células del tejido ante la degradación de la matriz.

Los factores extrínsecos e intrínsecos más comunes están resumidos en la siguiente tabla:

Factores Intrínsecos	Factores Extrínsecos
Edad	Trabajo
Género	
Perfusión vascular	Deporte
Estatus nutricional	Sobrecarga física
Variantes anatómicas	Errores en el entrenamiento
- Alineación errónea (pronación excesiva, anteversión del cuello del fémur, genu valgo)	- Fuerza excesiva
- Desequilibrio y debilidad muscular	- Distancia
Discrepancia en la longitud de las extremidades	- Intensidad elevada
- Laxitud de las articulaciones	- Carga repetitiva
Índice de masa corporal	- Técnica inadecuada y fatiga
Enfermedades sistémicas	Equipamiento y calzado
- Enfermedades endocrinas y metabólicas	Condiciones ambientales
- Enfermedades reumatológicas	Superficies de entrenamiento
- Enfermedades genéticas hereditarias	Inmovilización
Uso de fármacos (corticoides, anticonceptivos, fluoroquinolonas)	

Tabla 1. Etiología de la tendinopatía. Factores intrínsecos y extrínsecos que pueden provocar y/o ayudar al desarrollo de tendinopatías.

- Factores Intrínsecos

La edad afecta a la matriz extracelular del tendón porque se ha observado que a lo largo del tiempo disminuye progresivamente la elasticidad y la fuerza de tensión, debido al aumento de la cantidad y la estabilidad del colágeno tipo I y la disminución de la cantidad de proteoglicanos; así como de la vascularización y de la tasa metabólica de los fibroblastos de tendón. Estos cambios, además del hecho de que a lo largo tiempo se suman las micro roturas debidas a sobrecargas, hace que la edad sea considerada como un factor que puede facilitar la aparición de tendinopatías.

La mayoría de lesiones en tendones se produce en hombres pero se ha especulado que esto se produce porque las mujeres, históricamente, han realizado menos actividad deportiva y por ello en los datos históricos recogidos relativos a tendinopatías siempre hay una prevalencia menor en mujeres. Aun así, en la última década, se han recogido cada

vez más datos de mujeres en los estudios epidemiológicos de tendinopatías (25) y puede que las estadísticas cambien en futuros estudios.

Aun así, se ha asociado la menopausia sin terapia hormonal se ha asociado con una disminución del colágeno I que provoca una disminución en el ratio colágeno I / colágeno III que puede comprometer la fuerza de tracción del tendón (26).

Estas diferencias entre los dos géneros también se ha estudiado si puede ser debido al estatus hormonal distinto en mujeres y hombres, lo que puede afectar a la estructura de la MEC y el metabolismo de tenocitos. *In vitro*, se ha visto que los estrógenos y la progesterona aumentan la expresión génica de proteoglicanos en tenocitos (27). Además, se ha observado que la deficiencia de estrógenos afecta al metabolismo de los tendones disminuyendo la proliferación, incrementando la apoptosis, y alterando la composición de la MEC (28). *In vivo*, algunos investigadores han observado que los estrógenos no modifican la rigidez de los tendones (29) pero por otro lado se los ha asociado con un aumento del número de fibrillas y con un descenso del diámetro de los tendones (30-31). En mujeres, se ha observado que los tendones tienen menor capacidad de respuesta a la carga y tienen menor resistencia a fuerzas mecánicas (32) pero esta propiedad puede ser modificada gracias al entrenamiento a pesar de que la capacidad de adaptación a la sobrecarga parece estar atenuada en mujeres.

El nivel de andrógenos (28) también afecta al metabolismo y la respuesta de los tendones a las cargas mecánicas. *In vitro*, se ha observado que la administración de andrógenos disminuye la expresión de MMPs, lo que puede afectar a los procesos de curación y remodelación de la matriz tras una lesión. Además, aumenta las tasas de proliferación y produce des-diferenciación celular. *In vivo*, se ha observado que la administración de testosterona puede alterar las propiedades biomecánicas de los tendones, reducir sus propiedades elásticas, conducir a la disfunción y a la fibrosis y con ello a un aumento de las rupturas espontáneas.

Aunque los tendones sanos estén poco vascularizados, requieren aporte sanguíneo para el mantenimiento del metabolismo de las células y, con él de la MEC del tejido. Muchas lesiones se han asociado a una perfusión vascular disminuida, especialmente en tendones como el Aquiles y el supra espinoso (24). Se ha observado que un estatus angiogénico anormal puede provocar que un tendón sufra una tendinopatía degenerativa, ya que un flujo sanguíneo reducido puede provocar una hipoxia tisular, debida a la deficiencia en el transporte de oxígeno necesario para contrarrestar los efectos de las sobrecargas, y provocar así un déficit en la capacidad de las células para responder ante una lesión y por

lo tanto, que dicha lesión progrese (33). Esta disminución del aporte sanguíneo se puede deber a diversas causas, incluyendo la edad, las enfermedades vasculares, el descuido físico o a las lesiones. En contraposición, uno de los síntomas más comunes de las tendinopatías es la observación de un aumento significativo de la vascularización y de la celularidad del tejido pero, esta última condición, puede ser una respuesta a la lesión inicial provocada por la vascularización disminuida.

Las variantes anatómicas congénitas y la laxitud articular pueden someter a los tendones a cargas anormalmente distribuidas. Dichas cargas, debidas a alineación errónea de las extremidades, a desequilibrio o debilidad muscular, a discrepancias en la longitud de las extremidades u otras malformaciones genéticas provocan desgaste en ciertas zonas de los tendones que pueden degenerar en una tendinopatía. Así mismo, un índice de masa corporal elevado causado por modos de vida sedentarios puede causar sobrecarga en los tendones que también degeneren en una tendinopatía con el tiempo.

Se ha asociado a diversas enfermedades sistémicas con defectos en la síntesis, el metabolismo y la estructura de la matriz extracelular que comprometen las propiedades mecánicas de los tendones (24). Algunas de las enfermedades sistémicas que se ha observado que afectan a los tendones están resumidas en la tabla:

Enfermedad	Defecto estructural y efecto en el tendón
<i>Enfermedades endocrinas y metabólicas</i>	
Diabetes mellitus	Aumento de glicosilación y entrecruzamiento del colágeno
Desórdenes de las glándulas adrenales	Alteración del metabolismo del colágeno
Trastornos tiroideos	Calcificación y aumento de depósitos
Enfermedades renales	Aumento de la elasticidad y destrucción de las fibras
Obesidad e hipercolesterolemia	Aumento de mediadores pro inflamatorios
<i>Enfermedades reumatológicas</i>	
Artritis reumatoide	Destrucción del colágeno
Espondilo artropatía	Inflamación de la inserción, fibrosis y calcificación
Artritis reactiva	Inflamación de la inserción
Gota	Depósitos de cristales de urato e inflamación
Pseudogota	Depósitos de pirofosfato de calcio e inflamación
<i>Desordenes genéticos hereditarios</i>	
Hemocromatosis	Acumulación de hierro en la matriz
Ehlers-Danlos	Defectos en el procesamiento del colágeno
Mucopolisacaridosis	Fibrillas de colágeno anormales, aumento de GAGs
Osteogénesis imperfecta	Defectos genéticos en el colágeno tipo I
Miopatías y Distrofias	Estructura anormal en las fibrillas de colágeno
Enfermedades por almacenamiento de lípidos	Depósitos de lípidos

Tabla 2. Enfermedades sistémicas que afectan a la estructura de la matriz extracelular del tendón comprometiendo su función.

Se ha observado que las enfermedades que afectan al sistema endocrino producen cambios a nivel sistémico que pueden afectar a los tendones. La diabetes mellitus ha sido asociada con un incremento de la susceptibilidad a la tendinopatía y la prevalencia de enfermedades reumatológicas asociadas a dicha enfermedad es alta (34). Esto se debe, entre otras, a modificaciones del colágeno debido a enlaces cruzados entre las fibras, mediados por productos de la glicación avanzada (PGAs), lo que provoca alteraciones en las propiedades mecánicas del colágeno, en la organización y en la microestructura de las fibrillas. Observada con microscopía electrónica, la MEC de pacientes diabéticos presenta fibrillas de colágeno torcidas, curvadas, solapadas y altamente desorganizadas (34). Además, se ha observado *in vitro* que los PGAs afectan también a los propios tenocitos, aumentando la apoptosis vía especies reactivas de oxígeno (ROS), a enzimas y a otras proteínas de la matriz extracelular (MEC), lo que provoca una disminución de la capacidad de respuesta del tejido (34). En pacientes con diabetes se producen alteraciones en la proliferación, la diferenciación, los procesos inflamatorios y el estatus angiogénico, produciéndose un aumento de VEGF y una desregulación de mediadores inflamatorios y de elementos de la MEC (28). Además, se ha observado que los PGAs regulan a la alza el gen del factor de crecimiento conectivo (CTGF) en fibroblastos, lo que puede favorecer la formación de fibrosis a lo largo del tiempo en pacientes diabéticos (35). *In vivo*, los tendones de pacientes diabéticos tienen una resistencia y una elasticidad disminuida, además de un aumento de la aparición de calcificaciones, comparados con los de pacientes sanos por lo que las lesiones son más frecuentes en este tipo de pacientes y su recuperación se ve afectada por la alteración en el microambiente del tejido producida por dicha enfermedad.

Otras enfermedades relacionadas con alteraciones hormonales han sido asociadas con una mayor susceptibilidad de sufrir tendinopatías. *In vitro*, se ha observado que las hormonas tiroideas T3 y T4 promueven la proliferación y disminuyen la apoptosis en tenocitos humanos sanos. Además, aumentan la síntesis de colágeno tipo I mientras el colágeno tipo III no se ve afectado, y otras proteínas fibrilares como la proteína oligomérica del cartílago (COMP) o biglican aumentan en presencia de dichas hormonas (36). Con todo esto, se ha comprobado que las hormonas tiroideas afectan al metabolismo de los tenocitos y a la composición de la MEC, por lo que un déficit de dichas hormonas afecta

negativamente al tendón y su estructura. El hipotiroidismo se ha asociado directamente con patologías del aparato musculo esquelético incluyendo las tendinopatías ya que *in vivo* se han observado mayor número de tendones con calcificaciones en pacientes con dicha patología (36). Las enfermedades renales, acompañadas de sus subsecuentes tratamientos también se han asociado a rupturas espontáneas de tendón (28).

Las alteraciones en los niveles de hormonas sexuales, como se ha mencionado anteriormente, también pueden afectar al metabolismo y, con ello, a la estructura y resistencia de los tendones.

La hipercolesterolemia también se asocia a la aparición de tendinopatía por deposición de lípidos en la matriz de los tendones (34). Los niveles elevados de colesterol y la obesidad se han asociado con un estatus “sub” inflamatorio crónico que se observa por la presencia de mediadores inflamatorios (TNF, IL-6, MCP-1) en el plasma de pacientes con hipercolesterolemia. Dicha inflamación puede ser negativa para el mantenimiento y la curación de tendones, además de verse expuestos a sobrecargas constantes debido al sobrepeso. En ratas, se ha observado que los tendones de animales a los que se les induce hipercolesterolemia presentan una rigidez disminuida tras la curación de una lesión, pero a nivel histológico, no se observan diferencias en la organización de la matriz o en la celularidad del tejido (37). Los mecanismos exactos por los cuales la hipercolesterolemia no familiar afecta a los tendones no se conocen en profundidad por lo es necesaria una investigación en mayor profundidad. En ocasiones se pueden observar, cuando hay degradación del colágeno tipo I, una sustitución de dicho colágeno por células con depósitos lipídicos (tendolipomatosis) (13). En pacientes con hipercolesterolemia familiar hay una alta prevalencia de tendinopatías de Aquiles y en fases avanzadas se observan xantomas en fases avanzadas de la tendinopatía.

Las enfermedades reumatológicas abarcan un gran número de enfermedades que afecta al tejido conectivo, cuya etiología no es muy conocida, y que afectan al sistema musculo esquelético. Debido a que estas enfermedades conllevan una alteración inflamatoria de la capsula y el líquido sinovial, los tendones se ven afectados por dicha inflamación produciéndose destrucción del colágeno, fibrosis y calcificaciones. La gota es una enfermedad reumatológica muy prevalente en la que aumentan los niveles de ácido úrico en sangre, y se acumulan cristales de urato mono sódico (MSU) en las articulaciones, lo que provoca artritis y, con ella, afectación de los tendones de dicha articulación. En muestras de pacientes con gota se ha observado que hay infiltración de cristales de MSU dentro del propio tendón y en las zonas adyacentes y la entesis. Dichos cristales reducen

la viabilidad de los tenocitos *in vitro* y disminuyen la producción de colágenos y proteínas de la ECM por parte de dichas células (38). Además, el ácido úrico se ha identificado como un estresor presente cuando se produce muerte celular, que provoca que las células inmunes produzcan mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β . Con todo ello, la gota produce una inflamación en el tendón que afecta a los tenocitos y a su capacidad de respuesta ante una lesión.

Muchos desórdenes genéticos hereditarios afectan a las células y la matriz de los tendones. Por ejemplo, la hemocromatosis, enfermedad que afecta al metabolismo del hierro, que provoca acumulación de derivados férricos en las articulaciones produciendo artropatías e inflamación crónica en ciertas articulaciones y, por extensión, en los tendones. Otro ejemplo es la enfermedad Ehlers-Danlos, que se caracteriza por la hiperlaxitud de las articulaciones y que está producida por alteraciones genéticas en el gen del colágeno de tipo I y V y produce defectos en el procesamiento y la estructura del colágeno, y con ellos, en la estructura del tendón comprometiendo su rigidez y aumentando su elasticidad. Otras enfermedades congénitas que afectan a los tendones son las mucopolisacaridosis que se caracterizan por deficiencias en los enzimas implicados en la síntesis y en el procesamiento de los GAGs, provocando síntesis de fibrillas de colágeno anormales y aumento de dichos GAGs, por lo que disminuye la rigidez de las fibras del tendón. La osteogénesis imperfecta se caracteriza por una deficiencia en la producción de colágeno tipo I por defectos genéticos en el gen que lo codifica, esto implica defectos estructurales graves en los huesos, los tendones y aquellos tejidos cuyo soporte es el colágeno de tipo I. Las miopatías y las distrofias musculares, enfermedades que comprometen la integridad y la función musculares, también se ha visto que afectan a los tendones porque se observa estructura anormal en las fibrillas de colágeno. Por último, las enfermedades por almacenamiento de lípidos o lipidosis, en las que el metabolismo de lípido es defectuoso, producen depósitos de lípidos en distintos tejidos del cuerpo, uno de ellos el tendón, predisponiéndolo a las rupturas espontáneas (24, 34). El uso de fármacos que actúan a nivel sistémico como los corticosteroides se ha asociado a debilidad en tendones, en especial en tendón de Aquiles (39). En un estudio reciente (40) se ha observado que la administración sistémica de glucocorticoides produce, a nivel histológico, una disminución del colágeno total y una modificación de la estructura de las fibras con menores diámetros lo que produce una disminución de la fuerza de los tendones, sin involucrar a una patología subyacente. También se ha reportado una asociación entre la tendinopatía de Aquiles con el uso de anticonceptivos orales y

sustitutivos hormonales (13, 34, 40) apoyando la teoría de que producen efectos a nivel sistémico y circulatorio. La utilización de los antibióticos fluoroquinolonas ha sido ampliamente reportada, tanto *in vitro*, con un aumento de MMPs y marcadores apoptóticos en tenocitos, como en pacientes en los que se observa un aumento del riesgo de sufrir una tendinopatía con el uso sistémico de fluoroquinolonas, variándose los resultados dependiendo del tipo de fluoroquinolona utilizado (13, 41).

- Factores Extrínsecos

El factor más común para producir una tendinopatía es un factor, de los denominados extrínsecos, que es la carga anormal y repetitiva del tendón (28). Dicha carga anormal puede ver potenciado su efecto por cualquiera de los factores intrínsecos anteriormente mencionados. Se ha probado que el deporte favorece la síntesis y la renovación de las fibras pero los tendones pero hay un umbral en el que deja de ser favorecedor para producir micro-roturas de dichas fibras por sobrecarga. Pero la línea que separa el deporte sano con aquél que no lo es, es muy fina (13). La sobrecarga de los tendones se suele producir por movimientos repetitivos relacionados con el trabajo o el deporte que producen excesivas fuerzas sobre las fibras y se producen micro-roturas que pueden degenerar en tendinopatías. Además, en los entrenamientos deportivos, se pueden producir tendinopatías por cambios en el patrón de entrenamiento, el empleo de una mala técnica, por intensidades demasiado elevadas, lesiones previas, y por factores ambientales como el entrenamiento en terrenos duros, inclinados o resbaladizos. Además la utilización de material y calzado inadecuado puede provocar movimientos extraños y cargas anormales (13, 28).

Hoy en día, la tendinopatía es considerada una patología multifactorial, cuyo punto de partida son las interacciones entre las sobrecargas, los factores intrínsecos y las condiciones mecánicas ambientales desfavorables. En base a estos preceptos, la patogénesis de la tendinopatía puede ser considerada como un proceso de tres estadios consecutivos: la lesión, la curación fallida, y la presentación clínica (42). En el primer estadio, el de la lesión, el dolor y la debilidad mecánica del tendón son casi imperceptibles y el tejido puede curarse con sus propios mecanismos espontáneos. En el segundo estadio, si las condiciones de reposo y prevención de mayor sobrecarga que permiten la recuperación no son satisfechas, las herramientas de curación del tendón se ven afectadas y divergen hacia mecanismos anormales probablemente debido a un ambiente mecánico desfavorable y a perturbaciones de las respuestas inflamatorias locales. Dado que el proceso de curación de las lesiones en tendón involucra diversos eventos secuenciales,

las perturbaciones pueden ocurrir a diversos niveles de dicho proceso de curación, pero las causas por las que se producen todavía no son bien conocidas. Este es el estadio en el que se pueden observar cambios histopatológicos aunque los pacientes suelen seguir asintomáticos. En esta fase se produce una elevada producción de factores pro-inflamatorios como citoquinas, VEGF y ROS que provocan la degradación del tendón. Finalmente, en el último estadio, cuando la neo vascularización llega a un determinado umbral, es cuando los tendones se vuelven dolorosos, y se manifiestan síntomas clínicos. El origen del dolor en tendinopatía es un tema objeto de debate entre los clínicos e investigadores, ya que no se han observado, en tendones tendinopáticos, los signos clásicos de inflamación. Se ha propuesto que el dolor puede ser fruto de una combinación de factores mecánicos y bioquímicos. En tendones tendinopáticos crónicos con aparición de dolor, se ha observado crecimiento de fibras nerviosas acompañando a nuevos vasos sanguíneos (13), orientados hacia el interior del tendón desde las capas para-tendinosas, lo cual favorece la hipótesis de que la neo-vascularización se asocia con la sintomatología clínica, particularmente con el dolor. También se ha observado un cambio en el fenotipo de las células nerviosas peritendinosas con regulación a la alza del sistema glutamatérgico en pacientes con tendinopatías dolorosas (28) y un aumento de los niveles del neurotransmisor glutamato en el interior de tendones dolorosos en comparación a tendones sanos. Por todo ello, la aparición clínica de dolor parece ser fruto, tanto de la proliferación de fibras nerviosas como de la presencia de sustancias algogénas en una concentración que debe llegar a un determinado umbral y que pueden dañar a su vez al tendón (13).

En resumen, la tendinopatía se considera una patología multifactorial aunque el papel de cada factor, ya sea extrínseco o intrínseco, todavía no es bien conocido. La patogénesis de la tendinopatía se produce como eventos secuenciales desde las condiciones fisiológicas hasta presentación clínica, es decir, la aparición de dolor. Estos eventos se presentan con una separación clara: las fases asintomáticas y sintomáticas cuya duración depende de muchos factores dependiendo de las condiciones cada paciente. Un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos y de curación podrá ayudar a mejorar los tratamientos y personalizar tratamientos para las necesidades de cada paciente.

1.3 PROCESOS DE REPARACIÓN Y REGENERACIÓN EN EL TENDÓN NORMAL

El tendón posee una capacidad intrínseca limitada de renovación del tejido y por tanto de respuesta ante una lesión, debido a que es un tejido con baja vascularización y celularidad. La patogénesis de la tendinopatía y los mecanismos de reparación asociados no están bien estudiados y su conocimiento es limitado, lo que impide optimizar el desarrollo de tratamientos para cada paciente y condición. La mejor manera de intentar optimizar la reparación tisular en un tendón lesionado es comprender los mecanismos moleculares asociados y sus alteraciones en condiciones patológicas, lo que permitirá un abordaje terapéutico más concreto y dirigido a las necesidades de la lesión.

Los mecanismos generales de reparación de un tejido pueden describirse como fases secuenciales que se superponen cuya duración depende de la severidad y la localización de la lesión (2, 12) (Fig. 6). Estas fases se pueden caracterizar por la señalización celular presente en cada una de ellas, que depende de la presencia y actividad de los tipos celulares involucrados en el proceso de regeneración tisular. Esta señalización celular se compone de una innumerable cantidad de citoquinas, factores de crecimiento y otras moléculas, producidas por las células presentes en el tejido o por la propia lesión en primera instancia, que actúan de manera paracrina, autocrina, endocrina e intracrina para regular tanto la activación como la función celular, provocando la respuesta necesaria en cada fase. La naturaleza dinámica, tanto espacial como temporal de estos mecanismos representa un desafío a la hora de tratar de identificar tanto moléculas como células, e incluso etapas críticas involucradas en la patología tendinosa.

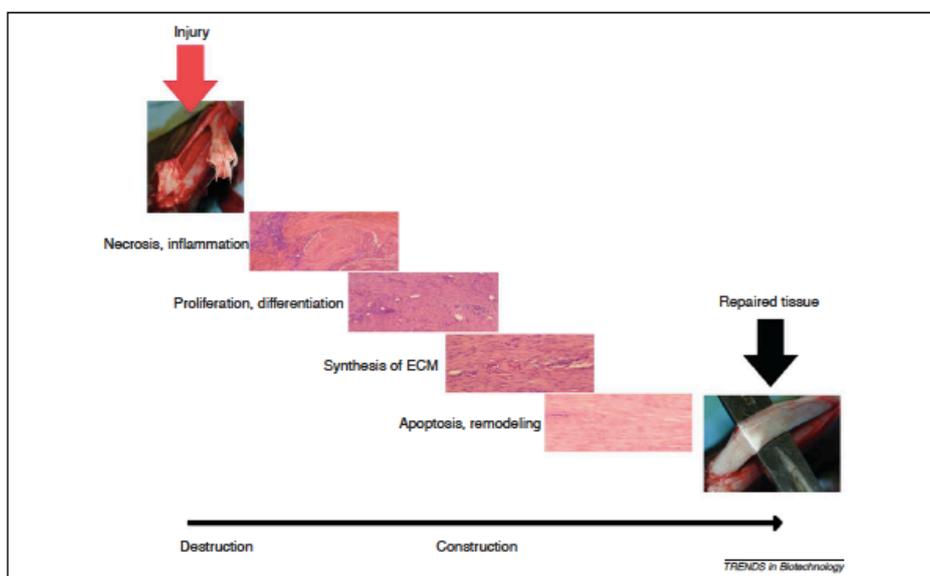


Figura 6. Tendón de Aquiles seccionado en un modelo ovino de lesión tendinosa (43). Las secciones histológicas que se observan, teñidas con hematoxilina-eosina, ilustran los distintos procesos secuenciales que se dan durante las fases de curación hasta la reparación del tejido.

1.3.1 Fase inflamatoria aguda inicial

Cuando un tendón sufre una lesión, las células mueren por apoptosis o necrosis y la matriz extracelular resulta dañada, lo cual provoca la liberación de unas determinadas moléculas intracelulares llamadas DAMPs (Patrones Moleculares de Activación de Peligro). La cantidad de dichas moléculas en el tejido circundante es proporcional al daño sufrido por el tejido, y provoca la respuesta inflamatoria inicial necesaria dependiendo de la naturaleza y el tamaño de la lesión. Las DAMPs incluyen a moléculas del citoplasma como ADN, ARN, ATP, alarminas como S100, HMGB1 (“High mobility group 1”) y otras moléculas como el ácido úrico. En el caso de la renovación tisular normal, cuando las células mueren no se desencadenan respuestas inflamatorias porque dichas moléculas no alcanzan un nivel umbral crítico. El estado inflamatorio inicial provocado por las DAMPs es un mecanismo evolutivo conservado presente en vertebrados e invertebrados. Además de la liberación de las DAMPs, inmediatamente después de la lesión, se forma un hematoma que contiene plaquetas activadas y leucocitos imbuidos que, junto con el propio tendón y los tejidos circundantes, liberan interleucinas y factores de crecimiento como TNF- α , IL1- β , VEGF, PDGF, FGF, TGF- β , CTGF, EGF, IGF-1 y otros, que aportan a la respuesta inflamatoria inicial una naturaleza destructiva (44).

Todas estas señales moleculares tienen, además, un efecto quimiotáctico para los leucocitos que, ayudados por el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, migran al lugar de la lesión. Además de los leucocitos, las células polimorfonucleares (PMNCs) circulantes como los neutrófilos, los basófilos y los eosinófilos son capturados por las moléculas de adhesión (inmunoglobulinas, integrinas, selectinas...) que son presentadas en la membrana de las células endoteliales y migran al lugar de la lesión. Una migración excesiva de PMNCs puede ser perjudicial para el tejido receptor porque secretan una considerable cantidad de moléculas citotóxicas, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan daños en la estructura del tejido. Su extravasación es gradual y su tasa de infiltración máxima ocurre 24-48h tras la lesión, después declina, se detiene y las PMNCs mueren por apoptosis.

Cuando esta respuesta inicial inflamatoria está teniendo lugar (2-72h tras la lesión), los macrófagos también migran a la zona lesionada para realizar una limpieza de desechos tisulares y celulares además de contribuir a la señalización celular mediante la secreción de determinadas moléculas. Dependiendo del microambiente tisular, es decir, de las señales moleculares presentes en un determinado lugar, los macrófagos presentan plasticidad fenotípica, es decir, pueden estar polarizados hacia un fenotipo con funciones más inflamatorias y destructivas (M1) o hacia un fenotipo más “pro-regenerativo” (M2), produciéndose fenotipos intermedios dependiendo de la necesidad del tejido receptor. En este momento, los macrófagos están polarizados hacia un fenotipo funcional M1 debido a las señales moleculares presentes en el tejido. Este fenotipo tiene capacidad destructiva, biocida, e inmunogénica (45) y secreta moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , C11b/CD18, eicosanoides, hidrolasas lisosomales, ROS y otras.

Se ha demostrado que el éxito de estos estadios iniciales de la inflamación es determinante para una curación eficiente de las lesiones. Por ejemplo, se ha demostrado que en modelos animales con neutropenia, se produce una aceleración del cierre de las heridas. Además, una disminución de los macrófagos produce una regeneración tisular deficiente reduciendo la deposición de colágeno y la angiogénesis. Estudios recientes demuestran que la manipulación de la activación de los macrófagos puede ser útil para proteger los tejidos de la isquemia y promover la regeneración tisular. Pero una investigación exhaustiva de los efectos de dicha manipulación debe ser llevada a cabo debido a que es un mecanismo multi-molecular en el que la redundancia biológica está extendida, es decir, una molécula puede tener diversas funciones y muchas moléculas tener la misma función; por lo que la manipulación de dicho mecanismo puede resultar muy complicada y no tener los efectos esperados.

1.3.2 Fases de reconstrucción

- Migración celular y proliferación

Mientras la respuesta inflamatoria inicial disminuye, los macrófagos cambian su fenotipo a M2, que secreta factores de crecimiento como VEGF, FGF y PDGF además de factores pro-fibróticos como TGF- β y CTGF (3).

La migración y la proliferación son dos fases que se solapan durante los procesos de reparación tisular. La fase proliferativa comienza con la formación de una matriz de fibrina, fibronectina, glucosaminoglicanos y ácido hialurónico, que contiene el secretoma

plaquetario además de los macrófagos que secretan citoquinas como PDGF, estimulando la migración celular al lugar de la lesión. La matriz de fibrina actúa como un “andamio” provisional a donde las células migran y en el que permanecen mientras participan en el proceso de regeneración.

Las poblaciones involucradas en la reparación de las lesiones de tendón tienen un origen diverso, pueden ser de origen intrínseco y provenir del propio tejido, o extrínseco y migrar hacia la lesión desde tejidos circundantes; pero el papel de cada tipo de población celular y su contribución a la curación no ha sido bien definido.

Las células intrínsecas del tendón se han descrito como tenocitos o fibroblastos de tendón, que residen en las fibras de colágeno y migran dentro de la matriz extracelular conectando sus integrinas de membrana a secuencias de fibronectina, vitronectina y fibrina. Estos fibroblastos proliferan en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento y parece que son las células más abundantes entre el tercer y el quinto día tras la lesión. Además, secretan metaloproteasas que facilitan su movimiento y también eliminan elementos dañados de la matriz tisular. Una vez en el lugar de la lesión, los fibroblastos producen colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular.

Las poblaciones celulares de origen extrínseco se componen de células del tejido conectivo circundante presente en los fascículos tendinosos y de los vasos sanguíneos que irrigan al tendón. Estas poblaciones celulares extrínsecas incluyen fibroblastos de las capas externas del tendón y células mesenquimales de dos tipos: circulantes en el torrente sanguíneo y residentes en los nichos del propio tendón que se activan en respuesta a las señales inflamatorias que provienen de la lesión. Se cree que este tipo de células extrínsecas son las primeras en responder tras la lesión produciendo citoquinas y factores de crecimiento que activan al resto de poblaciones celulares. En cambio, los fibroblastos residentes en el tendón parece que son los responsables de la producción de colágeno tipo I y matriz extracelular (3).

Las células madre residentes en el nicho del tendón (Tendon Stem Cells) fueron descritas por primera vez por Bi *et al.* (10) en tendones isquiotibiales de ratones y humanos. Estas células presentaban los marcadores de membrana de células madre clásicos (46) así como potencial de diferenciación a distintos linajes celulares (adiposo, óseo y cartilaginosa), además de expresar genes propios de tendón como el factor de transcripción escleraxis y la glicoproteína tenomodulina. También podían ser clonadas y propagadas *in vitro* y formar tejido similar al tendón tras su trasplante *in vivo*. Hoy en día, aunque han sido caracterizadas e identificadas tanto en los fascículos (peri-tendón) como en el propio

tendón, se tiene poca información tanto sobre su función y participación en la curación como sobre su relación con los fibroblastos de tendón (46) (Fig. 7). Todas estas células residentes en el tendón han sido observadas y expandidas in vitro pero se requiere de investigación en mayor profundidad para determinar su función y su regulación exacta, es decir, su grado de participación en la curación a corto, medio o largo plazo para poder utilizarlas como dianas terapéuticas y mejorar los mecanismos de curación.

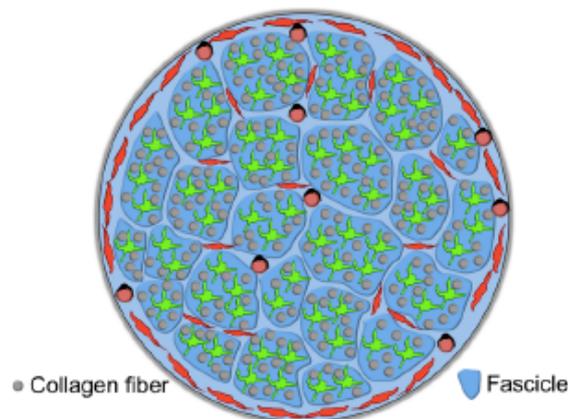


Figura 7. Dibujo esquemático de la situación de las distintas poblaciones de células residentes en el tendón (46). No se conoce con exactitud la función de cada una de ellas en los procesos de reparación. Los fibroblastos internos o tenocitos se observan en verde y se sitúan entre las fibras de colágeno. También se han observado células fibroblásticas en las capas que rodean los fascículos (endo, epi y para tendón), representadas en negro y naranja. Las células perivasculares residen en los vasos sanguíneos que irrigan a la periferia del tendón. Además, existen nichos de células precursoras de tendón cuya situación no se conoce con exactitud por lo que no están representadas en este dibujo.

- *Angiogénesis*

La formación de nuevos vasos sanguíneos, o angiogénesis, es esencial para proveer de oxígeno y nutrientes a las células involucradas en los mecanismos de curación en el tendón. Dicho proceso comienza con la activación de las células endoteliales (ECs) de los vasos sanguíneos circundantes a la lesión, en respuesta a señales moleculares pro-angiogénicas, como el VEGF producido por las células en respuesta a la hipoxia, presentes en el microambiente local. Esto provoca la expresión y síntesis de receptores de membrana en dichas células, que a su vez, producen matriz metaloproteasas (MMPs) y otras proteasas que debilitan y degradan la membrana basal endotelial y la matriz extracelular circundante. Así, las células endoteliales pueden migrar vía integrinas, proliferar y formar “brotes” que se dirigen hacia la lesión, impulsados por señales

moleculares. Otros tipos celulares como las células de músculo liso y los pericitos, células contráctiles que se envuelven alrededor de las células endoteliales de los capilares, también participan en la formación de nuevos vasos.

Una gran variedad de moléculas, tanto represoras como estimuladoras participan y regulan el proceso de angiogénesis. En tejidos sanos, mediadores solubles estimuladores como VEGF, HGF, angiopoyetinas, FGF y otras están en equilibrio con factores represores de angiogénesis como angioestatina, endostatina y trombospondina. Cuando ocurre una lesión, la propia hemorragia así como las células inmunes, endoteliales y del propio tejido producen y elevan los niveles de factores pro-angiogénicos para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, los tenocitos, en respuesta a una situación de hipoxia generada por una lesión, producen HIF (factor inducible por hipoxia), un factor de transcripción que estimula la expresión génica de VEGF y así promueve la angiogénesis, la expresión de MMPs y la inhibición de TIMPs (inhibidores tisulares de las MMPs) (47).

Los factores locales estimuladores de la angiogénesis incluyen la baja tensión de oxígeno, que regula la angiogénesis a través del factor de transcripción HIF; el pH bajo, los niveles altos de lactato y otros. Estos elementos reguladores tienen distintas funciones y concentración dependiendo de la etapa del progreso de angiogénesis. Por ejemplo, se ha visto que VEGF-A actúa en fase temprana, a través de los receptores VEGFR1 y 2, que se expresan en el tejido justo después de que ocurra la lesión. Otros factores, como el TGF- β , el PDGF-BB y la angiopoyetina, actúan más tarde para ayudar a la estabilización de los vasos.

La angiogénesis es un proceso crucial para la regeneración de tendón pero es un mecanismo multi-molecular complejo que es muy difícil de manipular con fines terapéuticos. La estimulación de *VEGF* en estadios iniciales del proceso de reparación podría ser una herramienta útil para ayudar a la curación de la lesión, pero no interesa una excesiva vascularización en la fase de remodelación de la matriz extracelular por lo que se debería controlar tanto el inicio como el proceso de retracción de los vasos.

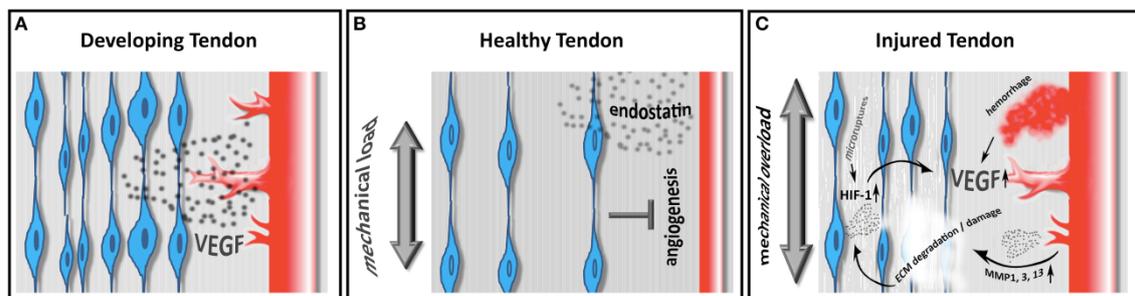


Figura 8. Vascularización del tendón en desarrollo (A), el tendón sano (B) y patológico (C) (47). Los tendones embrionarios tienen una alta densidad de células que producen VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), resultando en una respuesta pro-angiogénica y en el crecimiento de brotes desde los vasos sanguíneos. En el tendón sano, los tenocitos producen factores anti-angiogénicos como la endostatina en respuesta a los estímulos mecánicos. En el tendón patológico, los tenocitos producen factores pro-angiogénicos y matriz metaloproteasas (MMPs) que ayudan al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos necesarios para que se lleven a cabo los procesos de reparación tisular.

- Síntesis de matriz extracelular

Mientras el número de células se incrementa en la lesión debido a los procesos de migración, proliferación y angiogénesis, la producción de componentes de la matriz extracelular incrementa. Los fibroblastos de tendón y otros fibroblastos migratorios regulan a la alza la expresión génica de factores de transcripción directamente relacionados con la expresión de genes, y posterior producción, de componentes de matriz extracelular, como *SCX* (Escleraxis), *MKX* (Mohawk Homeobox), *EGR1* (Proteína de Respuesta temprana 1) y otros, que estimulan la expresión de genes como *COL1A1* (Colágeno tipo I alfa 1), *COL1A2* (Colágeno tipo I alfa 2), *COL3A1* (Colágeno tipo 3 alfa 1), y otros colágenos menos abundantes, así como otras proteínas fibrilares como *TNMD* (Tenomodulina), *DCN* (Decorina), *TNC* (Tenascina), *FN* (Fibronectina), *FMOD* (Fibromodulina) y proteoglicanos como *ACAN* (Agregano) y *VCAN* (Versicano). La activación de la expresión génica es consecuencia de la presencia de factores de crecimiento como TGF- β , PDGF, BDNF, bFGF, IGF y otros. Por ejemplo, se ha demostrado que el PDGF, factor de crecimiento quimiotáctico y mitótico para fibroblastos, induce la síntesis y producción de Colágeno tipo 1. También se ha observado que la presencia de las distintas isoformas de TGF- β condiciona el tipo de colágeno que se sintetiza, así como bloquea la producción y actividad de proteasas previniendo la degradación enzimática de la ECM (48).

La presencia y los niveles de estas moléculas reguladoras es crítica para la síntesis de la cantidad y proporciones correctas de los componentes de la matriz extracelular, que, una

vez que terminado el proceso de curación de la lesión, proveerán al tendón de sus propiedades mecánicas, necesarias para un adecuado cumplimiento de sus funciones.

- Remodelación y cicatrización

La última fase de la curación en tejidos lesionados es la remodelación y la cicatrización, que consiste en modificar y pulir la forma y tamaño del tejido cicatrizado. La acumulación de colágeno alcanza su máximo 2-3 semanas después de la lesión y la transición hacia la remodelación del tejido comienza. En esta etapa, existe un equilibrio entre la síntesis, la deposición y la degradación de proteínas de matriz, así como un descenso en la celularidad, en la actividad metabólica y en el contenido de agua del tejido. El cambio más drástico se observa en el cambio en el contenido celular y en la organización del colágeno, lo que dota al tejido de mayor fuerza y resistencia a la tensión.

Esta fase puede separarse en dos estadios: el de consolidación y el de maduración. En el primero, el tejido cambia de un tejido celular a fibrilar con un metabolismo muy activo de los tenocitos, una producción elevada de colágeno tipo 1 y una alineación de las células y las fibras de acuerdo a las fuerzas de tensión y de tracción (49). Desde las 10 semanas tras la lesión hasta 1 año aproximadamente, dependiendo de la magnitud de dicha lesión, se produce la fase de maduración en la que el tejido fibroso es remplazado por tejido tendinoso cicatrizado en el que la actividad de los tenocitos así como la vascularización están muy disminuidas. Durante estas fases, el contenido de colágeno de tipo 3 es sustituido progresivamente por colágeno 1 y la proporción colágeno1/colágeno3 (4:1) se restablece. Además, las fibras de colágeno se entrecruzan por la acción de la lisil oxidasa secretada por los fibroblastos así como por las fuerzas mecánicas ejercidas en la cicatriz. El remodelado y la cicatrización está controlado a nivel molecular por las MMPs, citoquinas y las proteínas fibrilares producidas por los tenocitos que disminuyen progresivamente su actividad metabólica mientras la cicatrización se va completando.

Todas las fases anteriormente descritas se producen debido a un mecanismo bioquímico específico para cada una de ellas con la presencia/ausencia de determinados niveles de citoquinas y mediadores moleculares. La duración de estas etapas depende de una innumerable cantidad de factores sintetizados tanto por las células como por las que se infiltran en los estadios iniciales (Fig. 9). Así, las etapas de la regeneración tisular se van sucediendo y dando paso a la siguiente de manera correcta. A pesar de estar finamente reguladas por diversos mecanismos, dichas fases pueden tener errores y producirse patologías derivadas del incorrecto funcionamiento de dichos mecanismos como la

inflamación crónica y la excesiva debilidad del tejido cicatrizado que producen un funcionamiento defectuoso del tendón e incluso una pérdida de sus funciones.

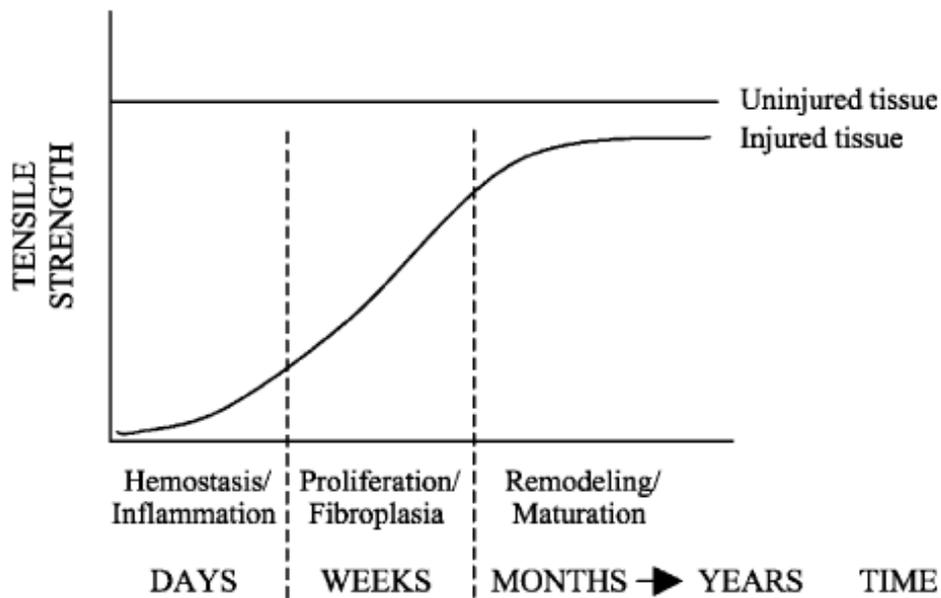


Figura 9. Duración de los procesos secuenciales de reparación en tendón (50). Los procesos iniciales de inflamación se mantienen durante días. Más tarde, la proliferación celular dura semanas y, por último, la síntesis, remodelación y maduración de la matriz dura meses, e incluso años. Estos procesos se solapan y su duración depende de cada tendón y cada paciente.

1.4. DEFICIENCIAS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN EN TENDÓN PATOLÓGICO

Hay muchos factores, que pueden ser tanto locales como sistémicos, que pueden contribuir a una curación ineficiente del tendón y a sus posteriores consecuencias. Los factores locales incluyen: una viabilidad celular reducida, el hematoma formado tras la lesión y su mala reabsorción, el aporte sanguíneo deficiente, la atrofia del tejido, las infecciones y el estrés mecánico repetitivo. Los factores sistémicos, en cambio, se refieren a la edad, la salud general del paciente y la toma de medicamentos, que pueden afectar a los mecanismos de curación de los tejidos.

Hay varias fases de la curación que pueden verse afectadas y fallar, provocando deficiencias en el nuevo tejido generado y, con ellas, tendinopatías crónicas. Se han identificado al menos cinco mecanismos que provocan una curación defectuosa y están relacionados (46): fallo en la resolución de la inflamación, estatus vascular anormal, alteraciones en la comunicación celular paracrina, disminución de la capacidad

regenerativa de las células madre y desregulación de la síntesis y remodelación de la matriz extracelular.

1.4.1 Fallo en la resolución de la inflamación

Como se ha explicado previamente, es necesaria una fase inflamatoria inicial para conseguir una curación correcta, pero la progresión y la terminación de la inflamación es un proceso crucial para evitar la tendinopatía inflamatoria crónica (51-54). En los tejidos sanos, un repertorio de proteínas y lípidos derivados de las células mieloides y estromales promueven la resolución de la inflamación pero en ciertos tendones deteriorados, la respuesta inflamatoria inicial puede mantenerse produciendo una enfermedad crónica inflamatoria del tejido (53).

Estudios con muestras de tejido tendinopático han revelado la presencia de células pro inflamatorias infiltradas en el tejido como macrófagos M1, linfocitos y células mastoides (54), además de una regulación a la alza de la expresión génica, tanto de receptores celulares para mediadores inflamatorios como de los propios mediadores, en los fibroblastos de tendón, provocando cambios en el microambiente bioquímico que pueden provocar procesos degenerativos vía daños a la matriz extracelular (52). Además, se han observado en estos tejidos degenerados niveles incrementados de mediadores pro inflamatorios como interleucina 1 beta (IL-1 β), ciclo-oxigenasas 1 y 2 (COX-1, COX-2), interleucina 6 (IL-6), isoformas del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) así como de sustancia P.

La detención de la infiltración de leucocitos y la activación de la polarización de macrófagos hacia fenotipo M2 promueve la reducción de la concentración de moléculas pro-inflamatorias y así a la recuperación de la homeostasis tisular. Algunas vías de señalización pro-inflamatorias como la del interferón gamma (IFN- γ), la del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) o la de los receptores de glucocorticoides, que han sido relacionadas con la polarización de macrófagos a fenotipo M2 están siendo estudiadas como posibles dianas terapéuticas para intentar disminuir la inflamación crónica en tendinopatía. Si se mantienen las condiciones inflamatorias, la arquitectura y composición del tendón puede verse severamente afectada, disminuyendo su resistencia y así su funcionamiento normal y aumentando su susceptibilidad a las lesiones (51).

La falta de conocimiento y caracterización precisa de las células clave que orquestan la inflamación, además del hecho de que se trata de un mecanismo sinérgico muy complejo

multicelular y multi-molecular, es un obstáculo que dificulta el desarrollo de terapias efectivas que permitan disminuir la inflamación crónica en tendinopatías.

1.4.2 Estatus vascular anormal

En tendones afectados por tendinopatías, un síntoma muy común que se observa en ecografía Doppler, es un incremento de la cantidad de vasos sanguíneos (52-54). En condiciones en las que el tejido está sano, los vasos sanguíneos crecen hacia los estímulos angiogénicos provistos por las células presentes en la lesión para proveerles de nutrientes y oxígeno para soportar su alto metabolismo y contribuir así a la curación de la lesión. Después, cuando la cantidad y actividad celular se reduce, se produce una regresión de los vasos promovida por un equilibrio entre factores pro y anti angiogénicos. Se ha postulado que el aumento de la densidad y el número de vasos sanguíneos nuevos en tendinopatía se produce acompañando a la inflamación mantenida. El hecho de que los vasos crezcan como consecuencia de la presencia de citoquinas que se producen durante la fase inflamatoria, y que las moléculas pro-angiogénicas se han propuesto como marcadores de inflamación y procesos asociados a tendinopatía es clave para relacionar ambos mecanismos. Algunas evidencias sugieren que la angiogénesis viene acompañada de neo-inervación por lo que este sistema puede provocar el dolor asociado a patologías de tendón. En tendinopatía de tendón de Aquiles, se ha observado regulación a la alza del gen de *VEGF* comparado con tendones sanos, lo cual produce un aumento de la vascularización (47) y de la expresión de *MMPs* que a su vez provoca destrucción de la matriz extracelular.

1.4.3 Alteraciones en la comunicación celular paracrina

Los distintos tipos de tejidos adyacentes presentan una comunicación molecular entre ellos, mecanismo que se denomina reciprocidad dinámica; lo que provoca que cuando el microambiente de un tejido se ve modificado, las células de tejidos adyacentes se ven afectadas por medio de señalización celular paracrina. Así, los fibroblastos de tendón se verán afectados por los acontecimientos que sucedan en las capas externas del tendón así como en la membrana sinovial, y los sucesos del tendón provocaran consecuencias a su vez en dichos tejidos. Así, la tendinopatía puede ser abordada como una enfermedad de “órgano entero”, es decir, incluyendo los tejidos circundantes al tendón, cuya afectación puede provocar fallos en el correcto funcionamiento del tendón.

1.4.4 Disminución de la capacidad regenerativa de las células madre

Las células madre progenitoras tienen un papel muy activo en la reparación tisular, ya sea migrando desde tejidos adyacentes o provenientes de los nichos del propio tendón. La activación, migración y proliferación de dichas células puede verse afectada por diversos factores, y así verse su función comprometida. Se ha observado que la edad es una de las razones principales que explican la disminución de la función de las células madre ya que, con el tiempo, se producen cambios genéticos, epigenéticos, metabólicos y proliferativos que afectan al correcto funcionamiento de estas células. Se ha determinado que, con la edad, las células madre de tendón presentan un aumento en los marcadores de senescencia, un retraso en la progresión del ciclo celular, además de una reducción de marcadores de tendón acompañada de un aumento en marcadores de células adiposas (55).

En un modelo de tendinopatía en conejos, se ha observado *in vitro* que el fenotipo destino de las células madre de tendón está alterado comparado con células obtenidas de tendones sanos, con un fenotipo menos proliferativo y con mayor tendencia a diferenciarse hacia condrocitos y osteocitos. La función de las células madre en lesiones tendinosas es un mecanismo complejo que sigue siendo objeto de estudio en investigación para, igual que con los mecanismos descritos anteriormente, utilizarlas como diana terapéutica para mejorar la capacidad intrínseca curativa del propio tendón o para atraer células madre de origen extrínseco que mejoren la calidad de la curación de la lesión.

1.4.5 Desregulación de la síntesis y remodelación de la matriz extracelular

La fibrosis se define por un crecimiento desmesurado del tejido por una alteración en la composición de la MEC provocando el endurecimiento o la aparición de una cicatriz debido a la deposición excesiva de elementos de la matriz. Se ha vinculado con procesos inflamatorios crónicos que provocan la producción de estimuladores moleculares de las células provocando una deposición anormal de componentes de la matriz y una alteración de su arquitectura. El responsable celular principal de la fibrosis es el miofibroblasto, intermedio entre los fibroblastos y las células musculares lisas, que proviene de diversos orígenes celulares (células endoteliales, células madre residentes y migratorias, fibroblastos...) y se activan mediante gran variedad de señales moleculares paracrinas. Cuando los miofibroblastos reconocen estas moléculas, migran a través de la lesión promoviendo su contracción y sintetizando elementos de la MEC.

El recambio del colágeno y el resto de componentes de la matriz se regula por la activación e inactivación de las MMPs y otras proteasas. Para un correcto proceso de curación de una lesión, se debe conseguir el equilibrio entre la degradación y la síntesis de dichos componentes. La fibrosis ocurre cuando la cantidad de colágeno de nueva síntesis excede la tasa de degradación, por lo que el contenido total aumenta a lo largo del tiempo generándose una cicatriz fibrótica. Se han identificado gran cantidad de mediadores pro-fibróticos como citoquinas (TGF- β , IL-13, IL-21, IL-6), quimiocinas (MCP-1, MIP-1 β), factores de crecimiento (VEGF, PDGF) y muchos otros. Pero estas moléculas, dependiendo de la concentración, el momento en el que se encuentren y las sinergias entre ellas, tienen también efectos beneficiosos en la curación de la lesión, lo cual hace de su posible utilización terapéutica una misión muy compleja y requiere de un conocimiento profundo de las vías en las que están involucradas.

1.5. TRATAMIENTOS PARA LAS LESIONES DEL TENDÓN

1.5.1. *Tratamientos conservadores*

Históricamente, la elección de los tratamientos para curar las tendinopatías ha ido cambiando según se iban realizando descubrimientos en la histopatología y la bioquímica de la enfermedad (23). Por un lado, los tratamientos clásicos, basados en fármacos analgésicos y anti-inflamatorios y la fisioterapia pasiva no suelen ser suficientes o aportar resultados definitivos. Por otro lado, existen tratamientos más avanzados que tienen un impacto mayor en la estructura del tendón y pueden aportar una curación definitiva. Pero, a pesar de que haya una relativa abundancia de opciones de nuevos tratamientos, pocos han pasado ensayos clínicos randomizados con control por placebo y un seguimiento a largo plazo para evaluar los resultados, lo que no permite a los facultativos realizar una elección del tratamiento sobre bases sólidas de resultados comprobados (5, 20, 33). Los tratamientos se pueden dividir en dos categorías: quirúrgicos y no quirúrgicos, y dentro de estos últimos tratamientos clásicos o convencionales y nuevas terapias o tratamientos no convencionales.

Los tratamientos convencionales se han utilizado históricamente para evitar el dolor y la inflamación, a pesar de que, en los últimos años se ha observado que lo que se presenta clínicamente como una tendinopatía aguda se debe a un fallo en los mecanismos de curación del tejido y no presenta evidencias clásicas de inflamación (20). Estos tratamientos, como el reposo relativo, el frío, los estiramientos, las rodilleras, hombreras

o coderas (ortesis), la fisioterapia y las inyecciones de corticoides se utilizan normalmente en los momentos en los que el dolor es más agudo y su eficacia a largo plazo no está bien demostrada.

- AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

El objetivo del uso de AINEs es la reducción de la inflamación a través de la inhibición de los mediadores pro-inflamatorios y su prescripción ha sido mayoritaria para el manejo de tendinopatías a lo largo de la historia reciente (23). Su utilización es controvertida tanto en la fase aguda como en la crónica ya que las evidencias de inflamación son pocas y, si la hubiera, se discute sobre si sería conveniente evitarla o el hecho de bloquear la respuesta inflamatoria inicial puede tener repercusiones negativas en los mecanismos de curación (33) posteriores. Aunque su utilización parece que sí alivia el dolor en fase aguda, no hay pruebas de que su administración evite la degradación de las fibrillas o la pérdida de fuerza tensil del tendón a largo plazo.

- Fisioterapia clásica

Hay controversia en la literatura y pocas evidencias que apoyen el uso de fisioterapia clásica en el tratamiento de tendinopatías. Dentro de los tratamientos que se engloban en esta categoría están los ultrasonidos (US), la iontoforesis combinada con AINEs, la crioterapia o el masaje profundo transversal. La utilización de estas terapias es muy frecuente dentro del ámbito clínico, pero la demostración de su efectividad en ensayos clínicos es escasa a pesar de que se han observado resultados positivos en algunas de sus aplicaciones habituales como la epicondilitis (23, 56). Una investigación en mayor profundidad sería conveniente para apoyar el mantenimiento del uso de estas terapias para el tratamiento de tendinopatías.

- Órtesis

Las órtesis engloban a los aparatos externos utilizados en ortopedia o fisioterapia como ayuda o soporte para la corrección de algún movimiento o alguna posición anormal del cuerpo además de facilitar desplazamientos y actividades de articulaciones con deficiencias o dificultades. Estos aparatos se utilizan en el tratamiento de tendinopatías pero la evaluación de su efectividad es difícil de realizar y las evidencias que apoyen su uso son escasas. Aun así, su utilización se ve reforzada por el hecho de que modifican la

fuerza del vector que se transmite a la inserción ósea reforzando los estímulos propioceptivos o corrigen un desorden estático (23, 57).

- Inyecciones de corticoides

Los corticoides o corticosteroides se utilizan muy habitualmente en el tratamiento de tendinopatías pero su uso es controvertido. A nivel molecular, su utilización podría estar justificada por sus efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores debido a que suprimen la expresión génica de genes de mediadores de la respuesta inflamatoria como citoquinas, factores pro-inflamatorios, receptores de membrana y moléculas de adhesión. Pero a pesar de su popularidad, las bases biológicas que justifican su uso y la evidencia mediante ensayos clínicos randomizados no están establecidas. En tendinopatía, los cambios en la ECM que preceden a la aparición de síntomas clínicos son, en parte, causados por dichos mediadores moleculares, lo que podría justificar su uso como tratamiento y su efectividad a corto plazo. Pero se han reportado diversos efectos adversos asociados a corticoides y los beneficios de su aplicación pueden no ser suficientes como para compensarlos. Incluso, se ha reportado que pueden comprometer la integridad del tendón habiéndose observado casos de rupturas espontáneas de tendón Aquiles tras la infiltración con corticoides (58) pero estos hallazgos no son universales y no se han observado en todos los estudios (33). Parece que estos riesgos disminuyen cuando la inyección se hace ecoguiada en el para-tendón en vez de intra-tendinosa (59).

Aunque las inyecciones de corticoides son uno de los tratamientos más utilizados para las tendinopatías, hay una escasez de ensayos clínicos bien planteados que justifiquen su uso, sus indicaciones específicas y sus efectos a largo plazo. Aun así, muchos estudios han reportado mejoras en el corto plazo (hasta las 6 semanas) pero con aparición de recidivas recurrentes a largo plazo (más de 6 meses) por lo que una política de “esperar y ver” o una terapia de AINES puede tener los mismos resultados (59).

- Entrenamientos excéntricos

Los tratamientos excéntricos se han propuesto como una terapia prometedora en el tratamiento de las tendinopatías y se han demostrado eficaces mediante ensayos clínicos en el tratamiento de diversas tendinopatías como la de Aquiles, de rotuliano y la epicondilitis (20, 59) (Fig. 10). Este tratamiento, aunque doloroso al principio, se basa en un mecanismo de mecano-transducción que hace que la carga mecánica se convierta en activación de respuestas celulares, por lo que hay un efecto progresivo en la deposición

de matriz extracelular y con él, en la estructura del tendón, que hace que se vaya fortaleciendo, tras un número determinado de sesiones. Así, este proceso aumenta el alineado, el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y la fuerza tracción de la matriz, también aumenta la actividad de las células y previene la aparición de adhesiones entre el tejido en curación y los tejidos adyacentes. Con todo ello, se favorece la curación de la tendinopatía, se previenen las recidivas y la cronicidad (60) (Fig. 11). Aunque no está demasiado clara la razón de la efectividad de esta terapia, las teorías que la explican son varias: se ha propuesto que puede ser por el efecto del estiramiento, que produce una elongación de la unidad musculo-tendón y así disminuye la carga mecánica en el tendón durante el movimiento de la articulación. También que sea debida al efecto fortalecedor de las cargas musculares repetitivas que lo hipertrofian y aumentan la fuerza tensora del tendón. También puede deberse a la disminución y modelado del flujo sanguíneo. Por último, se ha propuesto que los efectos beneficiosos del entrenamiento excéntrico se deben a las oscilaciones de alta frecuencia que se producen en las fuerzas que afectan al tendón que se originan en este tipo de ejercicios.

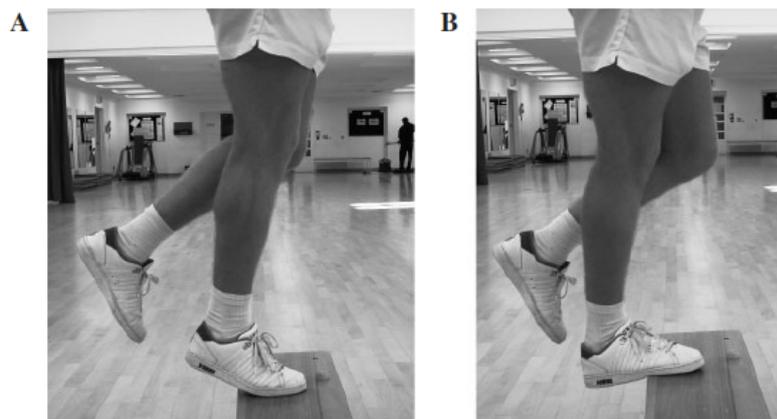


Figura 10. Entrenamientos excéntricos del tendón de Aquiles. (A) Posición inicial y (B) posición final. Tres grupos de 15 repeticiones se realizan 3 veces al día durante 12 semanas. Estos ejercicios se repiten con la rodilla flexionada para cargar el sóleo (33).

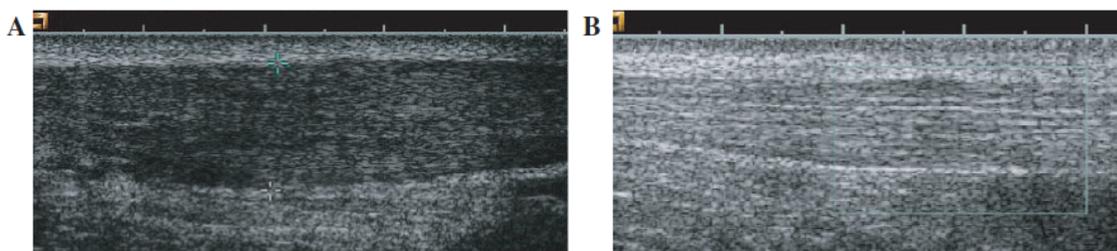


Figura 11. Apariencia del tendón de Aquiles observado mediante ultrasonidos antes (A) y después (B) de un programa de ejercicio a largo plazo con entrenamientos excéntricos

(33). Tras el entrenamiento, se observa una pérdida de hipo-ecogenicidad, típica de las lesiones, y un engrosamiento de la matriz extracelular.

En general, se han reportado siempre buenos resultados del entrenamiento excéntrico, sin haberse observado efectos adversos. Pero, a pesar de todo esto, se han obtenido diferentes resultados dependiendo de los estudios, observándose muy buenos resultados en algunos de ellos y peores en otros (61, 62). Además, se requiere de disciplina y entrega por parte del paciente, que tiene que repetir los movimientos que se le prescriben varias veces a la semana. Un reciente estudio clínico ha asociado el entrenamiento excéntrico con terapia de ondas de choque extracorpóreas obteniendo mejores resultados que con el entrenamiento excéntrico únicamente (63).

- Terapia de ondas de choque extracorpóreas

La terapia de ondas de choque extracorpóreas (ESWT) tiene como base la estimulación de la curación de tejidos blandos por activación de las células y aumento de la vascularización, y la inhibición de receptores del dolor (20), aunque el mecanismo biológico subyacente aún no está claramente establecido. En los últimos años, se han hecho muchos ensayos clínicos para evaluar la eficacia de la ESWT para tratar a pacientes con tendinopatías crónicas. Pero su comparación es difícil ya que esta terapia tiene asociadas múltiples variables como el tipo de generador de ondas, el tipo de onda, la intensidad, la frecuencia, y el protocolo de aplicación. El único factor que parece común a los estudios es que se obtienen mejores resultados cuando el paciente sufre dolor, es decir cuando se le aplican ondas de alta intensidad, mejor que las de baja intensidad, sin utilizar anestesia, ya que parece que disminuye su efectividad (64). In vitro, se ha observado que las ondas de choque aumentan la proliferación de tenocitos, la síntesis de colágeno y la inducción de mediadores moleculares como TGF- β (65), lo que, en parte, podría explicar los efectos beneficiosos a largo plazo de esta terapia. Un estudio combinando entrenamiento excéntrico y ESWT demostró que esta podría ser una terapia efectiva para tendinopatía de Aquiles (63) pero esta combinación debería ser más estudiada para poder aplicarse a otras tendinopatías.

- Terapia tópica de gliceril trinitrato

Esta terapia se basa en varios hallazgos relativos al gliceril trinitrato: se ha observado que una pequeña dosis de radicales de oxígeno puede promover la proliferación de

fibroblastos (66), que el óxido nítrico (NO) aumenta la síntesis de colágeno y componentes de la matriz (59) mejorando las propiedades mecánicas del tendón neoformado. Se han realizado pocos ensayos clínicos para probar la eficacia de los parches de gliceril trinitrato (66) pero se ha observado una mejoría en los síntomas de pacientes con tendinopatía de Aquiles, de supraespinoso, y en codo de tenista pero se han reportado diversos efectos adversos como la aparición de dolores de cabeza agudos que pueden llevar a un abandono del tratamiento. Se necesita una mayor investigación de esta terapia para confirmar su efectividad, pero su utilización en combinación con otras, como el entrenamiento excéntrico o las ondas de choque, puede reportar resultados prometedores.

- Inyecciones esclerosantes

La inyección de compuestos esclerosantes que reducen el flujo sanguíneo hacia el tendón como el polidocanol, se ha utilizado para reducir el dolor en pacientes con tendinopatías crónicas con resultados positivos (67). Se ha observado que la neo-vascularización que se observa en tendinopatía viene habitualmente asociada al crecimiento de fibras nerviosas (67) por lo que la reducción de la vascularización puede ayudar a disminuir el dolor de pacientes crónicos. Pero dicha reducción puede tener resultados positivos a corto plazo pero no ser beneficiosa a largo plazo para la curación definitiva del tendón y su efecto a largo plazo no está demasiado claro. Se necesitan más estudios para evaluar la eficacia del tratamiento y los protocolos de aplicación de los compuestos esclerosantes, además de la posibilidad de su combinación con otras terapias.

- Electrolisis percutánea

La electrolisis percutánea intratendinosa (EPI[®]) consiste en una ablación electroquímica inducida mediante un flujo catódico dirigido directamente a la zona degenerada. Existen evidencias experimentales y clínicas (68) que apoyan el hecho de que la reacción inducida por esta intervención electroquímica estimula los mecanismos biológicos de reparación tendinosa.

- Tenotomía ecoguiada

La tenotomía consiste en realizar micro lesiones en la zona dañada del tendón para estimular los mecanismos de reparación endógenos. Esta técnica se puede realizar asociada a anestésicos locales o a plasma rico en plaquetas (PRP). Alternativamente se pueden realizar tenotomías “secas”.

1.5.2. Tratamientos biológicos

1.5.2.1 Plasma Rico en Plaquetas

a. Historia

Las primeras preparaciones de plasma rico en plaquetas (PRP), concentrados de plaquetas preparados mediante centrifugación de la sangre, se hicieron en banco de sangre en los años 60 y se convirtieron en rutinarias en los 70. En los 80, con el comienzo del desarrollo de la medicina regenerativa, cuyo objetivo era la traslación rápida de los resultados de investigación a la práctica clínica, se comenzó a plantear la utilización de los recursos autólogos del propio paciente, y más específicamente, el uso de plaquetas como vehículos del pool de factores moleculares que presentan en su interior. En ese momento, se descubrió que las plaquetas al desgranularse liberaban un compendio de sustancias que estimulaba la cicatrización y que iniciaba el proceso de curación del tejido en úlceras cutáneas. Más tarde en los 90, las plaquetas fueron introducidas en la cirugía maxilofacial como modificaciones autólogas aplicables a potentes adhesivos llamados pegamentos de fibrina. El interés de la aplicación de las plaquetas fue meramente por querer aprovechar las propiedades adhesivas de la fibrina autóloga durante la cirugía ósea. La comprensión del potencial terapéutico de las terapias de PRP sólo se produjo después de ver los resultados clínicos positivos obtenidos tras su utilización, observándose potenciación de la formación de hueso y efectos antiinflamatorios durante las aplicaciones en cirugía maxilofacial (69, 70, 71). En los años 2000, el PRP se utilizó por primera vez para tratar lesiones de rodilla en cirugía artroscópica (72), y se extendió más tarde para el tratamiento de tendones (73), rodillas artrósicas (74), caderas (75) y condropatías (76). En los últimos años se está extendiendo el estudio sobre su aplicación en dermatología estética como tratamiento para cuidados relacionados con el cabello, con el tratamiento de cicatrices e incluso como tratamiento rejuvenecedor (77). Además, se está estudiando su aplicación en reparación quirúrgica de nervio periférico obteniéndose resultados prometedores *in vivo* (78, 79).

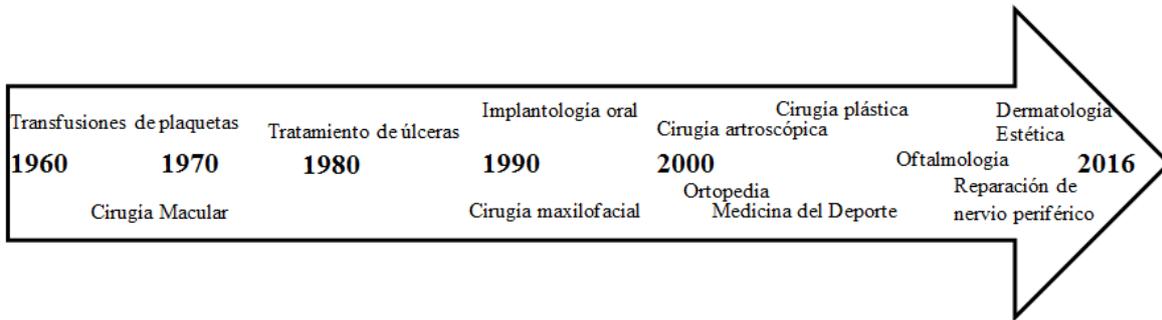


Figura 12. Utilización de los PRPs a lo largo de la historia. Ilustración reproducida con modificaciones de Sánchez *et al.* 2012 (80).

b. Biología de las plaquetas

Las plaquetas son elementos celulares discoidales anucleares presentes en el torrente sanguíneo, de tamaño heterogéneo y cuya densidad es la menor de todas las células sanguíneas. Su diámetro es aproximadamente de 2µm (el tamaño de un leucocito es de aprox. 20µm). Se originan en la médula ósea a partir los megacariocitos, de los cuales emergen como fragmentos citoplasmáticos desde sus pseudópodos. Estos fragmentos, llamados pro-plaquetas se fragmentan más tarde en plaquetas individuales y se liberan al torrente sanguíneo (Fig. 13).

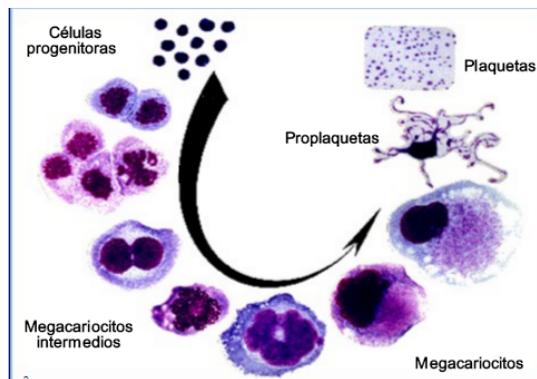


Figura 13. Origen de las plaquetas a partir de células progenitoras que derivan en megacariocitos que dan lugar a las plaquetas (81).

Tras pasar 7-10 días en circulación, se vuelven senescentes y son eliminadas del torrente sanguíneo para ser remplazadas por plaquetas más jóvenes con mejores capacidades funcionales.

Secretoma plaquetario

Las plaquetas están llenas de gránulos de secreción, que son críticos para la función plaquetaria. Los tres tipos de gránulos principales son los gránulos alfa, que son los más abundantes, los gránulos densos y los lisosomas (82) (Fig. 14).

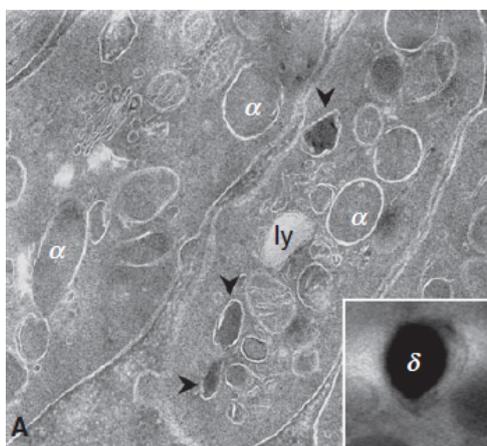


Figura 14. Gránulos plaquetarios. α : gránulos alfa; cabezas de flecha y δ : gránulos densos; ly: lisosomas (82).

Hay aproximadamente 50-80 gránulos alfa por plaqueta, aunque su distribución y tamaño es heterogéneo dependiendo de la carga. Por ejemplo, las proteínas anti- y pro-angiogénicas están almacenadas en distintos gránulos alfa dependiendo de su función. Además existen algunas evidencias de que la secreción de unos gránulos u otros es selectiva dependiendo del agonista. El contenido proteico total de las proteínas no solo incluye a proteínas solubles, sino también a proteínas de membrana que se encuentran ancladas a la membrana plaquetaria. En los estudios de proteómica se han identificado más de 629 proteínas de membrana en las plaquetas y más de 1048 proteínas solubles en el sobrenadante de plaquetas.

- Gránulos alfa

Los gránulos alfa son los orgánulos secretores más abundantes en las plaquetas (50-80 por plaqueta). Contienen gran variedad de proteínas adhesivas que son muy importantes para la homeostasis tisular primaria, como el factor de Von Willebrand (VWF), el fibrinógeno, la fibronectina, la vitronectina y la trombospondina (82). Estas proteínas juegan un papel muy importante en las propiedades adhesivas de las plaquetas y en la formación de un coágulo estable. Los gránulos alfa también contienen una gran cantidad de mediadores solubles que tienen diversas funciones en la coagulación, en la reparación

tisular, en la inflamación y en la angiogénesis. Estos mediadores incluyen: el factor plaquetario 4 (PF4), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (83). Las quimiocinas más abundantes son el factor plaquetario 4 (PF-4) y el RANTES (CCL5), cuya función es la de inducir la quimiotaxis de diversos tipos celulares. El PF-4, la CXCL7 y la IL-8 liberados de las plaquetas modulan la inflamación mediante el reclutamiento de neutrófilos. El mecanismo por el cual se produce el almacenamiento de las proteínas en las vesículas todavía no es completamente conocido. Los gránulos alfa se forman a partir de orgánulos multivesiculares precursores que obtienen la carga derivada de la síntesis en procesos biosintéticos (VWF, PF-4...) y de endocitosis (fibrinógeno, albumina...). Los gránulos alfa tienen frecuentemente recubrimientos de clatrina, una característica compartida con orgánulos del sistema trans-Golgi y los endosomas. Así, los gránulos alfa tienen propiedades de orgánulos secretores además de endosomas tardíos, lo que les define como orgánulos relacionados con lisosomas (LROs). Los LROs incluyen a los gránulos densos, a los cuerpos Weibel-Plade de las células endoteliales, a los melanosomas en melanocitos y a los cuerpos lamelares de células pulmonares de tipo II.

- *Gránulos densos*

Los gránulos densos presentes en las plaquetas (tres a ocho por plaqueta) conforman, en tamaño, el segundo compartimento secretor plaquetario. Contienen, principalmente, moléculas pequeñas como ADP, ATP, serotonina, calcio, pirofosfatos y polifosfatos y presentan moléculas de membrana como CD63 y LAMP-1/2. Los gránulos densos se originan a partir de precursores endosómicos y juegan un papel primordial en la hemostasia tisular.

- *Lisosomas*

Los lisosomas plaquetarios contienen hidrolasas ácidas como cargo principal, y también presentan moléculas de superficie similares a las de los gránulos densos. Las funciones de los lisosomas plaquetarios no se conocen con exactitud. Los lisosomas tienen funciones de limpieza de restos fagocíticos y citosólicos, igual que en las células nucleadas. La secreción del contenido lisosomal puede tener importantes funciones extracelulares como apoyar la escisión de receptores, la fibrinólisis y la remodelación de la vascularización.

Para que se produzca la liberación del contenido de los distintos gránulos plaquetarios, se debe producir la activación plaquetaria, en la que las plaquetas se rompen y su contenido se vierte al espacio extracelular.

Función plaquetaria: Activación de la coagulación y hemostasia

La activación plaquetaria para la liberación de su contenido y la formación de un coágulo que bloquee el daño vascular producido por una lesión, se produce por distintos mecanismos. La liberación de las distintas moléculas tiene distinto ritmo temporal dependiendo de la función de dichas moléculas en la hemostasia tisular, por ejemplo, las moléculas de adhesión que permiten a las plaquetas formar un coágulo uniéndose entre ellas y a la matriz de fibrina y colágeno son de liberación rápida. Por el contrario, las moléculas involucradas en procesos que se producen más a largo plazo como el reclutamiento de células inflamatorias o los mecanismos de estimulación de la angiogénesis son de liberación más lenta (82) (Fig. 15).

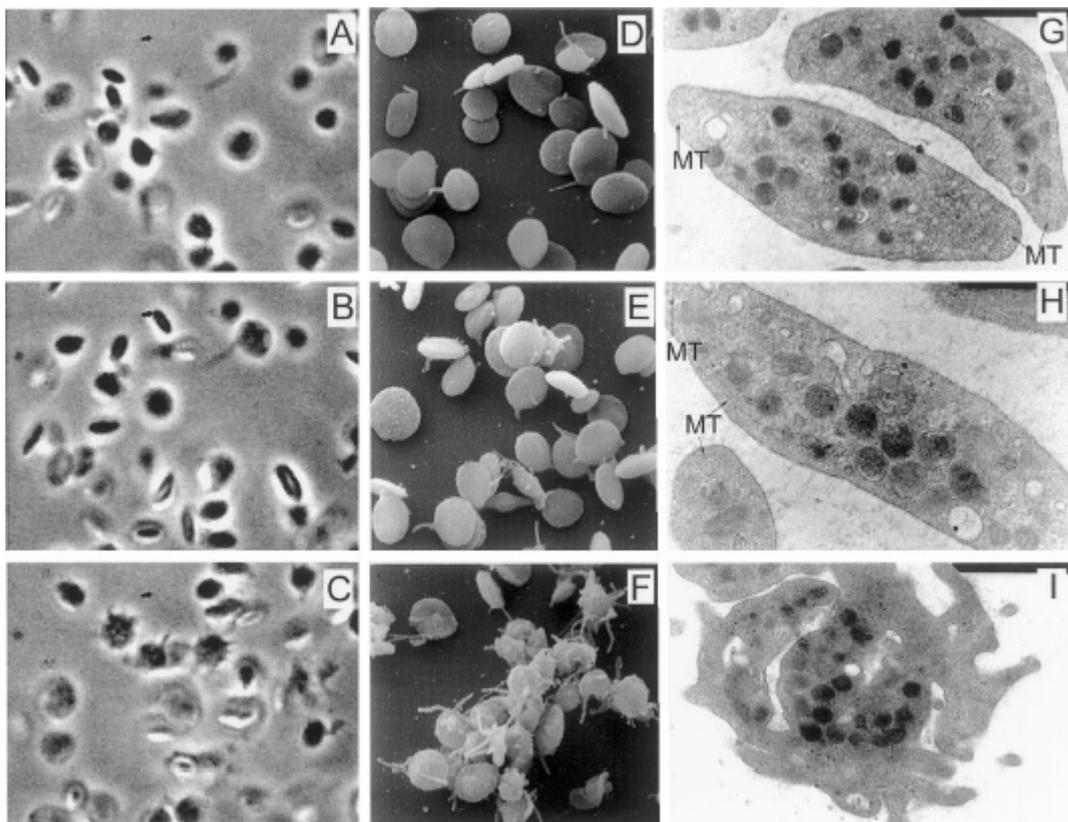


Figura 15. Activación de las plaquetas observada mediante microscopía de contraste de fases (A, B, C), microscopía electrónica de barrido (D, E, F) y de transmisión (G, H, I). En las fotografías A, D y G, las plaquetas están inactivas; en las B, E y F, las plaquetas

comienzan a activarse cambiando su forma y en C, F e I, las plaquetas cambian de forma y se disgregan vertiendo el contenido de sus gránulos (84).

Cuando las plaquetas se activan, se produce un cambio de forma, un mecanismo de adhesión al sustrato y agregación de muchas plaquetas para formar un coágulo. El primer paso en la hemostasia primaria es la adhesión de las plaquetas a la matriz extracelular. Las plaquetas ruedan, se adhieren y se extienden en la matriz de colágeno para formar una capa de plaquetas activadas. La adhesión está mediada por la interacción entre el complejo receptor de la glicoproteína (GP) Ib/V/IX que se encuentra en la superficie plaquetaria al VWF, además de la interacción entre GPIV y GPIa al colágeno expuesto en los lugares de la lesión vascular. En condiciones normales, el VWF soluble no interacciona con GPIb/V/IX, pero cuando se inmoviliza en el colágeno expuesto, se convierte en un adhesivo muy potente.

La activación plaquetaria y el reclutamiento están mediados por distintos mecanismos que pueden ser de naturaleza tanto química como física. La agitación, la alta temperatura y el flujo elevado en capilares producen activación plaquetaria pero, en condiciones fisiológicas, lo que produce la activación son los factores pro-trombóticos tisulares locales así como mediadores plaquetarios secretados. Diversas vías moleculares conducen a la activación plaquetaria pero su acción es acumulativa y se va produciendo un feedback en el que los mecanismos de activación producen más mediadores y así se va amplificando dicha activación. Los mediadores más importantes de la activación son el colágeno, el ADP, el tromboxano A₂, la epinefrina, la serotonina, el calcio y, el más potente, la trombina, que activa las plaquetas cuando está presente en muy bajas concentraciones. La acción de estos mediadores provoca que las plaquetas cambien de forma, que expresen moléculas pro-inflamatorias como la p-selectina y el ligando soluble CD40L, el incremento de la actividad plaquetaria pro-coagulante y la conversión de GPIIb/IIIa en su forma activa, lo que permite la agregación plaquetaria (Fig. 16). La acumulación local de estos agonistas produce el reclutamiento de plaquetas circulantes que se acumulan en un coágulo sanguíneo oclusivo, en el que se encuentran plaquetas, linfocitos, eritrocitos y una red de fibrina, generada a partir del fibrinógeno sanguíneo mediante la trombina, generada a su vez a partir del factor tisular (TF). El receptor plaquetario principal responsable de la agregación plaquetaria es el GPIIb/IIIa. Cuando se activa, promueve la adhesión, la agregación y la difusión plaquetaria en la matriz

extracelular del vaso sanguíneo que se encuentra expuesta (Fig. 16), además de la formación y la estabilización del coágulo (85).

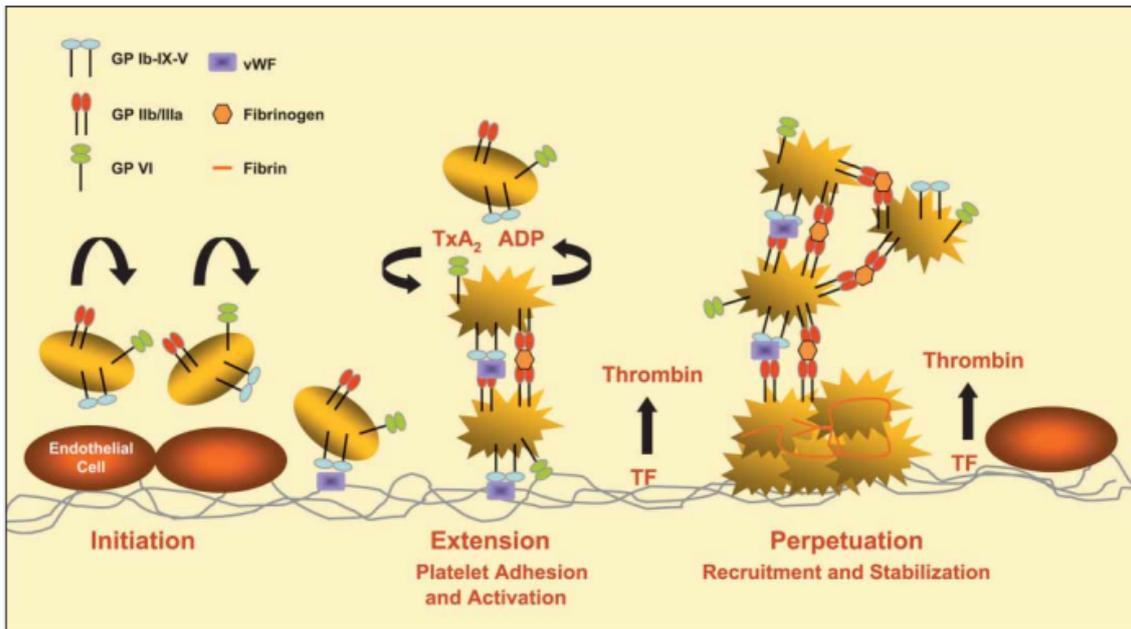


Figura 16. Formación del coágulo plaquetario. VWF: factor de Von Willebrand. GP: glicoproteína. TXA₂: tromboxano A₂. ADP: adenosina trifosfato. TF: factor tisular. (85).

Además de la hemostasia y la formación de coágulos para bloquear el sangrado y ocluir los vasos sanguíneos, las plaquetas participan en muchas otras funciones como la inflamación, la respuesta inmune, la angiogénesis y el anabolismo mediante la liberación de moléculas mediadoras que producen efectos en distintos tipos celulares (85, 86).

Las plaquetas tienen un papel fundamental como mediadores de la respuesta inmune ya que secretan quimiocinas que atraen a células del sistema inmune como el ligando de quimiocinas 7 (CXCL7), RANTES (CCL5), IL-1 β , MCP-1 e IL-8. Además secretan factores de crecimiento que median la respuesta inmune como HGF y TGF- β 1. Las plaquetas no interaccionan con el endotelio cuando está intacto, pero cuando se activa debido a una lesión, es adhesivo para las plaquetas. La adhesión plaquetaria al endotelio es un proceso que tiene diversos pasos y es similar al de la adhesión de las plaquetas a la matriz (Fig. 17). Las plaquetas activadas presentan el ya mencionado CD40L y liberan IL-1 β , que promueven la inflamación del endotelio mediante la inducción a las células endoteliales a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de moléculas de adhesión, de quimiocinas y de factor tisular (TF). Además, la interacción entre el receptor CD40 de las células endoteliales y el CD40L plaquetario produce la liberación de IL-8 y MCP-1 que participan en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos (quimiotaxis). Esta

interacción CD40-CD40L también provoca el aumento en la expresión de distintas moléculas de adhesión (E-selectina, molécula 1 de adhesión a célula vascular (VCAM-1) y molécula de adhesión intracelular (ICAM-1)) que median la adhesión de monocitos, linfocitos y neutrófilos al endotelio. Además, las plaquetas liberan TF a las células endoteliales en un mecanismo CD40-dependiente promoviendo la formación del coágulo o trombosis. CD40-CD40L también produce una liberación de matriz metaloproteasas (MMP-2 y MMP-9) que promueven la degradación de la matriz extracelular y la posterior remodelación del tejido inflamado. Además de todos estos efectos, la ligación de CD40-CD40L produce la maduración de células dendríticas, el cambio de isotipo de las células B y el aumento de la activación de células T CD8⁺.

Además de realizar la función estimuladora de células endoteliales mediante contacto directo, las plaquetas también liberan mediadores solubles que participan en la respuesta inmune, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas, citoquinas y factores de la coagulación (Fig. 17). La secreción de RANTES y PF-4 que forman heterodímeros aumenta el arresto de monocitos e induce la expresión de citoquinas y quimiocinas en leucocitos, además PF-4 tiene un efecto angiostático e inhibe la proliferación de células endoteliales. Además, la secreción de IL-1 β provoca la secreción de MCP-1 por parte de células endoteliales e induce la expresión de las moléculas de adhesión *ICAM1* y $\alpha_v\beta_3$. Todos estos eventos producen la infiltración de células inflamatorias en el lugar de la lesión.

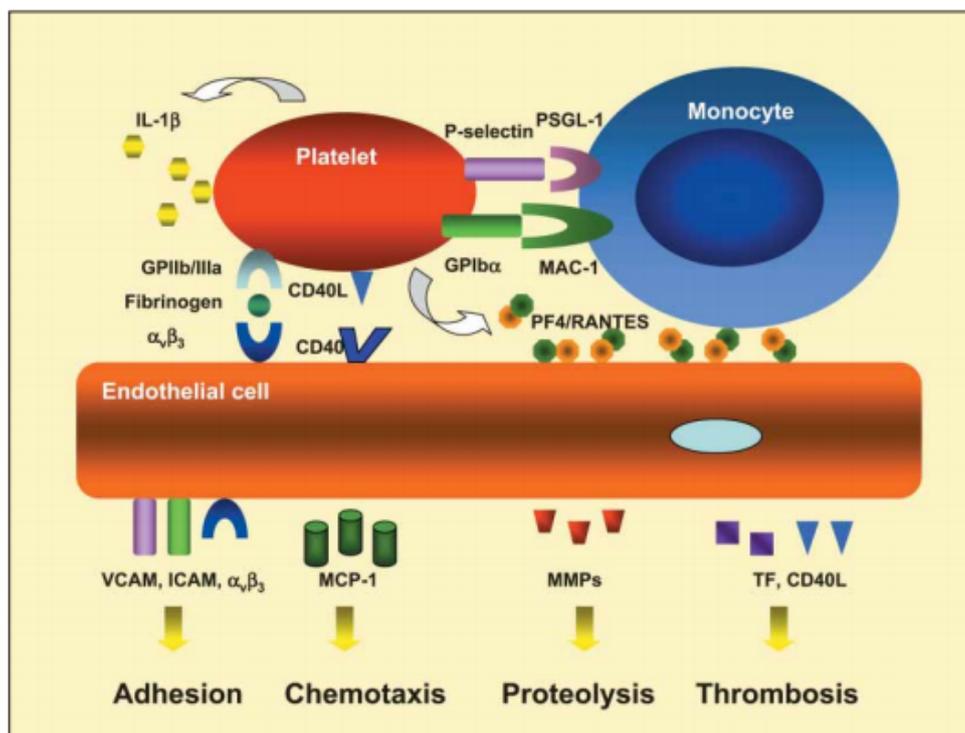


Figura 17. Estimulación de la inflamación de células endoteliales por las plaquetas. IL-1 β : interleucina 1 β , GP: glicoproteína, CD40L: ligando de CD40, VCAM: molécula 1 de adhesión a célula vascular, ICAM: molécula de adhesión intracelular, MCP-1: proteína quimio-atrayente de monocitos 1, MMP: matriz metaloproteinasa, TF: factor tisular, PSGL1: ligando de la glicoproteína p-selectina 1, MAC-1: antígeno de macrófago 1, PF4: factor plaquetario 4, RANTES: “Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted”, también llamado CCL5 (85).

A parte de todos estos eventos producidos en las células endoteliales, las plaquetas también liberan factores pro y anti-angiogénicos presentes en los gránulos intracelulares. Dichos factores incluyen al VEGF, TGF- β 1, bFGF, PDGF, EGF, IL-8, angiopoyetina, CXCL-12, MMP-1, 2 y 9, endostatinas, fibronectina, PF-4, TSP-1 y α 2-macroglobulina. El balance y la concentración de dichas moléculas determinan si se produce la activación o la inhibición de la angiogénesis.

Al mismo tiempo, las plaquetas secretan factores que promueven la curación y el anabolismo de tejidos como el PDGF, el BDNF, TGF- β 1 y el IGF.

Debido a que se ha observado que la función de las plaquetas no es meramente la de la hemostasis sino mucho más compleja y están involucradas en diversos estadios de la curación de tejidos, se postuló que las plaquetas embebidas en coágulos de fibrina provenientes del propio paciente, podrían potenciar la curación mediante los factores biológicamente activos secretados, por lo que se desarrollaron los plasmas ricos en plaquetas (PRPs).

c. Uso terapéutico del Plasma Rico en Plaquetas

El concepto de utilización del PRP implica sustituir el coágulo sanguíneo con PRP, por tanto minimizar la presencia de glóbulos rojos (95% en volumen) al tiempo que aumentamos la concentración de plaquetas en el lugar mismo de la lesión. De esta forma concentraciones supra fisiológicas de proteínas plasmáticas y de plaquetas que acelerarán los procesos de reparación tisular mediante mecanismos directos e indirectos, por ejemplo atrayendo células inmunes mediante quimiotaxis, ó induciendo la síntesis de más proteínas por parte de las células locales. Además, es importante la capacidad del PRP de liberar las proteínas, desde la matriz de fibrina, de forma controlada a lo largo del tiempo satisfaciendo las necesidades del tejido en fase de reparación.

Sin embargo, el conocimiento actual tanto de las terapias PRP como de los mecanismos de reparación debe ser explorado con más intensidad para trasladar dicho conocimiento y mejorar estas terapias biológicas.

En el año 2009 Dohan (87) planteó la nomenclatura que utilizamos actualmente y propuso una clasificación para los PRPs. En términos generales se categorizaron como PRP puro y plasma rico en plaquetas y leucocitos. Considerando la arquitectura de la fibrina y el número de plaquetas se diferenciaron más subtipos de PRP. Los distintos protocolos comerciales de obtención producen PRPs con distintas características en cuanto a contenido de plaquetas y leucocitos y características de la fibrina, y ese ha sido el punto de partida de las clasificaciones PRP.

Debido a su facilidad de obtención, a su bioseguridad por su origen autólogo y al ventajoso balance riesgo/beneficio, la aplicación clínica del PRP ha precedido a la investigación básica. En sus comienzos, los PRPs se utilizaron con una vaga idea de los mecanismos biológicos que se podían estar influenciando. De hecho, muchos estudios se dirigían a examinar los resultados clínicos en vez de identificar los mecanismos subyacentes que, de hecho, siguen sin conocerse con precisión. Prueba de ello es que se están realizando numerosos ensayos clínicos en diversos campos para probar su eficacia en diversas patologías sin todavía conocer su efecto preciso en los mecanismos involucrados en cada una de ellas.

La sangre periférica es la principal fuente de preparación de PRPs; la media de plaquetas circulantes es de unas 200.000 plaquetas/ul. Para preparar el PRP se extrae sangre de una vena periférica del paciente en condiciones estériles, con o sin anticoagulantes, y el plasma se prepara mediante centrifugación o filtración. El volumen de sangre extraída se puede adaptar a las necesidades clínicas y varía entre 10 y 100 mL. Básicamente el método de preparación determinará la composición del PRP y concentración de eritrocitos, leucocitos y plaquetas en un determinado volumen de sangre. Las terapias de PRP involucran una manipulación mínima por lo que, en general, los requerimientos reguladores son fáciles de obedecer permitiendo así su uso clínico extendido y el éxito de los kits comerciales. Hay tres métodos de preparación de PRP principales: 1) doble centrifugado utilizando máquinas automáticas y kits comerciales, 2) el método de centrifugación simple utilizando centrifugas convencionales de laboratorio seguidas de un preparación manual del PRP y 3) filtración selectiva de la sangre utilizando tecnología disponible para este fin.

La centrifugación sencilla utilizada comúnmente en los laboratorios de investigación produce un PRP con una concentración 1-3 veces el número de plaquetas en sangre periférica, y el doble centrifugado produce un PRP con una concentración de plaquetas 4-8 veces superior a la sangre periférica. El doble centrifugado frecuentemente concentra

leucocitos además de plaquetas. De acuerdo con esto, los concentrados de plaquetas se han categorizado en PRP puros y L-PRP que son PRPs leuco-enriquecidos.

Los sistemas comerciales producen PRPs con distintas concentraciones de plaquetas y leucocitos. En la siguiente tabla se resumen los principales sistemas disponibles y sus características.

Nombre	Tecnología empleada	Tiempo total de procesamiento	Enriquecimiento en plaquetas	Recuperación % plaquetas
Biomet GPS™	Floating Buoy	27 min	3.2 x	70%
Cell Saver Based Systems	Standard Centrifugation	20 min	4-6x	75%
Sorin Angel	Computer Aided System	25 min	4.3x	76%
AutoloGel System	Standard Centrifugation	1-2 min	1x	78%
GenesisCS	Direct Siphoning	16 min	10 ± 3 (4ml)*	68 ± 17.1*
Harvest® SmartPrep2 BMAC™	Floating Shelf	16 min	4.0x	72.0 ± 10
Depuy Symphony II	Floating Shelf	16 min	4.0x	72.0 ± 10
Arteriocyte Medical Magellan™	Computer Aided System	17 min	5.1x	70%
Secquire	Direct Aspiration	20 min	1.6x	31 ± 15

Tabla 3. Sistemas comerciales disponibles para la preparación de PRPs con distintas formulaciones.

Como alternativa a los sistemas comerciales automáticos, el PRP se puede preparar en bancos de sangre utilizando procedimientos estandarizados. En este contexto, el PRP se prepara a partir de un volumen de sangre mayor, se mide su calidad y se congela en alícuotas para ser utilizado en procedimientos posteriores. El PRP obtenido en bancos de sangre es más barato que el obtenido mediante protocolos comerciales.

Durante la extracción de sangre la mayoría de los protocolos utilizan anticoagulantes para evitar la coagulación de la sangre. La mayoría de los kits usan solución de dextrosa-citrato (ACDA) o citrato sódico para quelar los iones calcio y de esta forma evitar la transformación de protrombina en trombina y su acción sobre el fibrinógeno plasmático. Anticoagulantes como heparina y EDTA se suelen evitar porque modifican la membrana

plaquetaria. Sin embargo hay que tener en cuenta que el ACDA y el citrato modifican el pH de la sangre y la vuelven un poco ácida, es por esto que algunos protocolos comerciales (GPS) estabilizan el pH mediante la adición de un buffer. Como alternativa hay sistemas que extraen la sangre sin anticoagulante por lo que la fibrina se forma durante el centrifugado. Evidentemente estos productos tienen un pH fisiológico pero no son inyectables.

Para la utilización del PRP, normalmente, se busca previamente inducir la secreción de proteínas de los gránulos alfa por lo que se lleva a cabo la activación plaquetaria. Esto ocurre espontáneamente en la sangre anti coagulada. La coagulación se puede inducir de varias formas: mediante la adición de Ca^{2+} (en general cloruro de calcio) o Ca^{2+} /trombina. El objetivo es romper fibrinógenos e inducir la proliferación de los monómeros de fibrina. Como alternativa, la coagulación se induce de manera fisiológica cuando el PRP es inyectado y entra en contacto con los factores tisulares.

Una vez que se prepara y se activa el concentrado plaquetario, se genera un “scaffold” (andamio) tridimensional y bio-compatibile que libera progresivamente una miríada de factores de crecimiento, citoquinas y otras proteínas al lugar en el que se aplica, contribuyendo a la aceleración de la curación y la reparación tisular (43) (Fig. 18).

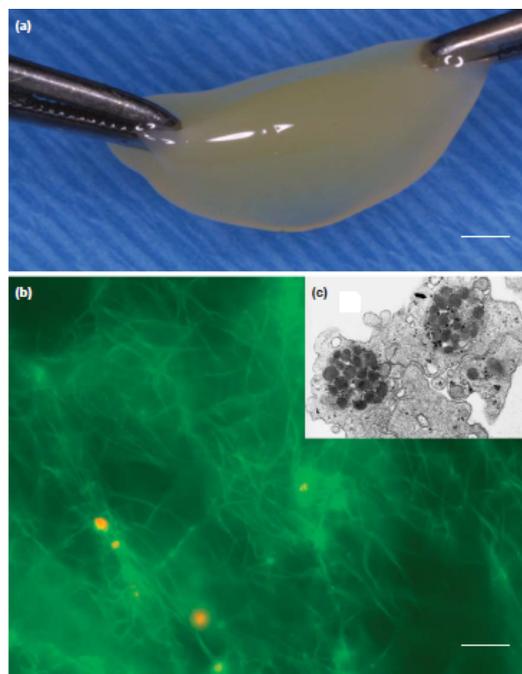


Figura 18. (A) Fotografía de un gel de fibrina de PRP (barra = 5mm). (B) Estructura del gel de fibrina vista mediante microscopia de fluorescencia. En verde se observa la fibrina y en amarillo los agregados de plaquetas (barra = 40 μm). (C) Fotografía de microscopia electrónica de transmisión de un agregado plaquetario (43).

d. Participación del PRP en las distintas etapas de la regeneración tisular

La regeneración tisular efectiva se da cuando se producen las distintas etapas de la curación de manera satisfactoria. Mediante la liberación local y espaciotemporal de factores moleculares paracrinos, el PRP modula las vías moleculares y los mecanismos implicados en dichas etapas. Las terapias que utilizan la biotecnología del PRP buscan explotar los distintos mecanismos de regeneración incluyendo la hemostasia, la inflamación, la angiogénesis y el anabolismo tisular que son promovidos por los distintos factores moleculares presentes en el PRP.

El cóctel multi-molecular presente en el PRP puede tener un efecto determinado en cada fase del proceso de curación de un tejido. Aunque se ha investigado mucho sobre el efecto del PRP en distintos tipos celulares, el efecto de los factores de crecimiento, las citoquinas y otras moléculas presentes en el PRP así como su acción pleiotrópica en cada etapa de la curación, no está bien dilucidado.

En la fase inicial de la lesión, cuando se produce la muerte celular y la liberación de DAMPs, la administración de PRP puede rescatar a las células dañadas, ya que se ha visto que promueve la supervivencia celular tanto *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, se ha observado que en auto-trasplantes en cirugía plástica, la administración de PRP junto a las células disminuye la muerte celular por apoptosis y la expresión de mediadores moleculares de muerte celular como *Bcl2* (88). Además, se ha observado que el PRP protege a los tenocitos contra la muerte celular inducida por el ciprofloxacino y la dexametasona (89). Peng et al. vieron que el PRP podía aliviar la muerte celular de BMSCs en condiciones hostiles vía la estimulación del receptor del PDGF y su vía de señalización PDGFR/PI K/AKT/NF-kB.

La magnitud, el patrón y el ritmo de infiltración de leucocitos se conocen mejor cuando la lesión o el estrés generado en el tejido están inducidos por patógenos. Por ello, en el caso de lesiones estériles, la extravasación de leucocitos en respuesta al daño en el tejido no es bien conocida. De hecho, la influencia del PRP en este mecanismo no se conoce demasiado bien aunque es un parámetro importante ya que puede determinar el resultado de la reparación tisular junto con el fenotipo secretorio de las células locales. La infiltración de leucocitos se produce por un mecanismo denominado diapédesis facilitado por el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. La administración de PRP en esta fase puede modificarla ya que aporta diversas moléculas que modulan estos mecanismos. El PRP contiene VEGF, catecolaminas e histamina que tiene efectos sinérgicos en el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Pero también

contiene otras moléculas, como la angiopoyetina-1, la serotonina y la esfingosina-1-fosfato, que tienen el efecto contrario.

Las células polimorfonucleares (PMNs), incluyendo a los neutrófilos, eosinófilos y los basófilos también extravasan del sistema sanguíneo al lugar de la lesión para secretar moléculas citotóxicas y ROS como respuesta inflamatoria inicial. Su supervivencia se ve aumentada por la presencia de agonistas de DAMPs. El PRP puede tener una influencia clave tanto en la magnitud de la infiltración de PMNs como en su supervivencia. El PRP contiene quimiocinas CCL (RANTES, MCP-1, Eotaxina, MIP-1...) y CXCL (IL-8, PPBP, SDF-1, GRO- α , PF-4, ENA-78, NAP-2...) que atraen distintos tipos de leucocitos. En particular, la quimiocina CXCL7 o PPBP, en colaboración de NAP-2 e IL-8 provee de una señal muy potente para la quimiotaxis de neutrófilos. El PRP también puede modificar la esperanza de vida de los leucocitos mediante la modulación del microambiente molecular de la lesión.

La polarización de los macrófagos, como ya se ha explicado, es un mecanismo clave que determina el destino de la lesión y la duración de la fase pro-inflamatoria. Conocer el efecto del PRP en dicha polarización es clave para entender su influencia en los macrófagos. Se ha observado que el PF-4, presente en altas concentraciones en el PRP, induce un estado de polarización en macrófagos distinto al de M1 y M2 (90) oponiéndose un fenotipo M4 distinto a los dos anteriores, pero que solo ha sido estudiado en aterosclerosis, no en el contexto de la reparación tisular. También se ha observado que la adenosina, liberada de los gránulos densos, aumenta la producción de IL-10 por parte de los macrófagos, lo que podría denotar una tendencia a fenotipo antiinflamatorio (91, 92). Por otro lado, se ha observado que el ATP, que también se encuentra en los gránulos densos, provoca que los macrófagos secreten citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 e IL-18 (93). Dependiendo del conjunto de señales pro y anti-inflamatorias que reciban los macrófagos presentes en la lesión, se diferenciaron hacia uno u otro linaje (M1-M2), pero teniendo en cuenta que pueden presentar fenotipos intermedios y que ese fenotipo depende de una gran cantidad de señales, es difícil determinar cuál será el fenotipo exacto inducido por el PRP. Se necesitará de más estudios para conocerlo y manipularlo terapéuticamente, para poder exponer a los macrófagos a un determinado microambiente molecular cuando se busque la resolución de la inflamación.

Uno de los eventos clave para el proceso de reparación tisular es la angiogénesis y la formación de nuevos vasos sanguíneos. El PRP tiene capacidad de promover la

proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos tubos *in vitro* y presenta una gran cantidad de moléculas tanto pro como anti-angiogénicas (Tabla 4).

Estimuladores de la angiogénesis presentes en el PRP
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)
Factor de crecimiento insulínico 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2)
Angiopoyetina 1 (ANGPT1)
Matriz metaloproteasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9)
Lipoproteína A (LPA)
Esfingosina-1-fosfato (SIP)
Factor derivado de células estromales 1 (SDF-1)
Heparanasa (HPSE)
Factor V/Va y XI
Desoxiribosa-1-fosfato
Ligando de CD40 (CD40L)
Factor tisular (TF)
Interleucina-8 (IL-8)
Inhibidores de la angiogénesis presentes en el PRP
Angiostatina
Endostatinas
Factor plaquetario 4 (PF-4)
B-Tromboglobulina
Inhibidor de activadores de plasminógeno (PAI-1)
Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)
Trombospondina (TSP-1)
Inhibidor tisular de las metaloproteasas 1-4 (TIMP 1-4)
Fibronectina (FN)
Vitronectina (VN)
A2-macroglobulina (A2M)
A2-antiplasmina
Osteonectina (ON)
Inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)
Cinínógeno de alto peso molecular (KNG)
Antitrombina (SERPINC1)

Tabla 4. Activadores e inhibidores de la angiogénesis presentes en el PRP (93).

Se ha observado que se producen sinergias entre los moduladores de la angiogénesis presentes en el PRP. Por ejemplo, la angiopoyetina-1 promueve la supervivencia de células endoteliales, estimula la formación de tubos capilares en conjunto con el VEGF, contribuye al mantenimiento de los vasos y a su estabilización. Además, la sinergia entre el VEGF y el PDGF produce la formación de una red vascular más madura que cuando cada factor se administra sólo (95).

Paradójicamente, el PRP también aporta factores anti-angiogénicos necesarios para la regulación negativa del crecimiento de los vasos sanguíneos. Dichos inhibidores, como el PF-4 y el TSP-1, son muy abundantes en los gránulos plaquetarios. El TGF- β 1 tiene una doble función, en bajas concentraciones contribuye a la promoción de la angiogénesis porque regula al alza el VEGF y el activador de plasminógeno uPA, pero a altas concentraciones, contribuye a la resolución de la angiogénesis inhibiendo la proliferación y la migración de células endoteliales y promoviendo la formación de la membrana basal. El PRP proporciona la capacidad de manipular la angiogénesis con fines terapéuticos con objetivo de modular la actividad de varios fenotipos celulares como son, las células endoteliales, las células de músculo liso y los pericitos. La comunicación cruzada entre los distintos fenotipos involucrados en el proceso de angiogénesis constituye el complejo sistema que regula dicho proceso pero la información del efecto del PRP en los 3 tipos celulares es limitada y debería comprenderse mejor para afinar en la manipulación de la angiogénesis.

Otro mecanismo cooperativo que permite el proceso de angiogénesis es la degradación de la matriz extracelular que permite la migración celular y el crecimiento de los vasos. De hecho, varias familias de proteasas presentes en el PRP, incluyendo los activadores del plasminógeno (uPA y PAI-1) y las MMPs han sido caracterizadas y vinculadas con la degradación proteolítica y la remodelación de la membrana basal sub-endotelial y la MEC circundante para crear un camino para las células migratorias. Para aportar mayor complejidad al coctel molecular del PRP, también se encuentran inhibidores tisulares endógenos de proteasas (TIMPs) que controlan la actividad de dichas proteasas. Una vez más, el balance entre las distintas moléculas y las condiciones tisulares determinarán el resultado de la administración de PRP en la zona lesionada.

Para recuperar la zona lesionada, muchas veces se necesita movilizar las células madre, tanto presentes en los propios nichos del tejido, como en el torrente sanguíneo. Estas células son generalmente quiescentes, y el PRP tiene capacidad para reactivar a células quiescentes devolviéndoles la capacidad mitótica y promoviendo su proliferación. Además, el PRP participa en la movilización de las células madre que migran a la zona tratada con PRP en respuesta a los agentes quimiotácticos SDF-1/CXCL12, bFGF, PDGF-B y CXCL5 (44). El efecto del PRP en la diferenciación de las células madre es un tema controvertido y se han obtenido distintos resultados.

En el proceso de curación de la lesión, a la vez que se desarrollan los vasos sanguíneos, se necesita migración de las células del propio tejido y síntesis de elementos de matriz

extracelular. Se ha probado que el PRP es quimiotáctico para muchos tipos celulares incluyendo fibroblastos mediante, entre otros el PDGF y el CXCL7 (44) (Fig. 19). El tratamiento de tenocitos con PRP se ha observado que aumenta su capacidad proliferativa y promueve la liberación de VEGF y HGF por estas células.

La síntesis de matriz extracelular es proporcional al número de células y está controlada por factores de crecimiento como TGF- β 1, PDGF, BDNF e IGF-1 (94). El IGF-1 está normalmente inactivo por su unión a proteínas como IGFBP-2, 3 y 4; y su efecto no depende sólo de receptor, sino también de sus activadores que hacen que IGF-1 ejerza su acción y por ella se estimule la síntesis de proteínas, la entrada de glucosa en las células, la síntesis de glucógeno y la acumulación de lípidos. En condiciones no patológicas, las células locales producen IGF-1 y TGF- β 1 que promueven la síntesis de colágenos. El aporte de estos factores de crecimiento por parte del PRP puede ayudar a estimular la síntesis de MEC y acelerar los procesos de curación.

La fibrosis, tradicionalmente ligada a procesos de reparación defectuosos, se caracteriza por acumulación excesiva de colágeno I que produce una alteración en las propiedades mecánicas de la MEC del tejido como la resistencia a la tensión y la elasticidad. Los miofibroblastos son responsables de la fibrosis y se originan a partir de diversos tipos celulares. El TGF- β 1, abundante en el PRP, aumenta de manera notable la síntesis de colágeno de tipo I y es un agente anti-apoptótico para miofibroblastos. En contraposición, la proteína amiloide sérica presente en el plasma ha sido identificada como un inhibidor de la fibrosis en distintos modelos mediante la regulación de la actividad de los macrófagos. También el HGF es un potente inhibidor de la fibrosis y puede ayudar a disminuir la presencia de cicatrices. Así, las acciones del PRP son teóricamente paradójicas en cuanto al desarrollo de la fibrosis pero los clínicos que utilizan inyecciones de PRP raramente reportan la presencia de fibrosis.

La presencia y la potencia de los efectos del PRP anteriormente descritos dependen de variables como las condiciones del tejido receptor, la localización anatómica y las pautas de administración del PRP.

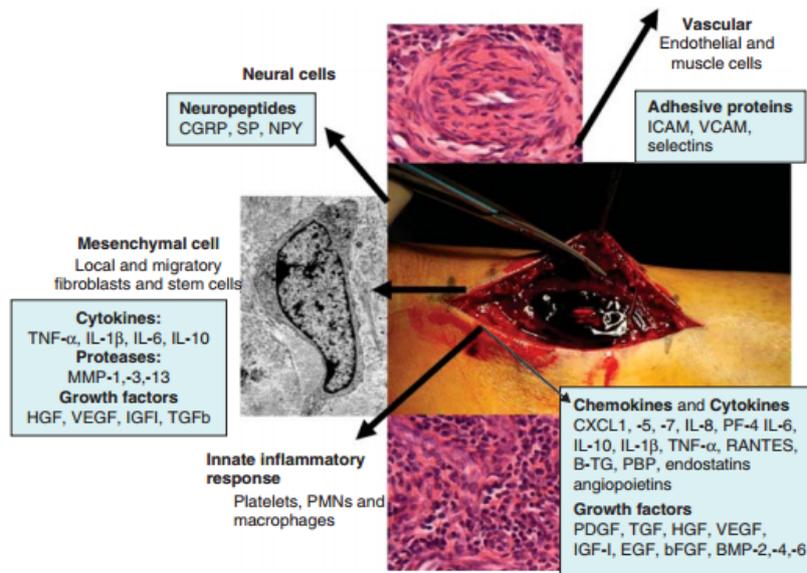


Figura 19. Efecto del pool molecular presente en el PRP durante la reparación temprana de los tendones (44). El PRP aporta una gran cantidad de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento que activan mecanismos de reparación dependientes de los distintos tipos celulares como las células endoteliales, neurales, mesenquimales, inmunes y residentes en el tejido. CGRP: gen del péptido relacionado con la calcitonina, SP: sustancia P, NPY: neuropéptido Y, ICAM: molécula de adhesión intracelular, VCAM: molécula de adhesión vascular, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, IL-1 β : interleucina 1 beta, IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, MMP: matriz metaloproteínasa, HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, IGF1: factor de crecimiento insulínico 1, TGF β : factor de crecimiento tisular beta, CXCL: ligando de quimiocinas con motivo C-X-C, PF-4: factor plaquetario 4, RANTES: “Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted”, B-TG: beta tromboglobulina, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, EGF: factor de crecimiento epitelial, bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico, BMP: proteína morfogenética ósea.

e. PRP y Tendón: Investigación preclínica

- Investigación preclínica in vitro

Para evaluar el efecto a nivel molecular del PRP y comprender mejor los mecanismos subyacentes al efecto en la aplicación clínica en tendinopatía, se ha llevado a cabo una diversa investigación, tanto en humanos como en animales, aunque todavía se está lejos de comprender los efectos y las diferencias encontradas entre los distintos estudios que pueden achacarse, tanto a diferencias en los procesos de preparación del PRP, como a diferencias en el tejido receptor o a las pautas de aplicación del PRP (Tabla 5). El primer estudio sobre la terapia de PRP en células de tendón derivadas de muestras recogidas durante la reconstrucción de ligamento cruzado fue publicado por Anitua et al. en 2006. Observaron que la presencia de plaquetas en los geles de fibrina aumentaba

significativamente la proliferación celular y que aumentaba la síntesis de colágeno tipo I y factores como PDGF, VEGF, TGF- β y HGF, que promueven la angiogénesis y la síntesis de MEC. Otro estudio de 2008 (96) que comparó el efecto del lisado de PRP y PPP (plasma pobre en plaquetas) probó que en células derivadas de tendón de la corva, observó que ambos estimulaban la proliferación celular y la producción total de colágeno. Además, el lisado de PRP, y no el de PPP, incrementaba ligeramente la expresión de MMPs y factores de crecimiento como VEGF-A y TGF- β 1. Esta observación fue ratificada por un estudio de 2009 en el que los autores observaron también un aumento de la proliferación y de la producción de VEGF (97). Otros autores también han constatado un aumento de las tasas proliferativas en células derivadas de tendón de la corva y de manguito rotador (98, 99), estos últimos con un efecto dosis dependiente y un aumento de la síntesis de elementos de matriz extracelular. Por otro lado, como ya se había observado previamente (89), otro estudio determinó que los anestésicos y los glucocorticoides disminuían los efectos pro-proliferativos del PRP (100). Con todo ello, la investigación básica utilizando PRP y células de tendón humanas parece indicar que el PRP produce un aumento de la capacidad proliferativa de células de tendón, puede tener un efecto protector frente a la toxicidad de los tratamientos convencionales y puede aumentar la capacidad anabólica de dichas células promoviendo la síntesis de matriz extracelular, que puede mejorar la calidad mecánica del tendón una vez finalizado el proceso de reparación (14). Se debe mencionar que la comparación de los estudios es a veces complicada ya que los métodos de preparación, de activación y la concentración utilizada varían entre ellos por lo que para comparar los resultados obtenidos en cada estudio se deberían estandarizar los métodos (Tabla 4).

Autor	Formulación del PRP	Métodos	Medidas	Resultados
Anitua 2009	Doble centrifugación. 2x y 4x PRP. Activación con CaCl ₂	Fibroblastos de tendón tratados 3 días con Suero liberado de gel de PRP	Proliferación, morfología, VEGF, HGF, procolágeno tipo I, HA	PRP aumenta la proliferación y la expresión de HA y VEGF
Anitua 2005	Centrifugación simple. 2x PRP. Activación con CaCl ₂	Células de tendón (ACL) tratadas 6 días con suero liberado de gel de PRP.	Proliferación. IGF, TGF, PDGF, VEGF, HGF y EGF a distintos tiempos	PRP aumenta la proliferación y la concentración de PDGF, TGF, VEGF y HGF. EGF disminuye
Carofino 2012	Centrifugación simple da un 2.6x PRP y Doble centrifugación da un 3.3x PRP. Usan ACP de Arthrex (Arthrex, Naples, FL)	Células de tendón derivadas bíceps tratados con 2.6x PRP o 3.3x PRP y/o anestésicos	Proliferación y viabilidad celular	PRP aumenta la proliferación. El tratamiento con anestésicos locales y PRP disminuye la proliferación y la viabilidad celular
De Mos 2008	Triple centrifugación. 2.55x PRP. Activación con CaCl ₂	Células de tendón de la corva tratadas 14 días con Suero liberado de gel de PRP o PPP	Medidas a distintos tiempos de proliferación, colágeno total, expresión de COL1, COL3, MMP1, MMP3, MMP13, TGF y VEGF	PRP aumenta la proliferación y la expresión de VEGF y TGF, colágeno total aumenta al día 14. Expresión de COL1 y COL3 disminuye pero ratio COL1:COL3 se mantiene
De Mos 2009	Triple centrifugación. 2.8x PRP. Activación con CaCl ₂	Células de tendón de Aquiles sanos y tendinopáticos diferenciadas con medio condrogénico y tratadas 7 días con PRP	Expresión de genes de linaje condrogénico Sox9, COL2A1, COL10A1. Tinción de GAGs y H&E.	Mayor expresión de marcadores de cartilago en células de tejido tendinopático. PRP disminuye la expresión de dichos marcadores
Jo 2012	Geles de 5x PRP activados con gluconato de calcio con o sin trombina	Células de manguito rotador tendinopático tratadas 7 y 14 días con PRP	Proliferación, expresión de genes de MEC, colágeno y GAGs totales	PRP aumenta la proliferación, la expresión de síntesis de COL1 y COL3 y el contenido de GAGs
Babolda shti 2011	Centrifugación simple. 1.4x-3.35x. Activación con trombina bovina	Células derivadas del tendón de la corva cultivadas con PRP, ciprofloxacino o dexametasona con o sin PRP	Viabilidad celular y senescencia	PRP aumenta la viabilidad celular, incluyendo la de células tratadas con los fármacos. La senescencia disminuye en dexametasona + PRP
Zhai 2012	Doble centrifugación. 3x-10x PRP	Células derivadas del tendón de la corva cultivadas con o sin PRP y con o sin osteoblastos	Proliferación celular, COL1, Vimentina, COL3, VCAM-1	PRP aumenta las tasas de crecimiento celular y disminuye la inhibición de la proliferación inducida por citoquinas

Tabla 5. Estudios del efecto del PRP en células de tendón humanas *in vitro*. Modificada de Baksh et al (101). PRP: plasma rico en plaquetas, PPP: plasma pobre en plaquetas, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, HGF: factor de crecimiento hepático, IGF: factor de crecimiento insulínico, TGF: factor de crecimiento tisular, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, EGF: factor de crecimiento epidérmico, HA: ácido hialurónico, ACL: ligamento cruzado anterior, CaCl_a: cloruro de calcio, COL1: colágeno tipo I, COL3: colágeno tipo III, MMP1: matriz metaloproteínasa I, MMP3: matriz metaloproteínasa III, MMP13: matriz metaloproteínasa 13, Sox9: región determinante del sexo SRY del cromosoma Y, COL2A1: colágeno II alfa1, COL10A1: colágeno 10 alfa1, GAGs: glucosaminoglicanos, H&E: hematoxilina eosina, VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1, MEC: matriz extracelular.

- Investigación preclínica *in vivo*

Se ha realizado también una cantidad considerable de investigación *in vivo* del efecto del PRP en tendinopatías inducidas en animales, pero, una vez más, comparar los estudios resulta complicado por varias razones. La cantidad de plaquetas y el enriquecimiento del PRP no es el mismo en todos los estudios, incluso en algunos de ellos no se reporta; además, se utilizan distintos tipos de animales (ratas, conejos, caballos) que son de distintos tamaños y por ello difícilmente comparables. Por último, el tendón utilizado (Aquiles, rotuliano, flexor digitalis) y la pauta de administración del PRP difiere entre los estudios.

A pesar de ello, los resultados obtenidos se han recogido (101) y se pueden observar los efectos del PRP en cada uno de ellos. Tres estudios (102-104) que examinaron el efecto del PRP en la cantidad de factores de crecimiento presentes en el tendón rotuliano de conejos que había sido seccionado tras el tratamiento con PRP, reportaron un aumento significativo en el nivel de los factores de crecimiento TGF- β 1 e IGF. También se examinó la vascularización (105) en tendón de Aquiles (106) y rotuliano de conejos (102), además de en tendones digitales flexores de caballos y en tendón de Aquiles de ovejas (107), tras el tratamiento con PRP de las distintas lesiones inducidas, y los tres estudios reportaron un aumento de la vascularización y/o del flujo sanguíneo en el lugar de la lesión, lo que puede indicar que el PRP facilita el proceso de reparación incrementando la angiogénesis en el lugar de la lesión (101).

La deposición y la síntesis de colágeno también ha sido estudiada en los distintos modelos de tendinopatía (105, 108, 109, 110, 111), así como la fuerza mecánica de los tendones tratados con PRP (108, 111, 112, 113), encontrándose un aumento en la síntesis y deposición de colágeno; y un aumento de la fuerza mecánica del tendón en el 75% de los estudios, respectivamente.

Además, varios estudios in vivo reportaron una aceleración de la curación y una mejor organización de las fibras y los haces de colágeno. Además, se observó una regresión del tejido de granulación más rápida en los grupos tratados con PRP comparado con los controles, indicando una tasa de reparación mayor (103, 104, 107, 111, 114).

Todos estos hallazgos pueden indicar que el PRP, en los distintos modelos animales de tendinopatía y en comparación con los controles habitualmente tratados con suero salino, produjo una aceleración de la reparación de la lesión así como una mejor organización de la MEC y un aumento de la fuerza tensora del tejido. Esto podría traducirse, en el tratamiento de tendinopatías con PRP en humanos, en la posibilidad de realizar rehabilitación más pronto disminuyendo las complicaciones asociadas a la inmovilización, un regreso más rápido a la actividad y una mayor satisfacción del paciente (101). Aun así, la traslación de estos resultados en animales debe hacerse con precaución hasta que la investigación sea realizada de manera rigurosa en ensayos clínicos controlados.

Las inyecciones eco-guiadas de plasma rico en plaquetas (PRP), tratamiento en el que se centra esta tesis y cuya composición y efectos biológicos se discutirán más adelante, también es un tratamiento emergente que se utiliza para el tratamiento de tendinopatías crónicas (115). Su efectividad no ha sido demostrada con evidencias suficientes. La tendinopatía más comúnmente tratada con PRP es la epicondilitis, con 9 ensayos clínicos controlados y randomizados y 7 estudios prospectivos controlados en la literatura médica. Las inyecciones de corticoides se usaron como comparadores en 6 estudios, las de sangre autóloga en 3 y anestésicos locales en 2. Un meta-análisis reciente probó que tanto el PRP como la sangre autóloga daban mejores resultados en reducción del dolor y en la mejora de la funcionalidad en epicondilitis comparados con los corticoides. La eficacia del PRP en los desgarros del supraespinoso es controvertida, en 2 estudios de 5, el PRP arrojó mejores resultados que los corticoides y la punción seca. La tendinopatía del rotuliano tratada con PRP se examinó en 4 estudios clínicos controlados y en 8 series de casos. El PRP mejoraba los resultados sólo en algunos casos. La tendinopatía de Aquiles se examinó en 3 estudios prospectivos controlados (en los que se administró una única inyección) y 6 series de casos. Los pacientes mostraron una mejoría en comparación a los valores basales, pues 2 de los estudios no encontraron diferencias con los controles.

Recoger los datos de los diferentes estudios y juntarlos no es fácil ya que las pautas de administración, los métodos de medida de resultados y los comparadores son diferentes entre ellos. El número de inyecciones es controvertido y todavía está bajo discusión.

Además la progresión de la tendinopatía se monitoriza de manera pobre ya que los cuestionarios de autoevaluación no son suficientemente sensibles para discriminar cambios locales. Identificar indicadores moleculares de enfermedad y salud del tendón podrían ayudar a evaluar la progresión de la tendinopatía después de las intervenciones biológicas. Además, identificar y conocer los mecanismos que ejerce el tratamiento sobre el tendón tendinopático a nivel molecular además de conseguir un consenso internacional sobre el diseño de los ensayos clínicos debería perseguirse para poder comprender y comparar ensayos para sacar conclusiones sobre la efectividad del tratamiento.

1.5.2.2 Terapia Celular

Aparte de las terapias biológicas como el PRP, que estimulan la capacidad de reparación intrínseca del tejido, se están desarrollando terapias celulares, que se basan en la inyección o el trasplante de células vivas en la zona que presenta la patología. Estas células pueden ser auto o alogénicas, y pueden estar expandidas *in vitro* para aumentar su número antes de su utilización tras recogerlas mediante la toma de una biopsia del paciente (116, 117, 118, 119); o también se está intentando extraer las células y utilizarlas directamente en quirófano (120, 121, 122, 123, 124) debido a que se evitan las condiciones estrictas de manipulación en el laboratorio impuestas por las agencias reguladoras. El uso de células tiene como intención que desempeñen una doble función: por un lado la de desarrollar su potencial para regenerar la zona aumentando el pool de células reparadoras y por otro lado, la de explotar su capacidad de síntesis de moléculas de señalización paracrina que activen la capacidad de reparación propia del tejido receptor.

Tratando de extrapolar los buenos resultados obtenidos en muchas ocasiones estudios con animales (125), se han realizado diversos estudios en humanos utilizando terapia celular para el tratamiento de tendinopatías (Tabla 6) con resultados prometedores, pero ninguno de ellos es un ensayo clínico controlado y randomizado por lo que se necesita de más investigación en estudios controlados para evaluar su eficacia. Se han utilizado distintos tipos de células cuya idoneidad se discute dependiendo de la fuente de la que se extraen y de su función en la reparación. Los tipos celulares que se han utilizado para ellos son fibroblastos de piel expandidos (116, 118, 119), o bien células de tendón expandidas (117), concentrado de médula ósea que contiene células madre derivadas de médula ósea (BMSCs) (120, 121, 122, 123) y por último la fracción vascular estromal obtenida de tejido adiposo, que contiene células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) (124).

La siguiente tabla resume los estudios clínicos que se han realizado utilizando terapia celular en tendinopatía.

Autor	Diseño del estudio	Tratamiento	Medidas, visitas, Resultados
EPICONDILITIS			
Connell D, 2009	Serie de casos, N=12	Inyección, células derivadas de piel expandidas	A los 6 meses 11/12 pacientes presentaron resultados satisfactorios. Disminución de rasgaduras, formación de nuevos vasos y aumento del grosor
Moon YL, 2008	Serie de casos, N=26. Epicondilitis medial o lateral. Sin respuesta a tratamientos conservadores	BMCs + pucaine tras el desbridamiento artroscópico	Valoración a las 8 semanas, 6 meses, VAS y puntuación de rendimiento de Mayo de codo (MEPS). Sin complicaciones, reducción del dolor, mejora en el MEPS a las 8 semanas y 6 meses
Wang A, 2013, 2015	Serie de casos, pacientes recalcitrantes, N=20	Inyección de células de tendón autólogas expandidas. 2-5 x 10 ⁶ células	Seguimiento al de 1 año, disminución del VAS, mejora rápida en el DASH, disminución de UEFS y mejora de la fuerza de agarre y del MRI. Efecto mantenido al cabo de 4,5 años
HOMBRO			
Centeno CJ, 2015	Serie de casos, 115 hombros en 102 pacientes. Rasgaduras <1.5cm y OA de hombro	Pre-inyección con dextrosa hipertónica, inyección 2-3ml BMCs + PRP + PL	DASH, NPS, MCID diferencias clínicas mínimamente importantes definidas como 2 puntos de reducción en NPS y 10 puntos en el DASH
Ellera Gomes JL, 2012	Serie de casos, rasgaduras completas de manguito rotador, N=14	Cirugía convencional + inyección de BM-MCs en los bordes del tendón	Aumento significativo de UCLA a los 12 meses, 14/14 presentaban integridad completa del tendón por MRI, un paciente recayó tras 2 años
ROTULIANO			
Clarke AW, 2011	RCT, N=46, 60 tendones rotulianos	Fibroblastos dermales + PRP vs PRP + medio sin células (2mL)	Mejora en VISA-P a las 6 semanas, 3 y 6 meses, reducción de la hipoecogenicidad y del tamaño de las rasgaduras en ambos grupos a los 6 meses. Aumento del grosor en el grupo tratado con células

Pascual-Garrido, 2012	Serie de casos, N=5 pacientes con tendinopatía rotuliana refractaria	BMCs sin expandir	Mejora significativa de Tegner y KOOS (ambas subescalas) a los 5 años. 7/8 pacientes se volverían a someter al procedimiento
AQUILES			
Obaid H, 2012	RCT, N=32 pacientes, 40 tendones	Fibroblastos dermales expandidos (10-28 x 10 ⁶) versus anestésicos + fisioterapia	Diferencias significativas en VISA y VAS a los 3 y 6 meses
Tate-Oliver K 2013	Serie de casos, N=3, rasgaduras intersticiales de grosor parcial	Infiltración percutánea ecoguiada de SVF+PRP ≥ 4x	Los pacientes volvieron a la actividad normal tras 12 semanas, la ecografía a los 12 meses mostró la restauración de la estructura normal del tendón. Mejoría mantenida a los 3-4 años

Tabla 6. Estudios clínicos en epicondilitis, tendinopatía de hombro, de tendón rotuliano y de tendón de Aquiles utilizando como tratamiento distintos tipos de terapias celulares. BMC: células de médula ósea, SVF: fracción vascular estromal, BM-MCs: células mesenquimales derivadas de médula ósea, VAS: “Visual Analogue Score”, DASH: “Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand Score”, UEFS: “Upper extremity functional scale”, MRI: resonancia magnética, NPS: “numerical pain scoring system”, MCID: “Minimal Clinically Important Change Score”, UCLA: “UCLA shoulder rating scale”, VISA-P: “Victorian Institute of Sport Assessment scale” P, KOOS: “Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score”.

Para mejorar la eficacia de las terapias biológicas y celulares, se ha propuesto la utilización de terapias de combinación, es decir, utilizar ambas estrategias terapéuticas unidas para combinar sus efectos. En el caso del PRP, no sólo actuaría como un cóctel multi-molecular de factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas que pudiera estimular a las células para aumentar su capacidad terapéutica, sino como un vehículo que permitiera confinar las células en el lugar de la lesión. Se han desarrollado vehículos bio-compatibles para la aplicación de terapias celulares en tendón, como los geles de colágeno, de fibrina, de ácido hialurónico, de alginatos, de ácido poli láctico y poliglicólico, y otros comúnmente usados en ingeniería de tejidos cuya única función es la de funcionar como un andamio que permita a las células permanecer en el tejido y se vaya sustituyendo por MEC mientras los mecanismos de reparación desarrollan su función. Pero no aportan la actividad biológica estimuladora que aporta el PRP y que puede acelerar la curación de la lesión juntando de manera sinérgica el efecto de las células y de la miríada de moléculas presentes en el PRP.

Aunque se han utilizado (118, 122), existe poca cantidad de investigación en el campo de las terapias de combinación, por lo que se requiere de la realización de distintos estudios para saber el efecto del PRP en las células *in vitro* y el efecto de la terapia de combinación *in vivo* en la curación de lesiones en tendones.

2. JUSTIFICACIÓN

La patología tendinosa es común e incapacitante, con importantes repercusiones personales, sociales y económicas. Sin embargo, la investigación traslacional en la biología del tendón es un campo relativamente nuevo, con escasa financiación y un número pequeño de investigadores involucrados. Conscientes de esta situación y su repercusión especialmente en el ámbito laboral y en medicina del deporte, emprendemos la investigación en la biología del tendón y desarrollo de nuevos tratamientos utilizando como herramienta básica los cultivos celulares primarios.

Prevalencia de las tendinopatías en las distintas zonas anatómicas

Las lesiones en los tendones son muy comunes y afectan a personas de todas las edades comprometiendo su actividad, ya que pueden ser provocadas por lesiones deportivas o laborales. Sujetos sedentarios también sufren tendinopatías. La incidencia exacta de las tendinopatías en la población general es difícil de determinar, pero se ha estimado que aproximadamente un 30% de las consultas médicas relacionadas con dolor en el aparato locomotor están relacionadas con lesiones en los tendones.

En miembro inferior, el tendón más susceptible de desarrollar tendinopatías es el tendón de Aquiles, y está relacionada con la práctica de deporte; con una frecuencia del 5.9% en personas sedentarias y de un 50% en deportistas de resistencia de élite. Por otro lado, un tercio de las patologías tratadas en deportistas implican a la rodilla, y de ellas, un cuarto se diagnostica como una tendinopatía de sobrecarga del tendón rotuliano o rodilla de saltador, con una incidencia de un 7 - 40% en deportistas.

En miembro superior, el codo de tenista o epicondilitis es muy común en deportistas y trabajadores de todas las edades que tengan actividad física que implique movimientos de elevación o repetitivos del codo. Hasta un 40% de los tenistas sufren este tipo de patología y un 1-3% de la población general también la padece. La incidencia de esta patología también aumenta con la edad. El codo de golfista es menos común, se suele deber a una sobrecarga en los músculos del antebrazo, la muñeca y los flexores de los dedos. Además, también tiene gran prevalencia la tendinopatía de los tendones del manguito rotador del hombro, especialmente la del supraespinoso. Esta patología está relacionada con movimientos repetitivos del hombro sobre la cabeza como en deportes que implican lanzamientos y en natación; y representa el 18% de las patologías relacionadas con sobrecargas en atletas adultos. También se asocia con determinados

trabajos que exigen movimientos repetitivos del hombro y el levantamiento repentino de peso.

Ausencia de tratamientos que no sean los paliativos

Los tratamientos conservadores actuales para las tendinopatías incluyen modificaciones de la actividad, medicación paliativa que evite el dolor (AINEs) y fisioterapia. Cuando estos tratamientos fallan, existen una serie de opciones terapéuticas inyectables como los anestésicos locales, los corticoides, la sangre autóloga y otros, que han ido evolucionando con el conocimiento de la fisiopatología de la lesión tendinosa. Pero estas terapias no son siempre eficaces y muchas veces son solo paliativas, por lo que las lesiones reaparecen. Esto provoca que la investigación en nuevas terapias biológicas como el PRP o, para casos más severos, las terapias de combinación de células y PRP, mínimamente invasivas y que estimulan los mecanismos de regeneración del propio tendón, sea necesaria.

Los tratamientos biológicos surgen con el fin de regenerar el tendón y recuperar funcionalidad

Los tratamientos biológicos aplicados a las tendinopatías, como el PRP o la terapia celular, se utilizan en medicina privada en todo el mundo, pero no se han aplicado a la medicina pública, a pesar de que su aplicación podría ahorrar costes a largo plazo por la mejora de la regeneración tisular y la recuperación de la funcionalidad total del tendón. Por ello el conocimiento, la optimización y la demostración de la eficacia de estos tratamientos con métodos precisos y rigurosos, es vital para plantear la aplicación de estas terapias en el uso público.

Necesidad de investigación traslacional que desarrolle información con repercusión en la práctica clínica

A menudo, los hallazgos descubiertos en investigación básica tardan mucho tiempo en tener repercusión en la práctica clínica, si es que alguna vez se aplican, debido a los muchos pasos que tienen que darse para que su aplicación terapéutica se lleve a cabo, a la aparición de efectos no deseados en los experimentos *in vivo*, a su elevado coste y a otros inconvenientes.

3. HIPÓTESIS-OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es investigar dos nuevas herramientas biológicas (Plasma Rico en Plaquetas y Células Adultas) utilizadas en Terapias Regenerativas, y describir como modifican los procesos biológicos de reparación tisular en tendón para su aplicación como posibles terapias avanzadas en tendinopatías.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS (por artículos):

3.2.1 Artículo I

Hipótesis

El plasma rico en plaquetas (PRP) tiene efecto estimulador en la regeneración del tendón. Asimismo, el PRP modula la inflamación, con efectos distintos en células sanas y tendinopáticas

Objetivos

- Determinar si el plasma rico en plaquetas (PRP) puede modificar el estatus angiogénico e inflamatorio de células de tendón inflamadas con interleucina-1-beta (IL-1 β), mediante el estudio de la expresión de genes relevantes en el proceso inflamatorio
- Examinar el efecto modulador del plasma rico en plaquetas (PRP) en la secreción de quimiocinas e interleucinas, en células de tendón inflamadas con interleucina-1-beta (IL-1 β)
- Determinar si el plasma rico en plaquetas (PRP) modifica de forma diferente la secreción de proteínas inflamatorias y angiogénicas en células de tendón sanas y tendinopáticas

3.2.2. Artículo II

Hipótesis

El cultivo de células de tendón en tres dimensiones (3D) utilizando hidrogeles de plasma mimetiza mejor las condiciones fisiológicas que el cultivo clásico en dos dimensiones (2D). Por lo tanto es un modelo más preciso para el desarrollo de herramientas terapéuticas.

Objetivos

- Estudiar si la estructura tridimensional del cultivo modifica la morfología celular y la respuesta proliferativa al plasma rico en plaquetas (PRP).
- Determinar la expresión de marcadores genéticos de células de tendón en ambos modelos de cultivo (en 2D versus 3D)
- Estudiar la síntesis de mediadores de la angiogénesis en ambos modelos de cultivo.

3.2.3. Artículo III

Hipótesis

Las distintas formulaciones de plasma tienen diferentes efectos biológicos en las células de tendón patológico. Su utilización y dosificación puede diseñarse de manera que se potencien los efectos biológicos deseados en cada etapa de la reparación del tendón

Objetivos

- Comparar la capacidad quimiotáctica de tres formulaciones de plasma: plasma pobre en plaquetas (PPP), plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma rico en plaquetas leuco-enriquecido (L-PRP) en células de tendón patológico
- Estudiar el potencial anabólico (síntesis de enzimas reguladoras y moléculas de matriz extracelular) de las células de tendón expuestas a cada una de las formulaciones
- Determinar diferencias en la producción de mediadores inflamatorios y angiogénicos en células tendinopáticas tratadas con plasma pobre en plaquetas (PPP), plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma rico en plaquetas leuco-enriquecido (L-PRP)

3.2.4. Artículo IV

Hipótesis

Una terapia de combinación compuesta por células adultas (células de tendón ó células madre derivadas de médula ósea ó fibroblastos de piel) y plasma rico en plaquetas (PRP) puede potenciar la capacidad regenerativa de ambos tratamientos en el tendón patológico. El pre-tratamiento con PRP puede optimizar las condiciones biológicas del tejido receptor patológico mejorando la efectividad de la terapia celular.

Objetivos

- Examinar cual es el fenotipo celular más apropiado (células de tendón, células madre derivadas de médula ósea y fibroblastos de piel) para una intervención biológica regenerativa con plasma rico en plaquetas (PRP), en base al perfil de expresión de moléculas de la matriz extracelular así como de factores anabólicos para tendón.
- Determinar el efecto del medio condicionado de las células de tendón expuestas a plasma rico en plaquetas (PRP) en proliferación, migración, inflamación y síntesis de moléculas de matriz en cada uno de los tipos celulares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de las distintas formulaciones de plasma (artículos I-IV)

Para los experimentos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se prepararon tres formulaciones de plasma distintas: plasma rico en plaquetas (PRP) (artículos I-IV), plasma pobre en plaquetas (PPP) (artículo III) y plasma enriquecido en leucocitos y plaquetas (L-PRP) (artículo III).

La sangre utilizada para preparar los PRPs de los artículos I (PRP tendinopático) y IV se obtuvo de donantes del grupo control participantes en el ensayo clínico randomizado (NCT01945528) que nuestro grupo de investigación estaba llevando a cabo, tras la obtención del consentimiento informado y autorización del Comité de Ética (Anexo 5). Para la preparación de los plasmas utilizados en los artículos II y III, se obtuvo sangre de 4 donantes voluntarios sanos.

La sangre se extrajo utilizando tubos de 9ml con citrato de sodio como anticoagulante (Vacuette; Greiner BioOne, Kremsmunster, Austria). Los tubos fueron centrifugados a 570-600g durante 6-7 minutos y la fracción superior donde se encuentra el PRP fue recogida evitando aspirar el “buffy coat” (anillo blanco que separa el plasma y la fracción roja, en la que se encuentran los leucocitos y algunas plaquetas grandes). Esta formulación de PRP es la misma que se ha utilizado en los ensayos clínicos de nuestro grupo de investigación y se trata de un PRP puro (sin leucocitos) con un enriquecimiento moderado de plaquetas (1.5 – 2,5 veces más que la concentración plaquetaria en sangre) dependiente del hematocrito.

Para preparar el PPP la sangre (extraída en tubos idénticos que los utilizados para el PRP), se centrifugó a 1500g durante 15 minutos con el objetivo de obtener un plasma con una cantidad despreciable de células sanguíneas.

Por otro lado, el L-PRP fue preparado mediante un proceso de doble centrifugación. Primero, la sangre se centrifugó a 100g durante 8 minutos, y la capa superior del tubo conteniendo las plaquetas y los leucocitos se recogió y se midió el volumen (V) obtenido. Para concentrar las plaquetas y los leucocitos, se hizo una segunda centrifugación a 1500g durante 15 minutos, y se resuspendió el pellet en V/2 mL de PPP.

La composición celular de las distintas formulaciones fue analizada utilizando un contador hematológico Coulter (Beckman, Brea, CA, USA).

Para la utilización del plasma en cultivos celulares en los experimentos de todos los artículos, se llevó a cabo la activación plaquetaria utilizando tres ciclos sucesivos de congelación/descongelación a $-20^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$, seguidos de una filtración a través de filtros de jeringa de $0,22\ \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) y congelación a -20°C para su almacenamiento a corto plazo. Este producto en el que las plaquetas se activan mecánicamente por la congelación; en contraste con el llamado sobrenadante de plasma obtenido mediante la activación plaquetaria con trombina o calcio, incluye el fibrinógeno del plasma.

4.2 Biopsias y cultivos celulares primarios (artículos I-IV)

Las biopsias de tendón humano sano (artículos I, II y IV) y tendinopático (artículos I y III) fueron obtenidas de fragmentos sobrantes que hubieran sido descartados de otra forma, durante cirugía de reconstrucción de ligamento cruzado anterior y de desbridamiento del tendón supraespinoso en cirugía de manguito rotador respectivamente, tras la obtención de consentimiento informado de parte de los pacientes y de la aprobación del Comité de Ética de Investigación Clínica de Euskadi (CEIC-CE) y del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Cruces (Anexos 6 y 7).

Los fragmentos de tendón fueron cortados en pequeños trozos y las células fueron obtenidas mediante dos procedimientos diferentes: mediante tratamiento con colagenasa II (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para obtener las células utilizadas en el artículo I, o bien mediante la técnica de los explantes para el resto de artículos (art. II-IV).

El enzima colagenasa II se preparó a una concentración de 0.3% en PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), se añadieron los fragmentos de tejido y se incubaron a 37°C durante 40 minutos. La suspensión celular obtenida tras la incubación se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos y se resuspendió en medio de cultivo completo, es decir, DMEM F-12 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con un 5% de solución de Penicilina/Estreptomicina (5,000 U/mL Pen 5,000 U/mL Strep Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y 10% de FBS (Hyclone, GE Healthcare, Cleveland, Ohio, USA). Esta solución celular se filtró a través de filtros para células (*Cell Strainers*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), se sembró en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Corning, NY, USA) y se incubó a 37°C y 5% CO_2 .

Las células utilizadas en los artículos II, III y IV, obtenidas por la técnica de los explantes,

se consiguieron mediante el cultivo directo de los pequeños trozos de tejido en las placas de 6 pocillos a 37°C y 5% CO₂; que provoca que, tras un tiempo de espera de 4 a 8 días aproximadamente, las células presentes en los tejidos migren al pocillo y se obtenga un cultivo primario.

Cuando los cultivos, tras la renovación del medio de cultivo completo cada 3 días, llegaron a una densidad celular de subconfluencia, las células fueron levantadas de la superficie de la placa de cultivo mediante el tratamiento con el enzima tripsina (TryPLE select 1x, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y fueron traspasadas a frascos de cultivo de mayor tamaño T75 (Corning, NY, USA) a una densidad inicial de 4000 células/cm². Antes de añadirlas al frasco de cultivo, para añadir la cantidad exacta de células, fueron contadas mediante una cámara Bürker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) o un contador celular automático TC10 (BioRad, Hercules, CA, USA) utilizando exclusión mediante azul Trypan que detecta solo células viables (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

La morfología y la densidad celular fueron observadas diariamente utilizando un Microscopio óptico de contraste de fases (Nikon, Tokyo, Japon). Cuando las células llegaron a confluencia, o bien se utilizaron para realizar un experimento o fueron congeladas en crioviales, (Corning, NY, USA) utilizando 90% de FBS y 10% de DMSO (Sigma Aldrich, St-Louis, Mo, USA), y almacenadas en tanques de N₂ líquido para su conservación a largo plazo.

Las células fueron utilizadas en todos los experimentos en los pases 1-3, para evitar pases altos que pueden provocar la des-diferenciación celular. Antes de comenzar los experimentos, las células fueron incubadas en medio de cultivo sin FBS durante 24h para sincronizar sus ciclos celulares.

En los artículos II, III y IV, para realizar los tratamientos en los hidrogeles con plasma, tras levantar con tripsina las células, centrifugarlas y contarlas, el DMEM F-12 fue suplementado con 10% de plasma y las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 4000 células/cm².

En el artículo I, para evitar la coagulación del plasma en los experimentos en 2D debido a la presencia de calcio en el medio de cultivo, se añadió heparina (Hospira, Lake Forest, Illinois, USA) a una concentración de 2U/mL. Por el contrario, para los experimentos de los artículos II, III y IV, realizados en hidrogeles de plasma en 3D, no se añadió heparina por lo que el calcio presente en el medio de cultivo (1.05 mM) indujo la coagulación del plasma mediante la formación de trombina y la subsecuente rotura del fibrinógeno y la

polimerización de los dímeros de fibrina. Así, las células quedaron capturadas en los hidrogeles de plasma. La polimerización de la fibrina ocurría 20-30 minutos después de añadir la mezcla de células, plasma y DMEM F-12 a 37°C.

Para el experimento de co-cultivo indirecto (artículo IV), 3 viales de células madre de médula ósea humanas (BM-MSC) y de fibroblastos de piel adulta humana distintos fueron comprados a Lonza (Lonza, Basel, Switzerland). Estas células fueron cultivadas en DMEM Glutamax (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y DMEM F-12 respectivamente, ambos suplementados con 10% FBS a no ser que se especifique lo contrario.

4.3 Ensayos de proliferación y viabilidad celular (artículos II-IV)

Para estudiar la proliferación celular en 2D y 3D en el artículo II, así como el efecto de las distintas formulaciones de plasma en la capacidad proliferativa de tenocitos tendinopáticos en el artículo III y el efecto del medio condicionado de tenocitos en la capacidad proliferativa de BM-MSCs y fibroblastos de piel en el artículo IV, se utilizó el ensayo de proliferación celular colorimétrico XTT ((2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Cell Proliferation Kit II, Roche, Basel, Switzerland). Las células se recogieron de los frascos T75, se contaron y se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning, NY, USA). La proliferación celular se cuantificó a las 24, 48, 72 y 96h. En cada momento temporal, se añadieron 50µL de XTT a los 100µL de medio de cultivo del pocillo y se dejaron incubando 4h a 37°C (concentración final de XTT 0.3 mg/mL). Durante este tiempo, el XTT se rompe mediante un proceso realizado por los enzimas deshidrogenasas mitocondriales por un mecanismo molecular complejo. Esta reacción de reducción química sólo se lleva a cabo en las células viables y metabólicamente activas, por lo que sólo se detectan dichas células, ya que producen un compuesto químico derivado del XTT, el formazan, de color naranja, detectable en los pocillos mediante un lector de micro placas ELISA (PolarStar Omega, BMG Labtech, Ofenburg, Germany) a 470nm.

Los tiempos de duplicación de las poblaciones celulares fueron calculados en la fase exponencial de la proliferación (<http://www.doubling-time.com/compute.php>) [para determinar las tasas de proliferación de cada tipo celular con cada tratamiento.](#)

4.4 Extracción de ARN de los cultivos en 2D y 3D (artículos I-IV)

Para los estudios de expresión génica de los artículos I-IV, se extrajo el ARN de las células en 2D (artículos I y II) y en 3D (artículos II, III y IV).

Para realizar la extracción de ARN de los cultivos en 2D las células fueron recogidas por tripsinización, centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos y los pellets celulares fueron usados para la extracción de ARN total con el kit “High Pure RNA Isolation Kit” (Roche, Basel, Switzerland) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN total de los cultivos en 3D (artículos II, III y IV) fue extraído mediante el sistema de Trizol y fenol cloroformo (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA). La concentración y la pureza del ARN se determinaron utilizando el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.5 Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (artículos I-IV)

En los experimentos de análisis de expresión génica (artículos I, II, III y IV), 1µg de ARN fue retro transcrito a cADN utilizando hexámeros aleatorios en un volumen total de 20µL con el kit “SuperScript® III First-Strand Synthesis System” (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), el cADN obtenido de cada muestra fue diluido 5 veces y 2µL de cDNA (20 ng) fue mezclado con “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y 5pmoles de cebadores (primers) para obtener un volumen final de 20µL. Las reacciones de qPCR fueron realizadas en un sistema de PCR ABI-7900 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por triplicado para cada muestra.

Los niveles de expresión de los genes analizados fueron analizados en comparación con la media de la expresión de dos genes de expresión constitutiva: GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), gen de alta expresión y TBP (proteína de unión a TATA), de expresión moderadamente baja; para incrementar la precisión de los resultados. Los datos de expresión génica fueron analizados utilizando el método de $2^{-\Delta Ct}$ o bien el de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (en el que Ct es el ciclo umbral), dependiendo de la hipótesis del experimento.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Secuencia del cebador (3'-5')	T ^a (°C)
GAPDH	GCATTGCCCTCAACGACCAC	CCATGAGGTCCACCACCCTGT	58
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA	58
COL1A1	GGCAACAGCCGCTTCACCTAC	GCGGGAGGACTTGGTGGTTTT	58
COL2A1	AACCAGATTGAGAGCATCCG	AACGTTTGCTGGATTGGGGT	55
COL3A1	CACGGAAACACTGGTGGACAGATT	ATGCCAGCTGCACATCAAGGAC	58
DCN	GGTGGGCTGGCAGAGCATAAGT	TGTCCAGGTGGGCAGAAGTCA	58
ACAN	ACAGCTGGGGACATTAGTGG	GTGGAATGCAGAGGTGGTTT	55
VCAN	TGGAATGATGTTCCCTGCAA	AAGGTCTTGGCATTCTTCTACAACAG	58
FN	TTTGCTCCTGCACATGCTTT	TAGTGCCTTCGGGACTGGGTTT	58
FMOD	CAGTCAACACCAACCTGGAGAACC	TGCAGAAGCTGCTGATGGAGAA	58
HAS2	GTCCCGGTGAGACAGATGAG	ATGAGGCTGGGTCAAGCATAG	55
COMP	CCGACAGCAACGTGGTCTT	CAGGTTGGCCAGATGATG	58
SCX	CAGCCCAAACAGATCTGCACCTT	CTGTCTTTCTGTGCGGGTCTT	58
TNMD	GAAGCGGAAATGGCACTGATGA	TGAAGACCCACGAAGTAGATGCCA	60
MKX	CATCGTCATCAGAAGTGAAGGCA	TCTGTAGCTGCGCTTTCACCC	58
ITGA2	TGGAATCCTTTTGCTGTTAGCTCTGG	CAGCTACTGAGCTCTGTGGTCTCAT	58
ITGA5	CTGTGGGGTGGCCTTCGGTTT	C	58
ITGA11	CTCAGACGGTAGCATTGAGTGTGTG	CGTGCCTTTGCGAGTTGTTGAG	58
ITGB1	GGATATTACTCAGATCCAACCACAG	GCTGAACTCAAATCAAGACGGAA	58
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	AG	58
IL-6	GAGGCACTGGCAGAAAACAACC	TCAATGGGATAGTCTTCAGCTCTCT	58
IL-6R	AAGACCCCCACTCCTGGAAC	TG	58
IL-8	CTGTCTGGACCCCAAGGAAAAC	GCTGTAGTGTGGGAGGTTGAA	55
COX1	GGTTTGGCATGAAACCCTACACCT	CCTCAAACCTCCAAAAGACCAGTGAT	58
COX2	AAGTGCAGCTTTTCAAGGATGG	G	58
TGF-β	GAGGTCACCCGCGTGCTAATG	CGTGGATGACACAGTGATGCT	60
IL-1β	TCCAGGGACAGGATATGGAGCA	GCAACCCTACAACAGACCCACAC	57
IL-1βR	GGTGACAGTAACTGGTGT	CCTCCAACCTCTGCTGCCATCT	58
ADAMTS-4	GACTGTTGGTGGCAGATG	TGCTCAGGGACTTGAGGAGGGT	58
ADAMTS-5	ATGAGGAGCACTACGATGCAGCTA	CACGGGTTTACAGGTACCGCTTCT	58
MMP-1	CAACTCTGGAGTAATGTCACA	AGGCCCCAAGGCCACAGGTATTT	58
MMP-3	TTTTGGCCATCTCTTCCTTCA	ACGTTGGGGAAGACATTGTT	52
TIMP-1	GGCCTTAGGGGATGCCG	TCACTGTTAGCAGGTAGCGCTTTA	52
IL-33	GGAAGAACACAGCAAGCAAAGCCT	CTGTGATGGTGGCTGAAGTGCAT	60
		TACATCAAAGCCCCGATATCA	58
		TGTGGATGCCTCTTGGGTATC	55
		CGGCTATCTGGGACCGCA	52
		TAAGGCCAGAGCGGAGCTTCATAA	60

Tabla 7. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los cebadores utilizados para las PCRs cuantitativas realizadas para los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

4.6 Arrays semicuantitativos de perfil de secreción proteica (artículo II)

Para determinar si el sistema de cultivo (hidrogel de PRP en 3D o 2D, artículo II) influía en la capacidad angiogénica de las células de tendón, se realizó la determinación de los perfiles de secreción proteica de las muestras estudiadas mediante el Array de RayBio®: Human Angiogenesis Antibody Array G-Series 1000 (Cat# AAH-ANG-G1000-4,) Ray-Bio® Human Angiogenesis Antibody Array G-Series 1000, en los que se hizo un screening simultáneo de múltiples citoquinas y quimiocinas involucradas en angiogénesis. Los arrays de proteínas tienen adheridos muchos anticuerpos diferentes en un soporte de cristal. Cada anticuerpo es específico y captura su proteína diana de la compleja mezcla proteica que contienen los sobrenadantes celulares obtenidos de los cultivos. Esta reacción se continúa con la detección y la cuantificación de la señal obtenida.

Los ensayos fueron llevados a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las señales obtenidas fueron normalizadas frente a controles positivos que representan cantidades iguales de inmunoglobulinas biotiniladas impresas directamente en el array. Este Array aporta una cuantificación semi-cuantitativa de múltiples proteínas pero requiere de posterior confirmación y cuantificación. Por ello, los resultados positivos considerados interesantes para cada trabajo, fueron validados utilizando kits comerciales de ensayos ELISA (Sandwich Enzyme linked Immunosorbent Assays).

4.7 ELISAs (artículos I-IV)

Para la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizaron diversos kits de ELISA (solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assays) y EASIA (Solid phase enzyme amplified sensitivity immunoassays).

Las citoquinas y los factores de crecimiento, relacionados con angiogénesis, reparación e inflamación, cuantificados mediante esta técnica en los distintos artículos fueron los siguientes: HGF (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA), VEGF (-165), (Invitrogen Corporation, Caramillo, CA, USA and Peptide House, London, UK), GRO-alpha/CXCL1, MCP-1/CCL2 (Ray-Biotech Inc, Norcross, GA, USA and Peptide House, London, UK), PGE2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), RANTES/CCL5, IL-6/CXCL6, IL-8/CXCL8 (Biosource Europe SA, Nivelles, Belgium and Peptide House, London, UK), CTGF e IL-1 β (Peptide House, London, UK). SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase, enzima necesaria para visualizar los resultados

de algunos ELISAs de la casa Peprtech, fue adquirida de KPL (Gaithersburg, Maryland, USA).

Todos los kits fueron utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las absorbancias fueron medidas en las microplacas en un lector de placas ELISA (PolarStar Omega, BMG Labtech, Ofenburg, Germany) y la concentración de las proteínas fue calculada utilizando curvas estándar.

La contribución del 10% de PRP fue también cuantificada para restarla a la cantidad total de citoquinas que fue finalmente normalizada con el contenido celular cuantificado indirectamente (cantidad de proteína total) para obtener la cantidad de citoquina exacta producida por las células.

4.8 Cuantificación de proteína total (artículo III)

Para normalizar los resultados de los ELISAs en el artículo III, se determinó la cantidad de proteína total en los cultivos en 3D. Para ello, los hidrogeles fueron recogidos, centrifugados y se añadió 100µl de buffer de lisis Pierce® RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con 1% de Cóctel Inhibidor de Proteasas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Esta suspensión se agitó con un vórtex, se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente para permitir la lisis celular y la subsecuente liberación de las proteínas intracelulares, y se centrifugó a 15000rpm a 4°C durante 15 minutos. Los restos celulares quedaron en el pellet y se recogieron los sobrenadantes en los que estaba contenida la proteína total de cada muestra que posteriormente se cuantificó mediante el ensayo de cuantificación de proteínas “Pierce BCA Protein Assay” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.9 Determinación del contenido total de Proteoglicanos y Glucosaminoglicanos (artículo I)

En el artículo I, el contenido total de Proteoglicanos y Glucosaminoglicanos se determinó en los sobrenadantes celulares mediante el Kit colorimétrico Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay (Biocolor, Carrickfergus, NorthernIreland, UK) utilizando las diluciones oportunas para cada muestra siguiendo las instrucciones que provee el fabricante. La absorbancia de las muestras añadidas a una microplaca se leyó posteriormente en un lector de ELISAs (PolarStar Omega, BMG Labtech, Ofenburg,

Germany) y el contenido total en las muestras se determinó mediante el uso de una recta estándar.

4.10 Inmunofluorescencia (artículo II)

En el artículo II, la morfología celular en 2D y en 3D se analizó utilizando técnicas inmunocitoquímicas. Las células se sembraron en una micro placa estéril de 35mm de alto (35 mm high μ -Dish, IBIDI, GmbH, Germany) con DMEM F12 suplementado con 10% PRP que, o bien estaba antiocagulado con heparina (2D) o bien se coaguló en la micro placa (3D). Después de 96h, las células se fijaron con solución neutra tamponada de formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) durante 15 minutos y se lavaron dos veces con PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Más tarde, las placas se incubaron con solución de bloqueo (95% PBS 5% FBS, 0.1% Triton X-100; Sigma-Aldrich, St-Louis, Mo, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se aspiró la solución de bloqueo y las placas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -tubulin-Cy3 (Sigma-Aldrich, St-Louis, Mo, USA) a una dilución 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo, las micro placas fueron lavadas dos veces con solución de lavado (PBS y Triton X-100 0.1%) y se añadió Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St-Louis, Mo, USA), para la observación de los núcleos celulares, a una concentración de 2 μ g/ml. Las placas fueron observadas mediante un microscopio de fluorescencia Nikon (Nikon Eclipse TE-2000E, Tokyo, Japan).

4.11 Ensayo de Quimiotaxis y Migración (artículos III y IV)

El ensayo de quimiotaxis y migración permite conocer diversos parámetros relacionados con el movimiento celular y permite testar compuestos para cuantificar su capacidad quimiotáctica en distintos tipos celulares. Para ello, las células fueron levantadas, contadas utilizando un contador celular automático (TC10 Automated Cell Counter, BioRad, Hercules, California, USA) y resuspendidas a una concentración de 3×10^6 células/ml en DMEM F12 o bien DMEM Glutamax, dependiendo del tipo celular, suplementado con un 2% de FBS para permitir la adhesión celular. 6 μ l de dicha suspensión celular fueron cargados en una micro cámara de quimiotaxis 3D de Ibidi (μ -Slide Chemotaxis 3D chamber, Ibidi GmbH, Martinsried, Germany) que fue incubada durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂ para que las células se adhirieran. Tras la adhesión celular, los compartimentos de cada lado de la cámara fueron rellenados con 65 μ l de medio

de cultivo (-) o bien con 65µl de medio de cultivo suplementado con la sustancia quimiotáctica a testar (+). Para comparar el potencial quimiotáctico de los distintos plasmas u otras posibles sustancias quimiotácticas (medio condicionado), se llevaron a cabo experimentos independientes. Además, se realizaron controles positivos (+/+) y negativos (-/-).

El experimento se mantuvo durante un periodo de 24 horas para cada condición experimental y se realizó una fotografía secuencial cada 10 minutos con una cámara ORCA ER (Hamamatsu, Japan) acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon, Tokyo, Japan) con una magnificación de 10x.

Las fotografías obtenidas fueron importadas al software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) y las células fueron monitorizadas utilizando el plugin “Manual Tracking” (Fabrice P. Cordelières, Institut Curie, Orsay, France). Un mínimo de 30 células se monitorizó para cada experimento. Los datos obtenidos se analizaron con otro plugin del software ImageJ “Chemotaxis and Migration Tool” (Ibidi GmbH, Martinsried, Germany) para obtener distintos parámetros como la velocidad (µm/hora), la direccionalidad (µm), el desplazamiento del centro de masa (COM, µm), los índices de migración hacia delante (FMI) y la significación utilizando el test de Rayleigh que, junto con los demás parámetros, permiten discernir si la sustancia testada es quimiotáctica o no lo es.

4.12 Estadística (artículos I-IV)

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado para cada muestra biológica. Los datos están expresados como media y error estándar, intervalos de confianza del 95% o medianas y percentiles 25-75. Para los ensayos de proliferación celular, se utilizó ANOVA seguida de comparaciones post-hoc de Bonferroni. Los experimentos de expresión génica se analizaron utilizando el test de Kruskal-Wallis y los valores de p se determinaron mediante el U test de Mann-Whitney para datos independientes no paramétricos. Las correlaciones se estudiaron utilizando las correlaciones de rangos de Spearman. Para comparar muestras antes y después de un tratamiento los valores de p se calcularon utilizando la T de Student para datos paramétricos o el test de Wilcoxon para datos no paramétricos apareados. $P < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Los datos fueron analizados utilizando SPSS para Windows versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Artículo I

Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. **Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes.** Clin Orthop Relat Res. 2015 May; 473(5):1624-34.

El mecanismo de acción del plasma rico en plaquetas (PRP) en células de tendón patológico no se conoce con exactitud. Para investigarlo, en este estudio, se pre-trató a las células de tendón con interleucina-1-beta (IL-1 β) durante 48 horas, un potente mediador pro-inflamatorio, y a continuación se administró plasma rico en plaquetas (PRP) (72 horas) para valorar su efecto antiinflamatorio. Para ello, se examinó la expresión génica de proteínas moduladoras de angiogénesis e inflamación y de moléculas de matriz. Además, se cuantificó la producción de citoquinas involucradas en los procesos de reparación tisular, y se compararon las diferencias entre células inflamadas derivadas de tejido sano y derivadas de tejido tendinopático.

Resultados

El PRP utilizado en este estudio es PRP puro sin leucocitos ni eritrocitos, obtenido de 8 donantes (4 hombres y 4 mujeres), 4 de ellos voluntarios sanos (edad media: 41 \pm 11,91 años) y 4 con una epicondilitis lateral participantes en el ensayo clínico que se está llevando a cabo en nuestro grupo (NCT01945528) (edad media: 40 \pm 10,53 años). El PRP tenía un enriquecimiento de plaquetas de 2,30 \pm 0,68 veces más que la sangre periférica. Las células de tendón de 2 donantes sanos se trataron con los 4 PRPs de los donantes sanos, y las de 2 donantes tendón tendinopático con los 4 PRPs de donantes con tendinopatía. Los experimentos se realizaron por triplicado [157].

5.1.1. El tratamiento con PRP afectó a la expresión génica de genes relacionados con la matriz extracelular y con los procesos inflamatorios en células inflamadas

El tratamiento con PRP tras la exposición a 1ng/ml de IL-1 β produjo marcados efectos en las células de tendón (n=16) a nivel de expresión génica (Figura A-D).

La expresión de los genes de matriz extracelular *COL1A1* y *COL3A1* disminuyó de manera significativa tras el tratamiento con PRP en comparación con los niveles de expresión obtenidos tras el tratamiento con IL-1 β (p=0,029) para ambos genes (Fig. 20A).

Los niveles de expresión del enzima *HAS2* no se vieron afectados por el tratamiento con PRP ($p=0,282$). Por otro lado, el PRP también disminuyó la expresión de los enzimas relacionados con la degradación de la matriz extracelular *MMP1* y *MMP3* ($p=0,029$ para ambos genes) y del inhibidor de metaloproteasas *TIMP1* ($p=0,019$). Por el contrario, la expresión del enzima *ADAMTS4*, que degrada los proteoglicanos de la matriz extracelular, no se vio afectada por el tratamiento ($p=1,0$) (Fig. 20B).

El tratamiento de las células con PRP tras la exposición a $IL-1\beta$, también produjo una bajada de la expresión de las interleucinas reguladoras de la inflamación *IL1\beta* ($p=0,029$), *IL6* ($p=0,026$) y su receptor soluble *IL6R* ($p=0,029$) e *IL8* ($p=0,026$), así como el enzima modulador de la inflamación *COX2* ($p=0,029$). El tratamiento no afectó a la expresión génica del receptor de *IL1\beta* ($p=0,576$) y el factor de crecimiento *TGF\beta* ($p=1,0$) (Fig. 20C y 20D).

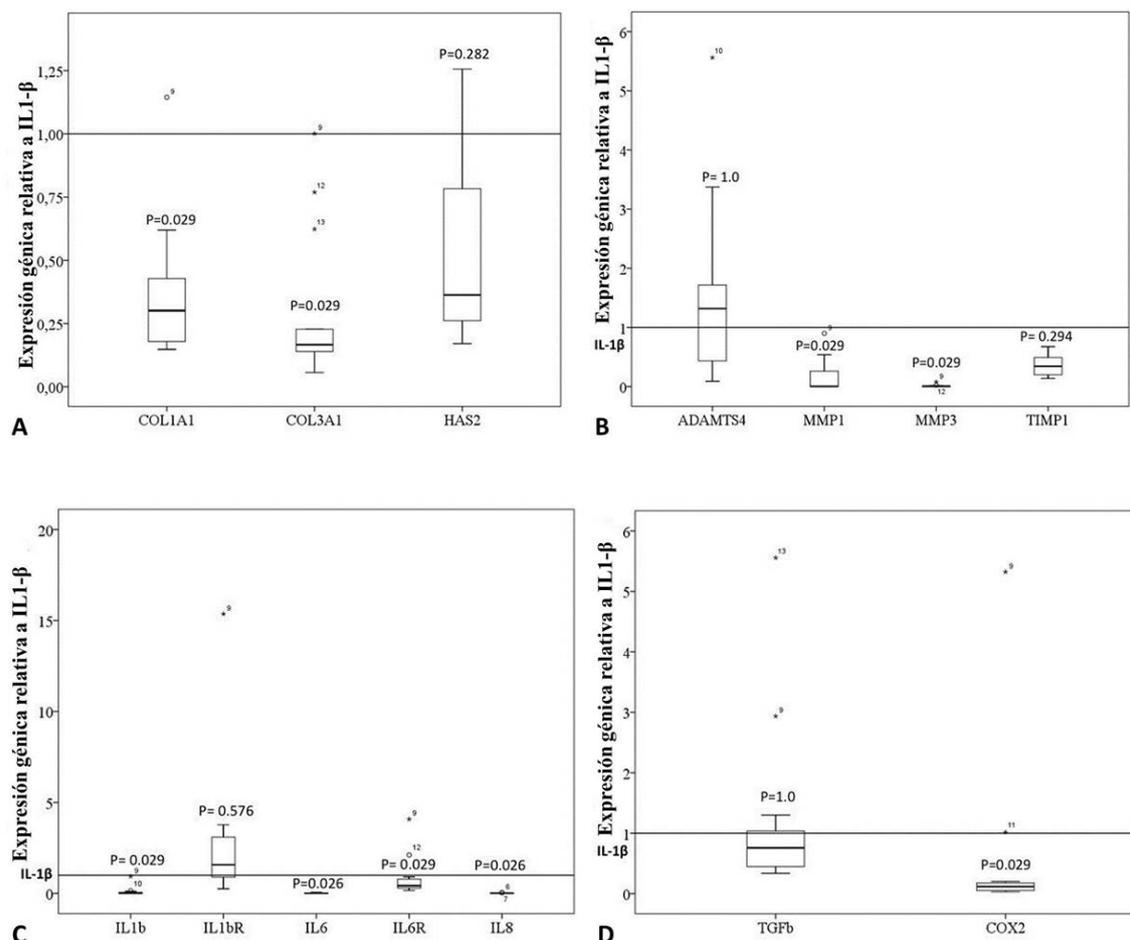


Figura 20. Expresión génica relativa, obtenida tras el tratamiento con PRP de las células de tendón durante 72 horas, calculada con respecto a los valores obtenidos con el tratamiento con $IL-1\beta$, de proteínas relacionadas con la matriz extracelular (A, B) (*COL1A1*, *COL3A1*, *HAS2*, *ADAMTS4*, *MMP1*, *MMP3*, *TIMP1*) y de moduladores de la inflamación (C, D) (*IL1\beta*, *IL1\beta R*, *IL6*, *IL6r*, *IL8*, *TGF\beta*, *COX2*). Los valores se calcularon mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la media de los

valores de los genes de referencia *GAPDH* y *TBP*. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

5.1.2. El PRP moduló la secreción de interleucinas y quimiocinas reguladas al alza en células de tendón inflamadas

Las células de tendón (n=16) sintetizaron las quimiocinas IL-6, IL-8 y MCP-1 en elevadas concentraciones (1485±302 ng/10⁶ células, 768±175 ng/10⁶ células y 475±78 ng/10⁶ células respectivamente) en respuesta al tratamiento con IL-1β. Pero los niveles de estas quimiocinas se redujeron significativamente tras la exposición a PRP. La concentración de IL6 disminuyó a 524±64 ng/10⁶ células (p=0,002), la de IL-8 a 414±34 ng/10⁶ células (p=0,01) y la de MCP-1 a 135±22 ng/10⁶ células (p=0,001). En cambio, la secreción de GRO-α no se modificó por la exposición a PRP (p=0,163) (Fig. 21A).

Por otro lado, la secreción de los factores de crecimiento HGF y VEGF aumentó tras el tratamiento con PRP. Las células tratadas con IL-1β, secretaron HGF a una concentración de 8.7±3,7 ng/10⁶ células y VEGF a una concentración de 6±0,4 ng/10⁶ células, en cambio, tras el tratamiento con PRP, los niveles de HGF subieron a 37±10 ng/10⁶ células (p=0,002) y los de VEGF a 13±0,7 ng/10⁶ células (p=0,001). Los niveles de PGE2 no variaron en respuesta al PRP (p=0,703) (Fig. 21B).

A pesar de las propiedades antiinflamatorias del PRP, la secreción de la quimiocina moduladora de la respuesta inmune RANTES aumentó en respuesta al tratamiento con PRP (p=0,001). Cuando las células fueron tratadas con IL-1β, secretaron 53±18 ng/10⁶ células de RANTES, en cambio, tras la exposición a PRP durante 72 horas, los niveles aumentaron hasta 247±25 ng/10⁶ células (Fig. 21B).

Finalmente, los niveles totales de GAGs, componentes esenciales de la matriz extracelular, aumentaron significativamente en células de tendón inflamadas tras el tratamiento con PRP, pasando de secretar 13±4 μg/10⁶ células a 122±20 μg/10⁶ células (p=0,001) (Fig. 21B).

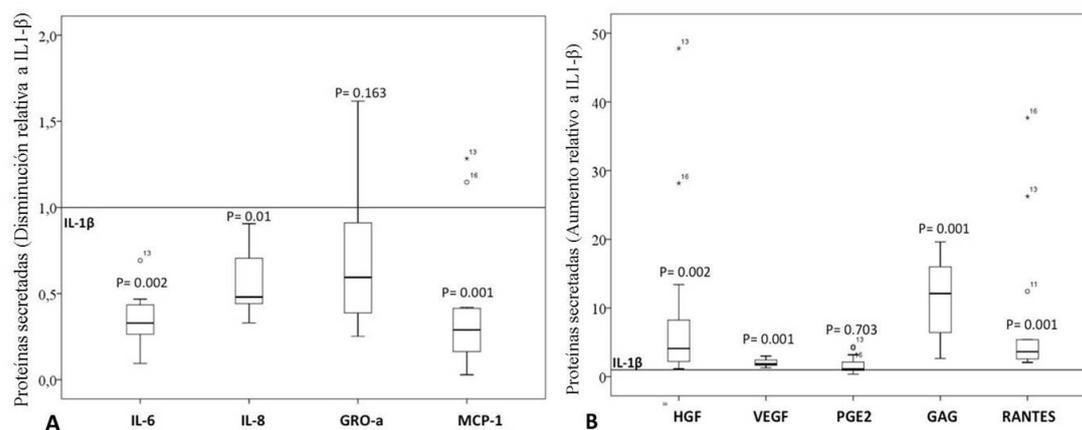


Figura 21. Secreción relativa de moléculas inflamatorias y angiogénicas (IL-6, IL-8, GRO- α , MCP-1, HGF, VEGF, PGE2, GAG, RANTES) por células de tendón tras el tratamiento con PRP durante 72 h, comparadas con las medidas de concentración obtenidas tras la exposición a 1ng/ml de IL1- β . Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Las interacciones entre las distintas citoquinas se reflejaron mediante el hallazgo de correlaciones fuertes entre la secreción de proteínas inflamatorias y angiogénicas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. La MCP-1 presentó evidencias de una correlación positiva con IL-6 e IL-8 ($\rho=0,949$ y $\rho=0,738$ respectivamente, $p=0,001$ para ambos) y negativa con HGF ($\rho=-0,406$; $p=0,049$). El VEGF correlacionó positivamente con RANTES y GRO- α ($\rho=0,682$; $p<0,001$; $\rho=0,559$; $p=0,005$). Por el contrario, se observó una correlación negativa entre VEGF y PGE2 ($\rho=-0,567$; $p=0,004$). IL-6 e IL-8 mostraron correlación positiva ($\rho=0,734$; $p<0,001$), e IL-8 correlacionó positivamente con GRO- α ($\rho=0,454$; $p=0,026$) y negativamente con HGF ($\rho=-0,628$; $p=0,001$). RANTES y GRO- α también mostraron evidencia de correlación positiva ($\rho=0,566$; $p=0,004$); y asociación negativa con PGE2 ($\rho=-0,559$; $p=0,005$).

5.1.3. Tanto la IL-1 β como el PRP produjeron un cambio en la morfología celular de células sanas y tendinopáticas

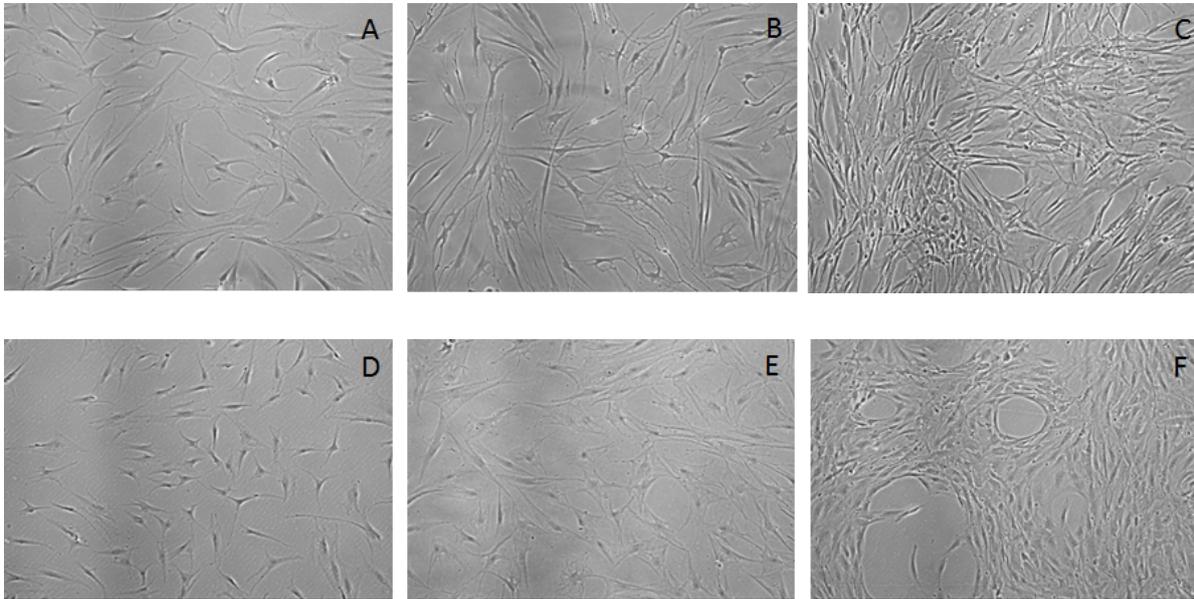


Fig 22. Morfología celular observada a 10 aumentos en el microscopio de contraste de fases, de células derivadas de tendones sanos (A, B, C) y derivadas de tendones tendinopáticos (D, E, F) tras 30h de cultivo con privación de suero (A, D), tras 48h de tratamiento con 1ng/ml de IL1- β (B, E) y tras 72 horas de tratamiento con PRP (C, F).

El tratamiento con 1ng/ml de IL-1 β durante 48h (Fig. 22B y E) afectó a la morfología celular de manera visible, produciendo alteraciones asociadas con un fenotipo senescente, como el aumento de tamaño de las células y la aparición de fibras en el citoesqueleto. El subsecuente tratamiento con PRP durante 72 horas (Fig. 22C, F) produjo un aumento de la densidad celular y, a simple vista, pareció ejercer un efecto “rescate” de los efectos nocivos provocados por la IL-1 β ya que desaparecieron todos los síntomas visibles de toxicidad producidos por el tratamiento. Estos efectos fueron observados de igual manera en células derivadas de tejido sano (Fig. 22A, B, C) y de tejido tendinopático (Fig. 22D, E, F).

5.1.4. El PRP afectó de manera similar a la secreción de proteínas mediadoras de la inflamación en células sanas y tendinopáticas

El PRP moduló de manera similar la secreción de proteínas y mediadores inflamatorios en células sanas (n=8) y tendinopáticas (n=8) inflamadas estudiadas mediante ensayos inmuno-absorbentes ligados a enzimas (ELISAs). No se observaron diferencias significativas en la secreción de IL-6 (p=1,0), IL-8 (p=1,0) y MCP-1 (p=0,592) (Fig. 23).

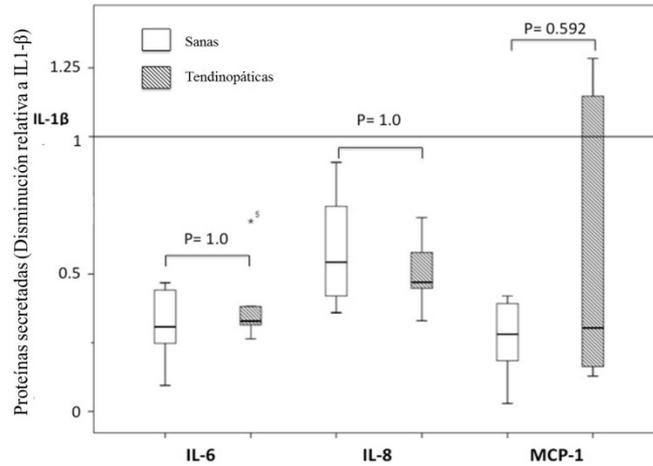


Figura 23. Comparación de la secreción de las interleucinas moduladoras de la inflamación IL-6, IL-8 y MCP-1 entre células sanas y tendinopáticas inflamadas tratadas con PRP. La secreción está expresada de forma relativa comparando niveles tras el tratamiento con PRP de las células inflamadas con los niveles medidos tras el tratamiento con IL-1 β . Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

En cambio, el PRP sí que indujo un aumento 10 veces mayor de la concentración de RANTES secretada por células tendinopáticas inflamadas comparadas con las células sanas ($p=0,005$). No así en GRO- α ($p=0,103$) ni en GAGs ($p=1,0$) (Fig. 24).

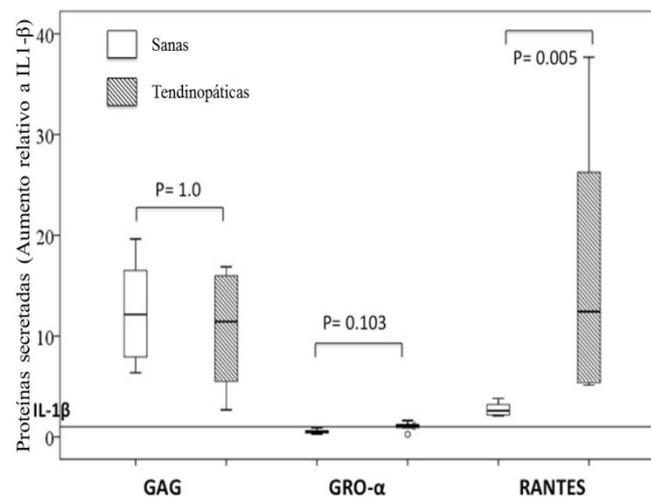


Figura 24. Comparación de la secreción de los mediadores de la respuesta inmune GRO- α y RANTES, además de la cantidad total de GAGs por células sanas y células tendinopáticas. La secreción está expresada de forma relativa comparando niveles tras el tratamiento con PRP de las células inflamadas con los niveles que se midieron tras el tratamiento con IL-1 β . Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Por su parte, los niveles del factor de crecimiento HGF secretados sí eran diferentes entre células sanas y tendinopáticas inflamadas tratadas con PRP. Las células tendinopáticas

secretaron 3 veces más HGF que las células sanas ($p=0,005$). En cambio, la secreción del factor de crecimiento VEGF y el enzima PGE2 no fue diferente entre ambos tipos celulares ($p=0,592$ para ambas moléculas) (Fig. 25).

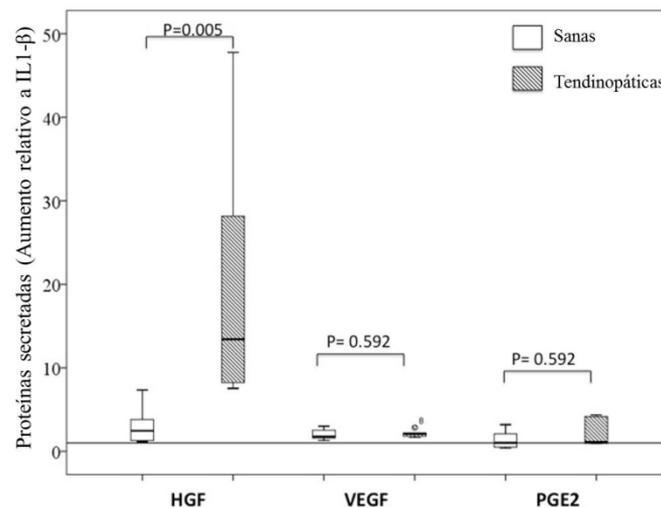


Figura 25. Comparación de la secreción de los factores HGF y VEGF, además del enzima mediador de la inflamación PGE2, por células sanas y células tendinopáticas. La secreción está expresada de forma relativa comparando niveles tras el tratamiento con PRP de las células inflamadas con los niveles que se midieron tras el tratamiento con IL-1 β . Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

RESUMEN DE RESULTADOS:

1. En células de tendón inflamadas, el PRP disminuyó la expresión génica de los mediadores moleculares *IL1 β* , *IL6*, *IL6R*, *IL8* y *COX2*. Además disminuyó la expresión de genes de moléculas implicadas en la degradación de la MEC como *MMP1*, *MMP3* y *TIMP1*.
2. El tratamiento con PRP también moduló la secreción de las citoquinas IL-6, IL-8 y MCP-1, reguladas al alza en células de tendón inflamadas, disminuyendo sus niveles. Al contrario, los factores de crecimiento HGF e IGF aumentaron sus niveles.
3. En contra de estas propiedades antiinflamatorias, el tratamiento con PRP no disminuyó la secreción de GRO- α , y aumentó la de RANTES en células de tendón inflamadas.
4. Las células obtenidas de muestras de tendón sano y de tendinopático no mostraron diferencias morfológicas ni de secreción proteica tras el tratamiento. Con la única excepción de RANTES y HGF, cuyos niveles eran más elevados en células tendinopáticas.

5.2. Artículo II

Rubio-Azpeitia E, Sanchez P, Delgado D, Andia I. **Three Dimensional Platelet-Rich Plasma Hydrogel Model to Study Early Tendon Healing**. Cells Tissues Organs. 2015 Nov; 200(6): 394-404.

En investigación pre-clínica *in vitro*, las condiciones que se establecen en los cultivos celulares pueden condicionar los resultados que se obtienen, por ello, se debe intentar mimetizar de la mejor manera posible la situación fisiológica. Para ello, establecimos un nuevo modelo para estudiar las células de tendón cultivadas en hidrogeles de plasma rico en plaquetas (PRP) en tres dimensiones y analizamos las diferencias de este modelo con los cultivos convencionales en dos dimensiones.

Resultados

Los PRPs utilizados en este estudio fueron obtenidos de sangre de 4 donantes sanos (2 hombres y 2 mujeres) (edad media: $41 \pm 11,91$ años), se trataba de PRPs puros sin leucocitos ni eritrocitos, con un enriquecimiento de plaquetas de $2,25 \pm 0,26$ veces el contenido de la sangre periférica. Estos PRPs (en su forma líquida e hidrogel) se utilizaron para tratar las células de tendón de 2 donantes sanos jóvenes (hombres) ($n=8$) obtenidas del autoinjerto de tendón de la corva utilizado para la reconstrucción de ligamento cruzado anterior.

5.2.1. La proliferación celular de células cultivadas en hidrogeles de PRP en 3D fue similar a la de cultivos suplementados con PRP líquido en 2D

En células de tendón en fase 2, el tiempo de duplicación del número de células en cultivo fue similar en células cultivadas en los hidrogeles de PRP en 3D y en cultivos convencionales en 2D suplementados con PRP líquido. A las 72 horas, la media del tiempo de duplicación de las células en 2D fue 39,98 horas y la de las células cultivadas en 3D fue de 42,18 horas. El donante de PRP no afectó a las tasas de proliferación celular ($p=0,589$), pero los donantes de células sí que diferían entre sí ($p=0,001$). Estas diferencias se corroboraron en células cultivadas en 2D con un 10% FBS (condiciones convencionales de cultivo) en cuyo cultivo, el tiempo de duplicación era de 41,5 horas para un donante y 51,7 horas para otro.

5.2.1. Las células de tendón invadieron el gel de PRP y se diferenciaron en su interior creando un cultivo celular en 3D con distinta estructura y morfología que el cultivo en 2D

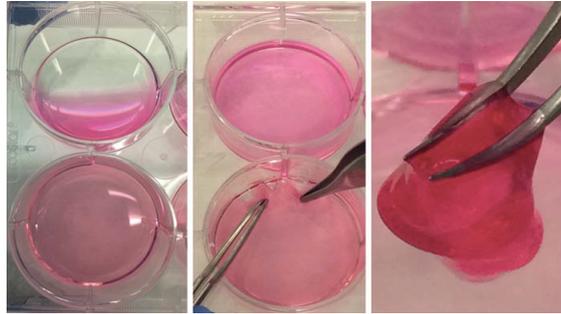


Figura 26. Fotografía macroscópica del modelo de cultivo en 2D (parte superior de la imagen) con DMEM F12 y PRP con heparina, y en 3D (parte inferior) con DMEM F12 y PRP sin heparina. Tras 30 minutos a 37°C, el PRP se coaguló y se formó un gel que contenía a las células embebidas y que se podía observar al microscopio debido a su transparencia.

Para realizar el cultivo celular, se sembraron las células mezcladas con el PRP y se esperó a que coagulara (Fig. 26). Este proceso resultó en un gel de PRP transparente en el que las células estaban embebidas, extendiendo prolongaciones citoplasmáticas y establecían contactos entre ellas durante la colonización y la estabilización del cultivo (Fig. 27).

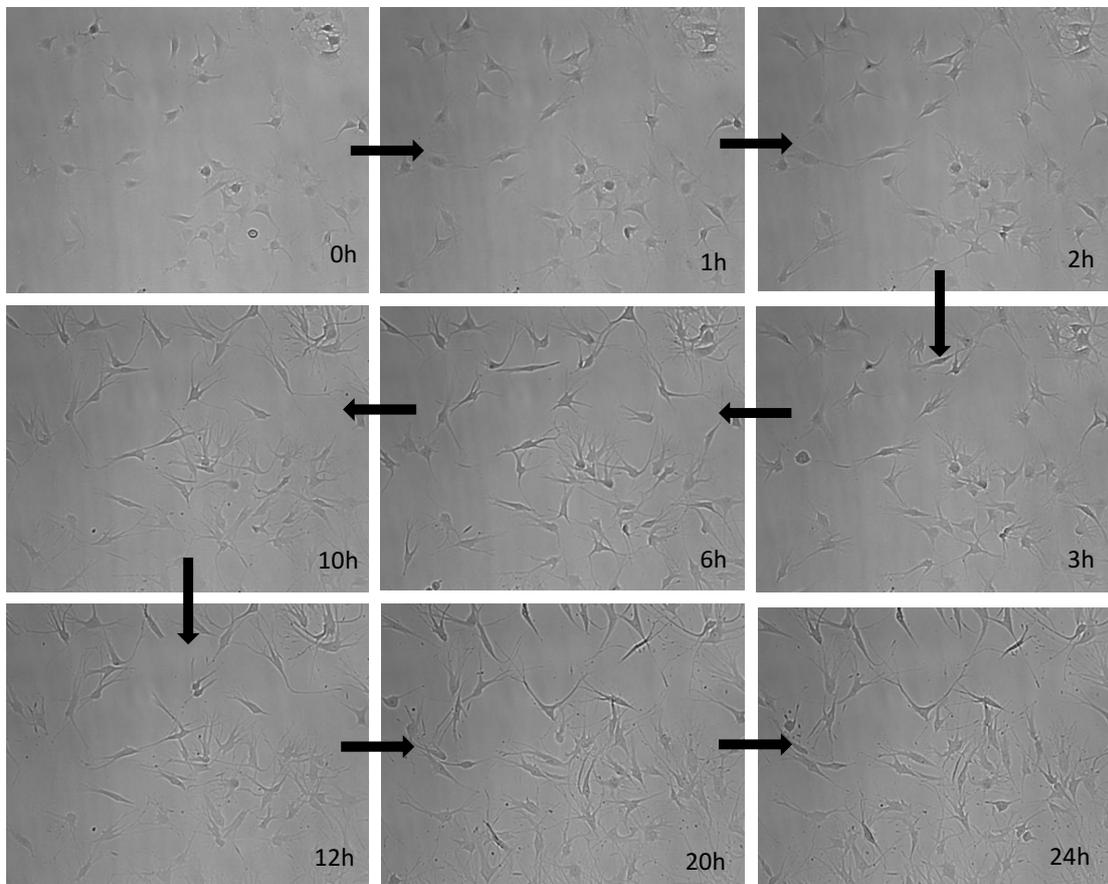


Figura 27. Colonización del gel de PRP por las células de tendón. Seguimiento mediante microscopía de contraste de fases durante 24 horas a 10X aumentos.

Una vez que las células alcanzaron la densidad de subconfluencia, se observó que en los modelos de cultivo en dos y tres dimensiones, la arquitectura y aspecto del cultivo eran diferentes (Figura 28). En dos dimensiones, las células conformaron una estructura de tipo mimbre dejando pequeñas zonas redondas sin poblar, estructura típicamente observada en cultivos de células de tendón en 2D (Fig. 28A, B). En cambio, el cultivo en 3D tras 4 días presentaba una estructura más homogénea con células con morfología más alargada con filopodios largos que se extendían hacia los 3 planos para establecer contactos con las células vecinas y con células distantes (Fig. 28C, D).

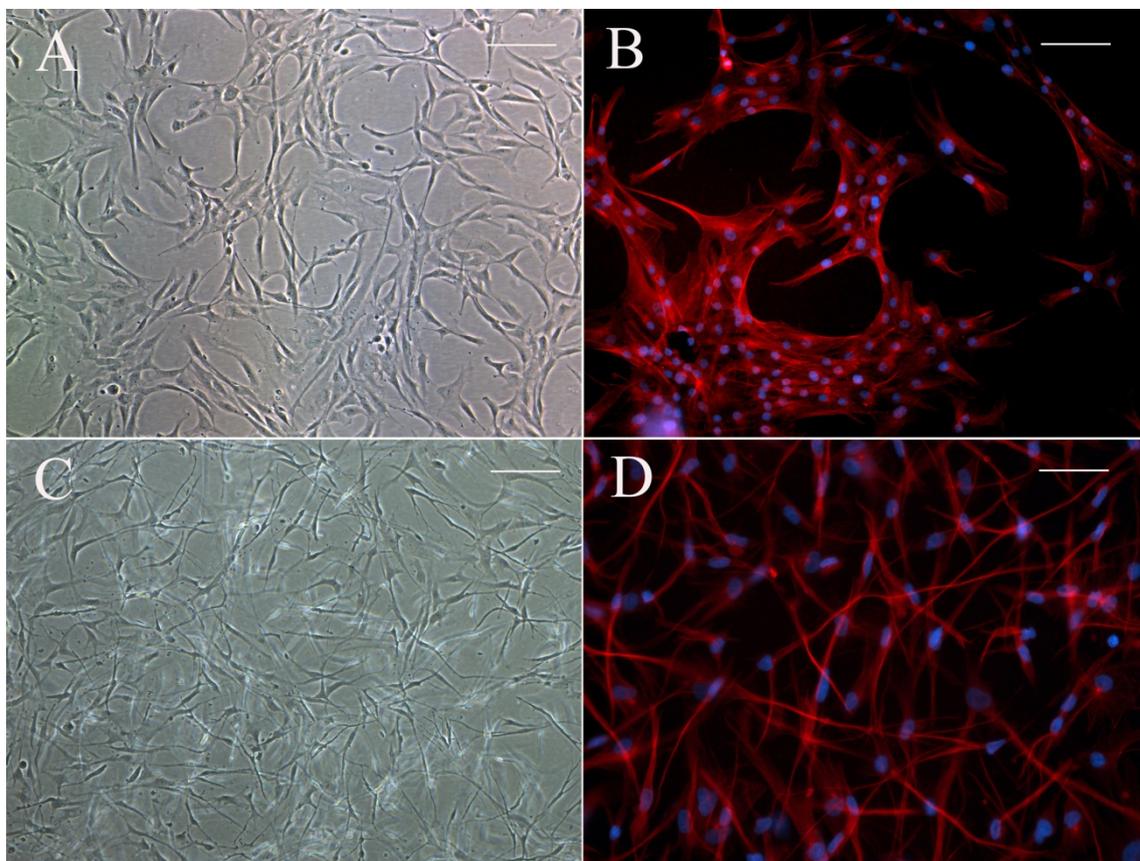


Figura 28. Aspecto del cultivo tras 4 días suplementado con 10% de PRP líquido (A y B) y en hidrogel de 10% de PRP (C, D). Fotografías de microscopía de contraste de fases y de fluorescencia a 10 aumentos. Barras de escala = 20 μ m.

5.2.3. La expresión génica de marcadores de células de tendón fue mayor en los hidrogeles en 3D, incluso en pases celulares altos, comparados con los cultivos en 2D

La expresión génica de marcadores de tendón permitió establecer el grado de diferenciación de las células en el modelo de cultivos en 2D y en 3D en base a marcadores establecidos. La expresión génica de la glicoproteína de transmembrana *TNMD*, típica de tejido musculo esquelético e involucrada en la maduración del colágeno, aumentó significativamente en cultivos en 3D ($p < 0,001$) comparados con los cultivos en 2D (Fig. 29). El factor de transcripción *SCX*, involucrado en la formación de tendón durante el desarrollo embrionario, presentó una expresión baja en 2D, que incrementó significativamente en cultivos en el hidrogel de 3D ($p = 0,012$). Por el contrario, los niveles de expresión del factor de transcripción *MKX*, también involucrado en la formación del tendón disminuyeron significativamente en los cultivos en 3D ($p = 0,028$).

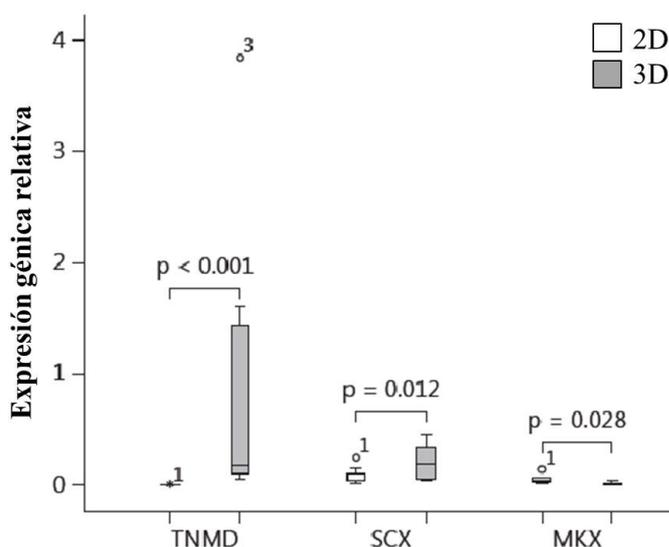


Figura 29. Expresión génica de los genes marcadores de tendón *TNMD*, *SCX* y *MKX* expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Los pases celulares altos, es decir, la acumulación de duplicaciones del número de células en cultivo celular, normalmente provocan procesos de des-diferenciación de las células y afectan a la fisiología celular. Por ello, los experimentos se realizan normalmente a pases celulares bajos para mantener el fenotipo celular inicial. Para comprobar si los pases celulares altos (hasta 10) afectaban al fenotipo de las células de tendón, se midieron los niveles de expresión de los tres marcadores, *TNMD*, *SCX* y *MKX* de tendón. Tras el décimo pase, la expresión de *SCX* y *TNMD* se mantuvo mucho más elevada en las células

sembradas en geles de PRP en 3D comparados con aquellas cultivadas en cultivos en 2D (p=0,010 y p=0,015 respectivamente) (Tabla 8).

Marcador	2D	3D	P
TNMD pase 2	0,0001±0,0001	0,914±0,469	<0,001
TNMD pase 10	0,0009±0,0007	0,54±0,17	0,015
SCX pase 2	0,075±0,029	0,212±0,060	0,012
SCX pase 10	0,030±0,016	0,183±0,060	0,010
MKX pase 2	0,052±0,014	0,011±0,005	0,028
MKX pase 10	0,071±0,016	0,028±0,004	0,315

Tabla 8. Media ± error estándar de la expresión génica de marcadores de tendón expresada como $2^{-\Delta Ct}$, calculada en relación a los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*. Los valores de p se determinaron mediante el U test de Mann-Whitney para datos independientes no paramétricos.

5.2.4. La expresión de moléculas relacionadas con la matriz extracelular se redujo en 3D en comparación con los cultivos en 2D

A las 96 horas de cultivo, se observó una reducción significativa de la expresión génica de las moléculas relacionadas con la matriz extracelular de tendón *COL1A1*, *COL3A1*, *FN*, *VCAN* y *HAS2* en las células cultivadas en los hidrogeles de PRP en 3D en comparación con las que fueron cultivadas en 2D y suplementadas con PRP líquido (p=0,041; p=0,012; p=0,041; p=0,018 y p=0,012 respectivamente) (Fig. 30A). La expresión de los proteoglicanos *ACAN* y *DCN* fue similar en ambos tipos de cultivo (p=1,000 y p=0,069). Por otro lado, se observó una disminución de la expresión del gen del proteoglicano *VCAN* (p=0,018) y del enzima *HAS2*, responsable de la síntesis de ácido hialurónico (p=0,012) (Fig. 30B).

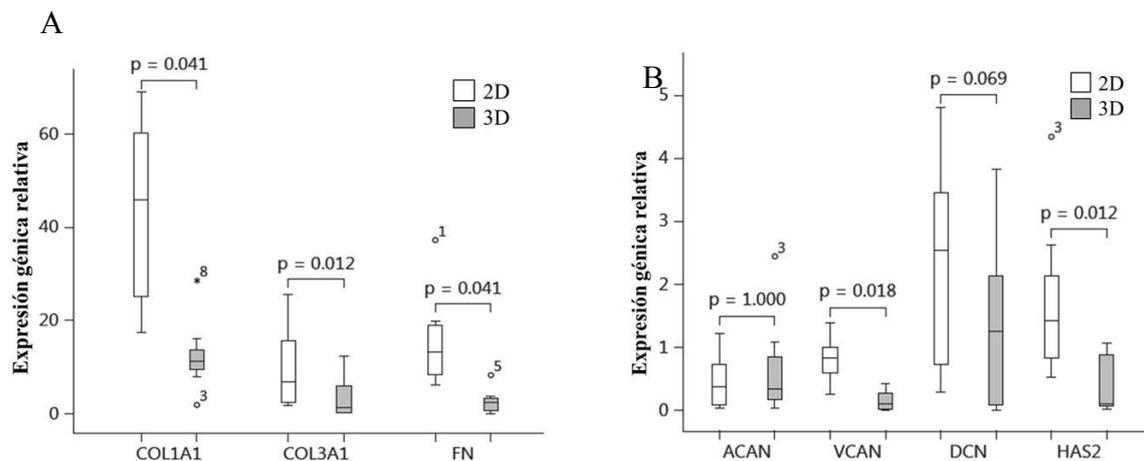


Figura 30. Expresión génica de las moléculas de matriz extracelular *COL1A1*, *COL3A1*, *FN* (A), *ACAN*, *VCAN*, *DCN* y *HAS2* (B) expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Por otro lado, la proteína implicada en los mecanismos de adhesión y comunicación celular *FMOD* presentó niveles de expresión similarmente bajos en los cultivos en 2D y 3D ($p=0,592$). La expresión de la proteína *COMP*, al contrario que la del resto de proteínas de matriz, aumentó en las células cultivadas en hidrogeles de PRP de forma significativa ($p=0,025$) (Fig. 31).

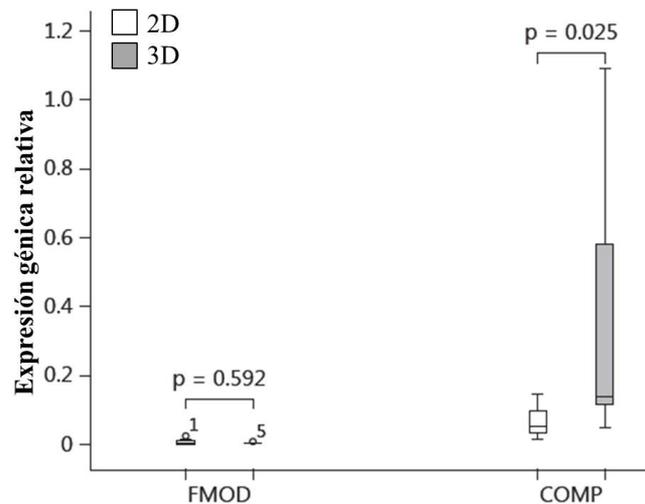


Figura 31. Expresión génica de FMOD y COMP en células en cultivos en 2D (blanco) y en 3D (gris) expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

En cuanto a las correlaciones entre la expresión de moléculas de matriz en células de tendón cultivadas en 3D estudiadas mediante coeficiente de correlación de Spearman, se encontraron fuertes correlaciones entre *VCAN* con *DCN* y *COL1A1* ($\rho=1$; $p<0,0001$ para ambas). *DCN* también correlacionaba con *COL3A1* y con *COL1A1* ($\rho=1$; $p<0,0001$ y $\rho=0,953$; $p=0,005$ respectivamente). Además, también se encontró una fuerte correlación entre *COL1A1* y *COL3A1* ($\rho=0,943$; $p=0,005$). *TNMD* mostró una fuerte correlación con *ACAN* ($\rho=1$; $p<0,0001$) y con *COMP* ($\rho=0,886$; $p=0,019$); que a su vez correlacionaba negativamente con *FMOD* ($\rho=-0,886$; $p=0,019$). *FMOD* también mostraba correlaciones moderadas con *COL1A1* ($\rho=0,829$; $p=0,042$) y con *HAS2* ($\rho=0,812$; $p=0,050$).

Estas correlaciones no se encontraron en células cultivadas en 2D. En cambio, se detectó una correlación negativa entre *HAS2*, *VCAN* ($\rho=-0,821$; $p=0,023$) y *COL3A1* ($\rho=-0,857$; $p=0,014$). *VCAN* y *SCX* mostraron una correlación negativa ($\rho=-0,757$; $p=0,049$). Además, se encontró una correlación positiva entre *ACAN* y *DCN* ($\rho=0,786$; $p=0,036$).

5.2.5. La expresión génica de las subunidades α_2 y β_1 de las integrinas también se redujo en las células cultivadas en hidrogeles de PRP en 3D

El estudio de la expresión génica de las subunidades de integrinas que permiten la adhesión de las células a la matriz extracelular y la comunicación intercelular mostró que el patrón de expresión era diferente entre células cultivadas en 2D y en 3D. No se encontraron diferencias en la expresión de *ITGA5* ni *ITGA11* (subunidades α_5 y α_{11}), pero, en consistencia con los anteriores hallazgos, sí se encontró una disminución de la expresión de los genes *ITGA2* e *ITGB1* que codifican para las subunidades α_2 y β_1 que unen a colágeno tipo 1 en las células cultivadas en 3D ($p=0,010$) (Figura 32).

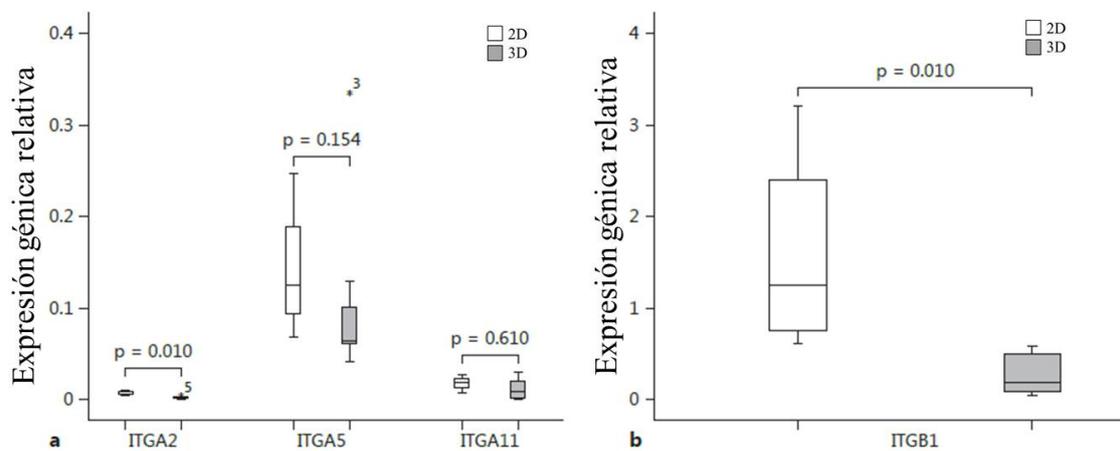
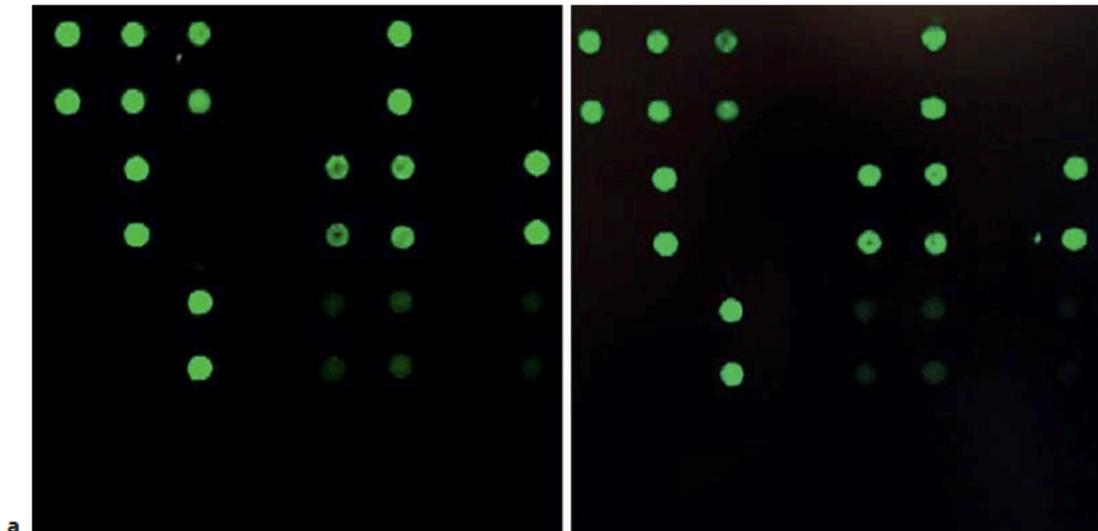


Figura 32. Expresión génica de las integrinas *ITGA2*, *ITGA5*, *ITGA11* e *ITGB1* expresada como $2^{-\Delta Ct}$ utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

5.2.6. La secreción de mediadores moleculares por las células de tendón se vio condicionada por la estructura del cultivo celular

El array o prueba de detección de proteínas realizado en el medio secretado de cada uno de los cultivos a 96 horas, reveló la presencia de diversas proteínas mediadoras de los procesos angiogénicos e inflamatorios (Fig. 33).



POS-1	POS-2	POS-3	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78
POS-1	POS-2	POS-3	NEG	NEG	Angiogenin	EGF	ENA-78
bFGF	GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptin	MCP-1
bFGF	GRO	IFN- γ	IGF-1	IL-6	IL-8	Leptin	MCP-1
PDGF-BB	PIGF	RANTES	TGF- β_1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF
PDGF-BB	PIGF	RANTES	TGF- β_1	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	VEGF
VEGF-D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
VEGF-D	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

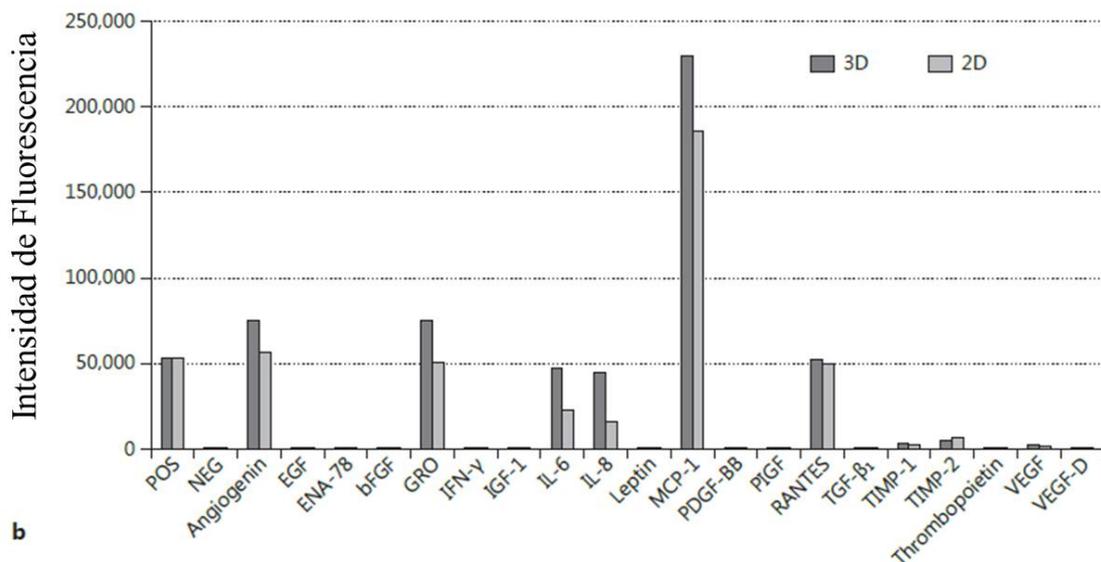


Figura 33 a y b. Array de proteínas en soporte de cristal. a) Imágenes representativas de los arrays de proteínas en medio de células de tendón cultivadas en 3D (izquierda) y en 2D (derecha). Debajo, mapa del posicionamiento de cada proteína en el array. b) Detección semi-cuantitativa de la cantidad de cada proteína expresada mediante intensidad de la fluorescencia detectada en el array.

En los datos semi-cuantitativos del array, se observa una alta concentración de proteínas como MCP-1, RANTES, GRO, angiogenina, IL-6 e IL-8, con diferencias entre ambos tipos de cultivo.

Para comprobar las diferencias en la secreción proteica de células de tendón cultivadas en 2D y 3D, se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs) de IL-6, IL-8, MCP-1 y VEGF, implicados en inflamación y angiogénesis (Fig. 34).

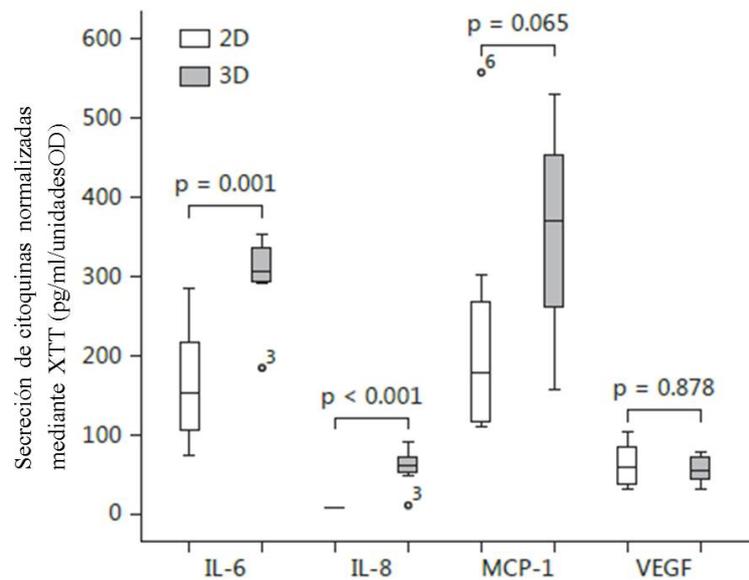


Figura 34. Secreción proteica en mg/ml, normalizada mediante la cuantificación indirecta de la cantidad celular con XTT, de las citoquinas IL-6, IL-8, MCP-1 y el factor de crecimiento VEGF. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Corroborando los hallazgos observados en el array de forma semi-cuantitativa, se detectó un aumento de la concentración de IL-6 ($p=0,001$), IL-8 ($p<0,001$) en el medio condicionado de las células cultivadas en 3D. En cambio, los niveles de MCP-1 y VEGF no presentaban diferencias entre ambos modelos de cultivo ($p=0,065$ y $p=0,878$ respectivamente).

RESUMEN DE RESULTADOS:

1. Los cultivos en 3D permitieron el mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células de tendón y provocaron un cambio en la morfología celular aumentándose los contactos entre las células mediante prolongaciones citoplasmáticas.

2. La expresión génica los marcadores génicos de tendón *Scx* y *TNMD* aumentaron en cultivos en hidrogeles de PRP en 3D, incluso en pases celulares altos.
3. La expresión de las moléculas de matriz extracelular como *COL1A1*, *COL3A1*, *FN*, *VCAN* y *HAS2* disminuyó en cultivos en 3D, así como las moléculas relacionadas *ITGA2* e *ITGB1* en comparación con cultivos en 2D suplementados con PRP líquido.
4. La secreción de citoquinas relacionadas con los procesos inflamatorios IL-6, IL-8 y MCP-1 aumentó en los cultivos en hidrogeles de PRP en 3D.

5.3. Artículo III

Rubio-Azpeitia E, Bilbao AM, Sánchez P, Delgado D, Andia I. **The Properties of 3 Different Plasma Formulations and Their Effects on Tendinopathic Cells.** Am J Sports Med. 2016 Aug;44(8):1952-61.

Debido a la controversia existente en la literatura relativa a la aplicación de las distintas formulaciones de PRP, se realizó este estudio para determinar las diferencias biológicas de 3 formulaciones con repercusión en la reparación tendinosa. Para ello se establecieron cultivos de células de tendón tendinopático (obtenidas de 3 donantes que se sometieron a cirugía artroscópica de manguito rotador) en hidrogeles de plasma pobre en plaquetas (PPP), plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma rico en plaquetas leuco-enriquecido (L-PRP) de 4 donantes, que se diferenciaban entre ellos en el contenido plaquetario y leucocitario. Se comparó la respuesta celular a estas formulaciones en términos de migración, proliferación, síntesis de moléculas de matriz extracelular, y en la secreción de mediadores inflamatorios y angiogénicos (n=12 para cada condición experimental).

Resultados

5.3.1. El contenido celular era diferente en las distintas formulaciones de plasma

Para este artículo, se prepararon 3 formulaciones diferentes de plasma obtenidas de 4 donantes sanos (edad media: $34,8 \pm 14,2$ años), dos mujeres y dos hombres.

	Concentración de plaquetas ($\times 10^3$ células/ml)	Concentración de leucocitos ($\times 10^3$ células/ml)	Concentración de eritrocitos ($\times 10^3$ células/ml)
Sangre total	185 \pm 47	5,17 \pm 0,87	4,17 \pm 0,48
PPP	6 \pm 2	ND	ND
PRP puro	460 \pm 103	0,06 \pm 0,07	ND
L-PRP	882 \pm 251	8,20 \pm 1,31	0,05 \pm 0,04

Tabla 9. Contenido en plaquetas, leucocitos y eritrocitos de cada formulación de plasma expresados en media \pm desviación estándar. ND: No Determinada (fuera del límite de detección del aparato).

El PRP y el L-PRP tenían un contenido en plaquetas significativamente superior que el PPP (p=0,029 y p=0,018 respectivamente). Además, el número de plaquetas era diferente entre ambos, el L-PRP presentó un incremento en el contenido plaquetario en comparación a la sangre total de 4,76 \pm 0,86 veces, mientras que el PRP de 2,52 \pm 0,28 (p=0,037). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en el contenido de

leucocitos entre PRP y L-PRP ($p=0,029$). Además, el L-PRP presentaba un contenido de leucocitos mayor que la sangre total ($p=0,020$) (Tabla 9).

5.3.2. Las células derivadas de tejido tendinopático migraban hacia los gradientes de PPP, PRP y L-PRP

En los experimentos de quimiotaxis, en los que se probó la capacidad de las 3 formulaciones de plasma para atraer a las células, se comprobó que los plasmas que contenían plaquetas tenían una mayor capacidad quimiotáctica para las células derivadas de tendón tendinopático que el PPP, aunque las tres formulaciones eran quimiotácticas para células de tendón patológico (Fig. 35).

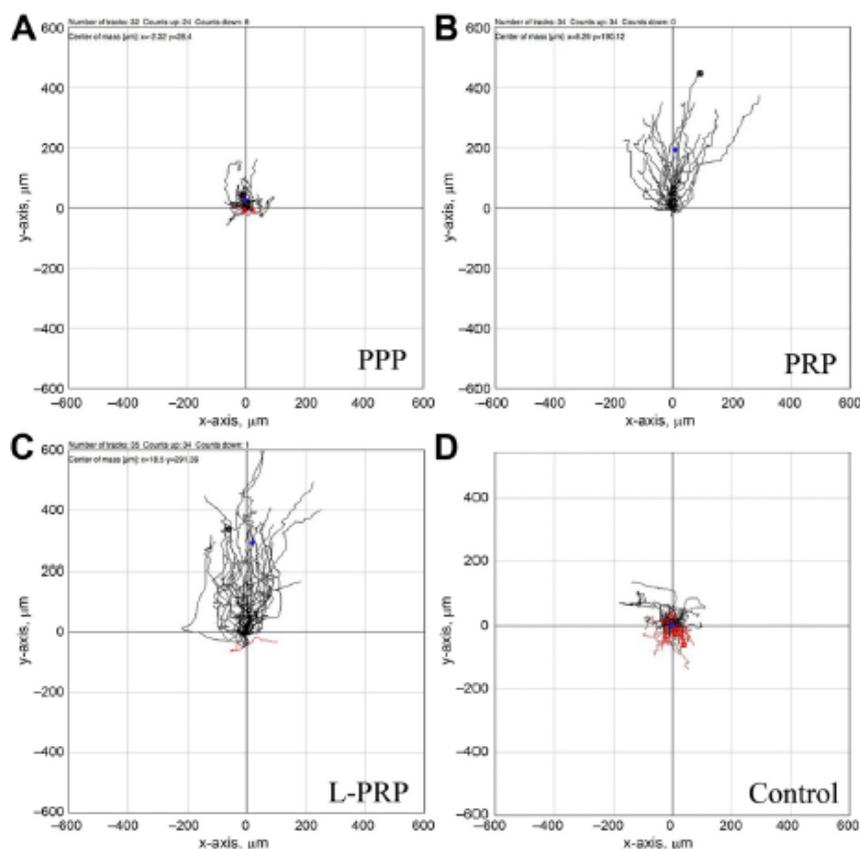


Figura 35. Gráficas representativas de la migración de células tendinopáticas hacia gradientes de PPP (A: PPP/DMEM), de PRP (B: PRP/DMEM) y L-PRP (C: L-PRP/DMEM) y de un control negativo (D: DMEM/DMEM). A un lado de la cámara de quimiotaxis se inyectaba la sustancia a testar, es decir PPP, PRP o L-PRP (en la parte de arriba en el gráfico) y al otro DMEM (parte de abajo). En cada experimento se monitorizaron un mínimo de 30 células durante 24 horas. Todas las trayectorias celulares se transforman ajustando cada punto de partida a (0,0) (x, y) a tiempo cero.

La Figura 35 (A-D) muestra las trayectorias representativas de la migración de células tendinopáticas hacia gradientes de PPP, PRP y L-PRP. Se puede observar que las células

tienen una clara tendencia a migrar hacia los gradientes de PRP y L-PRP. La tabla 10 muestra los parámetros principales que sirven para describir el movimiento celular hacia un gradiente de una sustancia quimiotáctica.

	Distancia Euclídea (μm)	Distancia Acumulada (μm)	Velocidad ($\mu\text{m}/\text{h}$)	Rectitud
PPP/DMEM (+/-)	73,7 \pm 55,6 ^b	195,4 \pm 97,7 ^b	8,16 \pm 4,05 ^b	0,38 \pm 0,21 ^{b,c}
PRP/DMEM (+/-)	247,0 \pm 138,6 ^d	372,5 \pm 158,7 ^e	15,51 \pm 6,61 ^d	0,63 \pm 0,18
L-PRP/DMEM (+/-)	307,8 \pm 133,5	482,0 \pm 163,6	20,09 \pm 6,82	0,63 \pm 0,15
DMEM/DMEM (-/-)	49,4 \pm 40,1	186,0 \pm 98,4	9,3 \pm 4,9	0,29 \pm 0,20

Tabla 10. Parámetros que describen el movimiento celular desde 0 a 24 horas. Distancia Euclídea (en línea recta desde el punto 0 al punto final), Distancia Acumulada (distancia total recorrida, suma de todos los movimientos), Velocidad y Rectitud (expresa en qué medida la célula va directa hacia el estímulo). Los datos están expresados en media \pm desviación estándar. Rectitud = $1/n\Sigma(d_i \text{ Euclid}/d_i \text{ accum})$. ^b $p < 0,001$ PPP comparado con PRP y L-PRP. ^c $p = 0,018$ PPP comparado con el control negativo. ^d $p = 0,002$; ^e $p < 0,001$ PRP comparado con L-PRP.

Las 3 formulaciones de plasma presentaron propiedades quimiotácticas, que se determinaron mediante el test de Rayleigh, que demuestra la diferencia entre movimiento arbitrario y migración dirigida, ya que estudia la uniformidad de la distribución de puntos finales. Los valores de p obtenidos mediante dicho test fueron $p = 0,011$ para el PPP, $p = 8,56 \times 10^{-12}$ para el PRP y $p = 1,66 \times 10^{-12}$ para el L-PRP (se considera movimiento no uniforme cuando el test de Rayleigh muestra una $p < 0,05$). A pesar de que las células presentaron una tendencia a migrar hacia el PPP expresada por el test de Rayleigh, el PRP y el L-PRP hicieron que recorrieran más distancia, tanto euclídea como acumulada, a menor velocidad y con menor rectitud ($p < 0,001$). En cuanto a las diferencias entre PRP y L-PRP, las células migraron una mayor distancia a mayor velocidad cuando se expusieron al gradiente de L-PRP ($p = 0,002$ y $p < 0,001$ respectivamente) (Tabla 10).

5.3.3. El SDF-1 α no era el responsable de la alta capacidad quimiotáctica de PRP y L-PRP

Como un primer acercamiento hacia una posible explicación a la capacidad quimiotáctica del PRP y del L-PRP, se analizó la quimiotaxis producida por la molécula SDF-1 α , presente en el PRP y con capacidad quimiotáctica demostrada, en las células de tendón tendinopático mediante la adición de 10 ng/ml de SDF-1 α recombinante al PPP.

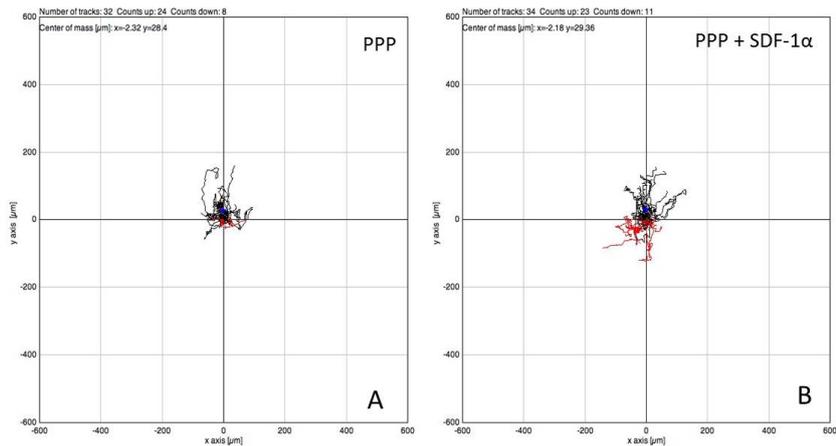


Figura 36. Gráfica que muestra el movimiento de las células hacia un gradiente de PPP (A) y hacia un gradiente de PPP suplementado con 10ng/ml de SDF-1 α (B).

El test de Rayleigh en la cámara con gradiente de PPP arrojó una $p=0,011$, en cambio, con PPP suplementado con SDF-1 α $p=0,022$. En ambos casos, el PPP tiene un cierto efecto quimiotáctico pero no hay gran diferencia entre los dos, incluso la p es superior en el cultivo suplementado con 10 ng/ml de SDF-1 α , es decir, el PPP suplementado con SDF-1 α es incluso menos quimiotáctico que el PPP sólo (Fig. 36). No se observaron diferencias significativas en las distancias euclídeas y acumuladas ni en la velocidad entre las células expuestas a PPP sólo o suplementado con 10 ng/ml SDF-1 α .

5.3.4. *La proliferación de las células tendinopáticas aumentó con el contenido plaquetario*

El tiempo de duplicación de las poblaciones celulares en los distintos hidrogeles fue diferente. En los hidrogeles de PPP, el tiempo de duplicación fue de 119 horas (95% CI: 58-181 horas). Por el contrario, el tiempo de duplicación de los hidrogeles de PRP fue 33 horas (95% CI: 31-36 horas) y el de los hidrogeles de L-PRP fue de 31 horas (95% CI: 28-33 horas) (Figura 37).

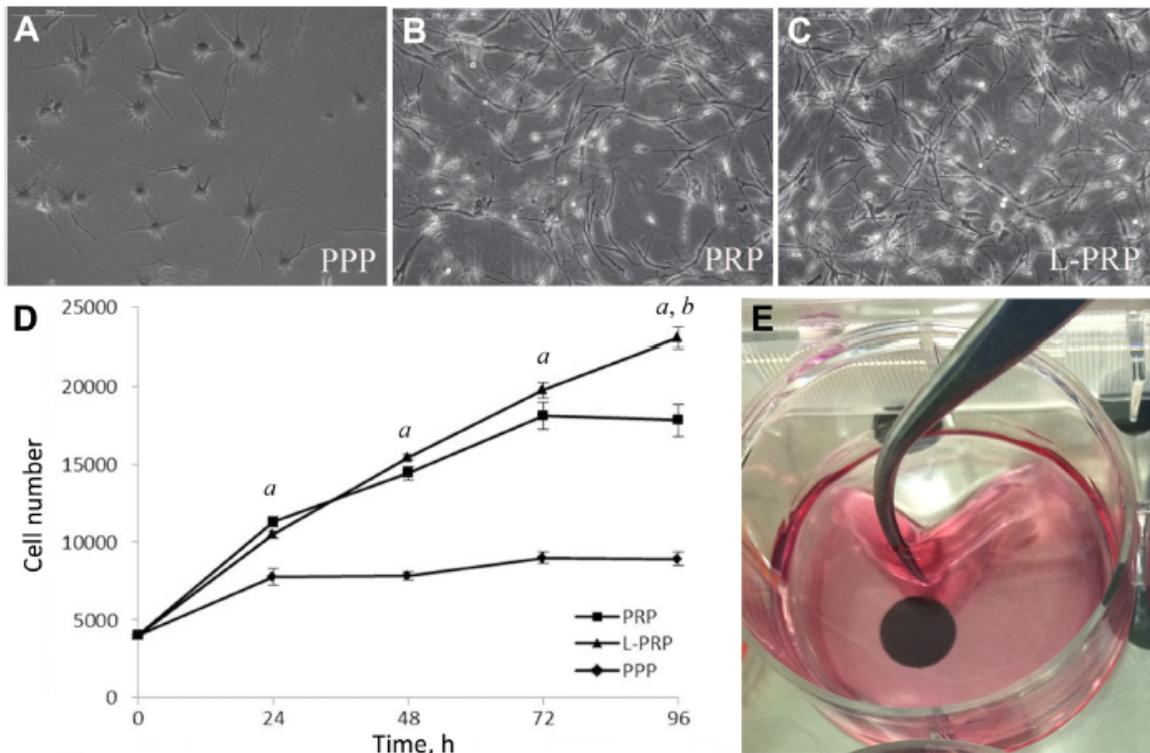


Figura 37. (A-C) Fotografías realizadas mediante microscopio de contraste de fases acoplado a una cámara con el objetivo de 10 aumentos. Células embebidas en hidrogel en 3D de PPP (A), de PRP (B) y L-PRP (C). D: Gráfica que muestra la proliferación celular a 96 horas de las células derivadas de tejido tendinopático cultivadas en los hidrogeles de los 3 tipos de plasma. a: $p < 0,005$; b: $p = 0,003$. E: Vista macroscópica de un hidrogel de plasma con células embebidas.

El análisis estadístico mostró que había diferencias significativas en la proliferación celular en los distintos hidrogeles ($p < 0,001$). Las células embebidas en los hidrogeles de PPP tenían unas tasas de proliferación significativamente menor que los de PRP y L-PRP ($p = 0,002$ y $p = 0,001$ respectivamente) (Figura 37D). En la fase exponencial de la proliferación no se encontraron diferencias entre las células cultivadas en PRP y en L-PRP ($p > 0,99$) pero en los geles de PRP, las células llegaron antes a la fase de plató (72-96 horas), en la que se detiene la proliferación. Así, a las 96 horas el número de células era mayor en los hidrogeles de L-PRP ($p = 0,003$) (Figura 37D). Los donantes de plasma y los donantes de células no afectaron a la proliferación celular ($p = 0,901$ y $p = 0,073$ respectivamente).

También se puede observar en la figura 37 (A-C) que la morfología celular era diferente en las células cultivadas en PPP con respecto a las de PRP y L-PRP a 96 horas, con una apariencia más redondeada y con menos prolongaciones citoplasmáticas que en los cultivos de las formulaciones con contenido plaquetario.

5.3.5. La formulación con mayor contenido plaquetario y presencia de leucocitos (L-PRP) produjo una regulación a la baja de genes codificantes de componentes de la matriz extracelular

La presencia de leucocitos en el L-PRP disminuyó el metabolismo de las células de tendón tendinopático, como se pudo observar en la disminución de la síntesis de MEC.

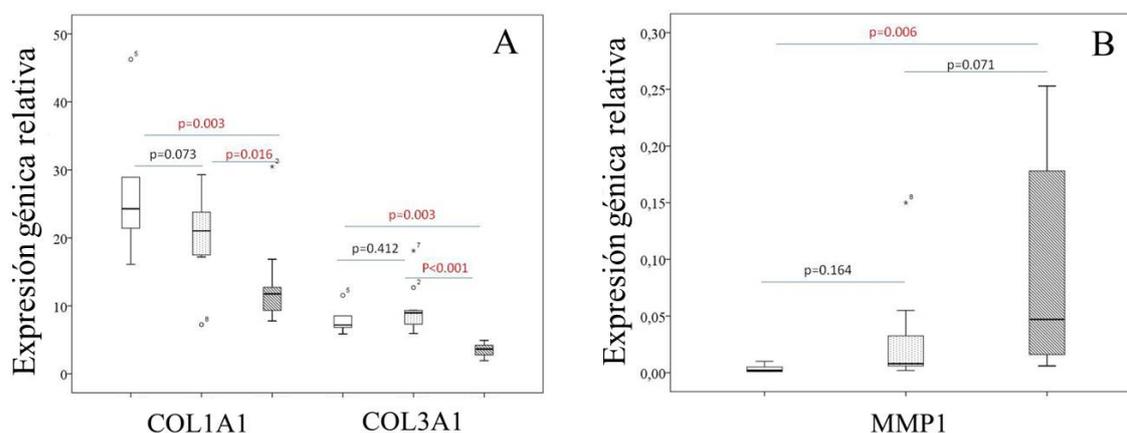


Figura 38. Expresión génica relativa a la media de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*, expresada como $2^{-\Delta Ct}$, de los genes *COL1A1*, *COL3A1* (A) y *MMP1* (B). Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

La expresión génica del *COL1A1* disminuyó en las células cultivadas en hidrogeles de L-PRP de manera significativa en comparación con los de PRP ($p=0,016$) y de PPP ($p=0,003$). Asimismo, la expresión génica de *COL3A1* también disminuyó en células cultivadas en hidrogeles de L-PRP en comparación con PRP y PPP ($p<0,001$ y $p=0,003$ respectivamente). Por el contrario, los niveles de expresión de ambos tipos de colágeno permanecieron similares en PPP y PRP ($p=0,073$ para *COL1A1* y $p=0,412$ para *COL3A1*) (Fig. 38A).

Por otro lado, la expresión de la *MMP1*, involucrada en la degradación de los colágenos I, II y III, fue superior en las células cultivadas en L-PRP que en aquellas cultivadas en hidrogeles de PPP ($p=0,006$) y de PRP ($p=0,071$) (Fig. 38B). Se estudió la expresión de la *MMP3* pero no se encontraron niveles de expresión detectables en ninguna de las condiciones experimentales.

El colágeno está entrelazado con proteínas más pequeñas como la fibronectina y la decorina. Estas proteínas presentaron un nivel de expresión más elevado en las células cultivadas en hidrogeles de PPP comparado con aquellas cultivadas en hidrogeles con altos niveles de plaquetas y con leucocitos (Fig.39).

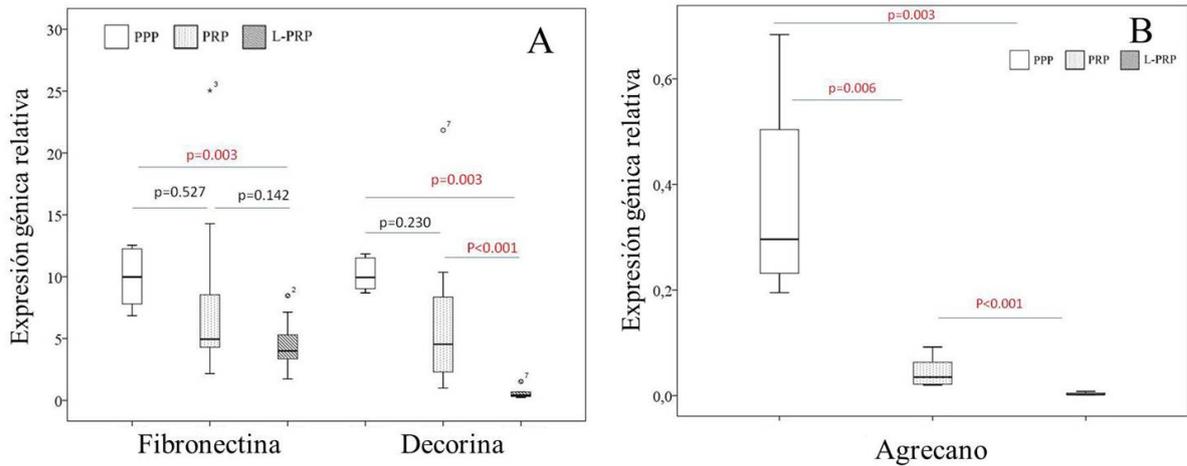


Figura 39. Expresión relativa de *FN*, *DCN* y *ACAN* con respecto a la media de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*, expresada como $2^{-\Delta Ct}$. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

Tanto en la expresión de *FN* como de *DCN*, igual que en el caso de las moléculas de ECM anteriormente mencionadas, el PPP y el PRP presentaron un patrón de expresión similar, sin diferencias significativas; con una expresión superior a la de las células cultivadas en L-PRP. En el caso de la expresión de la *FN*, las células cultivadas en hidrogel de PPP mostraron niveles de expresión superiores a los de las células cultivadas en hidrogel de L-PRP ($p=0,003$). La *DCN* por su parte, tenía niveles de expresión superiores en ambos tipos, PPP y PRP, comparado con L-PRP ($p=0,003$ y $p<0,001$ respectivamente) (Fig. 39). La expresión del proteoglicano *ACAN* disminuyó con el contenido plaquetario y la presencia de leucocitos, siendo superior en las células cultivadas en PPP comparada con la de las células de los hidrogel de PRP ($p=0,006$) y de L-PRP ($p=0,003$). Por su parte, la expresión de *ACAN* de las células en PRP fue superior a la de aquellas embebidas en L-PRP ($p<0,001$) (Fig. 39).

El estudio de la expresión de las proteasas *ADAMTS4* y *ADAMTS5*, que degradan proteoglicanos de matriz reveló una expresión baja sin diferencias significativas entre las células cultivadas en las distintas formulaciones de plasma (Fig. 40).

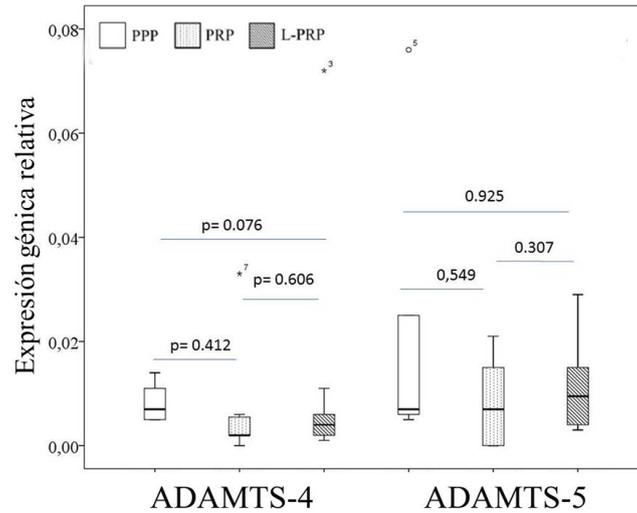


Figura 40. Expresión génica relativa de *ADAMTS4* y *ADAMTS5*, con respecto a la media de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP*, expresada como $2^{-\Delta Ct}$. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75.

5.3.6. La formulación de plasma influyó el patrón de secreción proteica de mediadores inflamatorios

Las células tendinopáticas cultivadas en hidrogel de plasma en 3D sintetizan mediadores de los procesos inflamatorios como MCP-1, RANTES, IL-6, IL-8 e IL-1 β (Fig. 41).

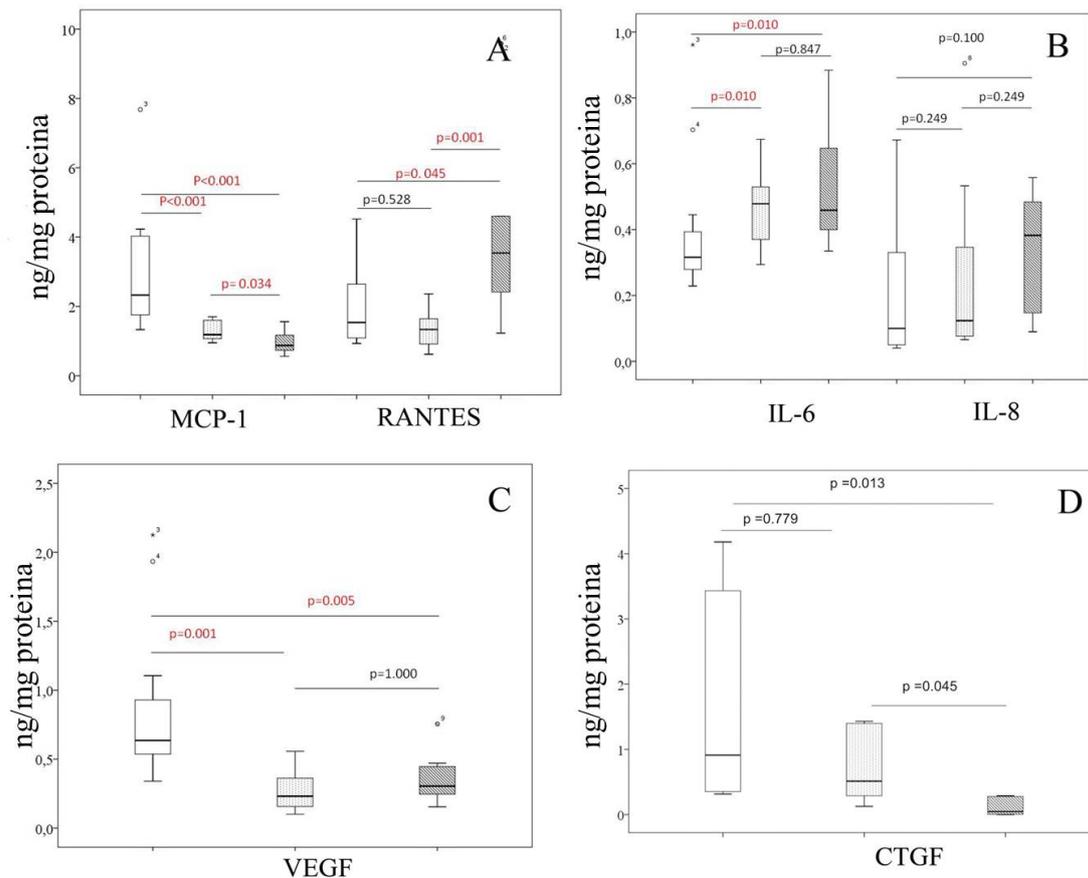


Figura 41. Patrones de secreción de proteínas inflamatorias. (A) MCP-1 y RANTES, (B) IL-6 e IL-8, (C) VEGF y (D) CTGF. Las cajas representan las medianas y los percentiles 25-75 de los nanogramos de proteína secretada con respecto a la cantidad de proteína total en el cultivo para tener en cuenta la cantidad total de células en cada uno de ellos.

La secreción de MCP-1 por células tendinopáticas fue significativamente inferior en aquellas cultivadas en hidrogeles de PRP y L-PRP en comparación a las células cultivadas en PPP ($p < 0,001$ para ambos) y también disminuyó comparando PRP y L-PRP ($p = 0,034$). Mientras que la secreción de RANTES fue superior en células cultivadas en hidrogeles de L-PRP comparado con PPP y PRP ($p = 0,045$ y $p = 0,001$ respectivamente) (Fig. 41A). No se encontraron diferencias en la secreción de IL-8 entre las células cultivadas en las diferentes formulaciones de plasma. En cambio, la secreción de IL-6 aumentó con el contenido plaquetario siendo superior en hidrogeles de PRP y L-PRP en comparación con los de PPP ($p = 0,010$ para ambas comparaciones) (Fig. 41B). El VEGF secretado en los hidrogeles de PRP y L-PRP fue inferior en comparación con los de PPP ($p = 0,001$ y $p = 0,005$ respectivamente) (Fig. 41C). Por otro lado, la secreción del factor de crecimiento CTGF, involucrado en la proliferación y la diferenciación de

células precursoras de tendón, presentó una secreción inferior en los hidrogeles de L-PRP comparado con PPP ($p=0,013$) y PRP ($p=0,045$) (Fig. 41D).

En total, todas las formulaciones de plasma investigadas presentaron un potencial pro-inflamatorio pero el PPP parecía ser más pro-angiogénico en comparación con los otros hidrogeles, pero menos pro-inflamatorio por la menor secreción de IL-6, y con una mayor capacidad de atracción de monocitos por la alta secreción de MCP-1 que provocó en las células de tendón tendinopáticas.

RESUMEN DE RESULTADOS:

1. El PRP y el L-PRP mostraron mayor potencial proliferativo que el PPP para las células tendinopáticas. A su vez, estas migraron a velocidad superior hacia gradientes de PRP y L-PRP comparado con PPP. El SDF-1 α , a pesar de ser una molécula quimiotáctica no es suficiente como para producir la quimiotaxis observada al utilizar PRP y L-PRP
2. El cultivo en hidrogeles PPP y PRP provocó una mayor expresión de las moléculas de matriz *COL1A1*, *COL3A1*, *DCN*, *FN* y *ACAN* y una disminución de *MMP-1* en comparación con el cultivo en hidrogeles de L-PRP.
3. Las células cultivadas en L-PRP y PRP secretaron mayores cantidades de IL-6 y RANTES pero aquellas cultivadas en PPP secretaron mayores niveles de MCP-1. La secreción de CTGF se redujo significativamente en hidrogeles de L-PRP en comparación con los de PPP y PRP.

5.4. Artículo IV

Rubio-Azpeitia E, Sánchez P, Delgado D, Andia I. **Adult Cells Combined with Platelet-rich Plasma for Tendon Healing: Cell Sources Options.** Journal of Orthopedics in Sports Medicine 2016. In press.

En este estudio se buscó abordar dos problemas principales que se plantean al diseñar terapias celulares para el tratamiento de tendinopatías severas en las que el tratamiento con PRP puede ser insuficiente: la elección del tipo celular adecuado y la posibilidad de pre-acondicionar el tejido diana antes de implantar las células, modificando el microambiente y favoreciendo así la eficacia de la terapia.

Para ello, utilizando cultivos en hidrogeles de plasma rico en plaquetas (PRP) en tres dimensiones (3D), se compararon los tres tipos celulares candidatos para regenerar el tendón (células de tendón, células madre derivadas de médula ósea y fibroblastos de piel) en base al perfil de expresión de moléculas de la matriz extracelular así como de factores anabólicos para tendón.

Para evaluar el efecto del pre-acondicionamiento del tendón con PRP, se realizaron cocultivos indirectos de los tres tipos celulares candidatos con medio condicionado de tenocitos tratados con PRP. Se determinaron la proliferación, la quimiotaxis, la síntesis de matriz extracelular y la de mediadores inflamatorios de los 3 tipos celulares expuestos a medio condicionado.

Resultados

El PRP puro utilizado en este trabajo se obtuvo de 3 donantes del grupo control del ensayo clínico randomizado llevado a cabo por nuestro grupo (NCT01945528) (2 hombres y 1 mujer; edad media: 37 ± 16 años), presentaba un enriquecimiento en plaquetas de $1,84 \pm 0,42$ veces más que la sangre periférica y no presentaba leucocitos o eritrocitos. Las células de tendón se obtuvieron de 3 donantes sanos (3 hombres, edad: 27 ± 1.4 años) de pacientes que se sometieron a cirugía de reconstrucción de ligamento cruzado anterior. Las células de médula ósea BM-MSCs humanas de 3 donantes, (2 hombres y 1 mujer, edad media: 32 ± 6 años) y los fibroblastos de piel (2 hombres y 1 mujer, edad media: 39 ± 17 años) fueron comprados a Lonza.

5.4.1. Caracterización de los distintos fenotipos celulares: Expresión génica constitutiva y tras el cultivo con PRP durante 15 días

5.4.1.1 El patrón de expresión génica constitutiva de las células de tendón era notablemente distinto a la de las BM-MSCs y los fibroblastos de piel

El estudio del patrón de expresión génica constitutiva (n=3), es decir, de la expresión génica de las células sin ningún tratamiento, de moléculas relacionadas con la formación de la MEC y de factores de crecimiento, mostró que los tenocitos eran notablemente distintos a los otros dos fenotipos celulares. No se encontraron diferencias significativas en la expresión constitutiva entre BM-MSCs y fibroblastos en ninguno de los genes estudiados. En cambio, las células de tendón mostraron un patrón de expresión génica distinto que ambos tipos celulares para *COL1A1*, *COL3A1*, *Scx*, *ACAN*, *COX-2* (p<0,05), y únicamente distinto que las BM-MSCs para *COL2A1*, *Sox9* y *HGF* (p<0,05) (Tabla 11).

	Células de tendón mean (95% CI)	BM-MSCs mean (95% CI)	Fibroblastos piel mean (95% CI)
<i>COL1A1</i>	45 ^{a,b} (15-73)	937 (339-1535)	752 (238-1265)
<i>COL3A1</i>	4.9 ^{a,b} (1.2-8.6)	31 (-5.9-68)	16 (1.4-30)
<i>DCN</i>	3.6 (0.8-6.4)	10 (1.5-18)	6.2 (1.7-10)
<i>Scx</i>	0.12 ^{a,b} (0.01-0.23)	0.02 (0.001-0.04)	0.005 (0.004-0.007)
<i>TNMD</i>	0.001 (0.0006-0.002)	0.0003 (-0.001-0.002)	0.0003 (0.0006-0.0003)
<i>IL33</i>	0.016 (-0.004-0.035)	n.d.	0.033 (-0.036-0.102)
<i>COL2A1</i>	0.004 ^a (0.003-0.005)	0.001 (-0.005-0.03)	0.003 (0.0005-0.006)
<i>ACAN</i>	0.035 ^{a,b} (0.003-0.06)	0.46 (0.23-0.68)	0.10 (-0.16-0.36)
<i>Sox9</i>	0.11 ^a (0.003-0.17)	0.78 (0.25-1.31)	0.04 (-0.02-0.10)
<i>TGF-β</i>	17 ^{a,b} (9.7-24)	5.2 (2.4-7.9)	2.3 (-2.1-6.8)
<i>COX-2</i>	2.2 ^{a,b} (-0.2-4.6)	0.10 (0.05-0.14)	0.10 (-0.021-0.22)
<i>HGF</i>	0.12 ^a (-0.08-0.31)	0.026 (-0.02-0.07)	0.012 (0.0012-0.023)
<i>IGF-1</i>	0.050 ^a (0.03-0.07)	0.006 (-0.005-0.02)	0.08 (-0.009-0.024)

Tabla 11. Expresión génica relativa en células de tendón, BM-MSCs y fibroblastos de moléculas relacionadas con la matriz extracelular en tejido musculo-esquelético. Está expresada como la media de la expresión relativa de los genes conservadores *GAPDH* y *TBP* mediante el método de 2^{-ΔCt}. ^ap<0,05 comparando células de tendón con BM-MSCs. ^bp<0,05 comparando células de tendón con BM-MSCs y fibroblastos de piel. CI: intervalo de confianza, n.d: no determinado.

5.4.1.2 El patrón de expresión génica de las células candidatas se modificó tras el cultivo en hidrogeles de PRP durante 15 días

El cultivo en hidrogeles de PRP durante 15 días (3 donantes de células y 3 donantes de PRP; n=9 para cada tipo celular) hizo que las diferencias de expresión de moléculas relacionadas con la matriz extracelular variaran (Fig. 42).

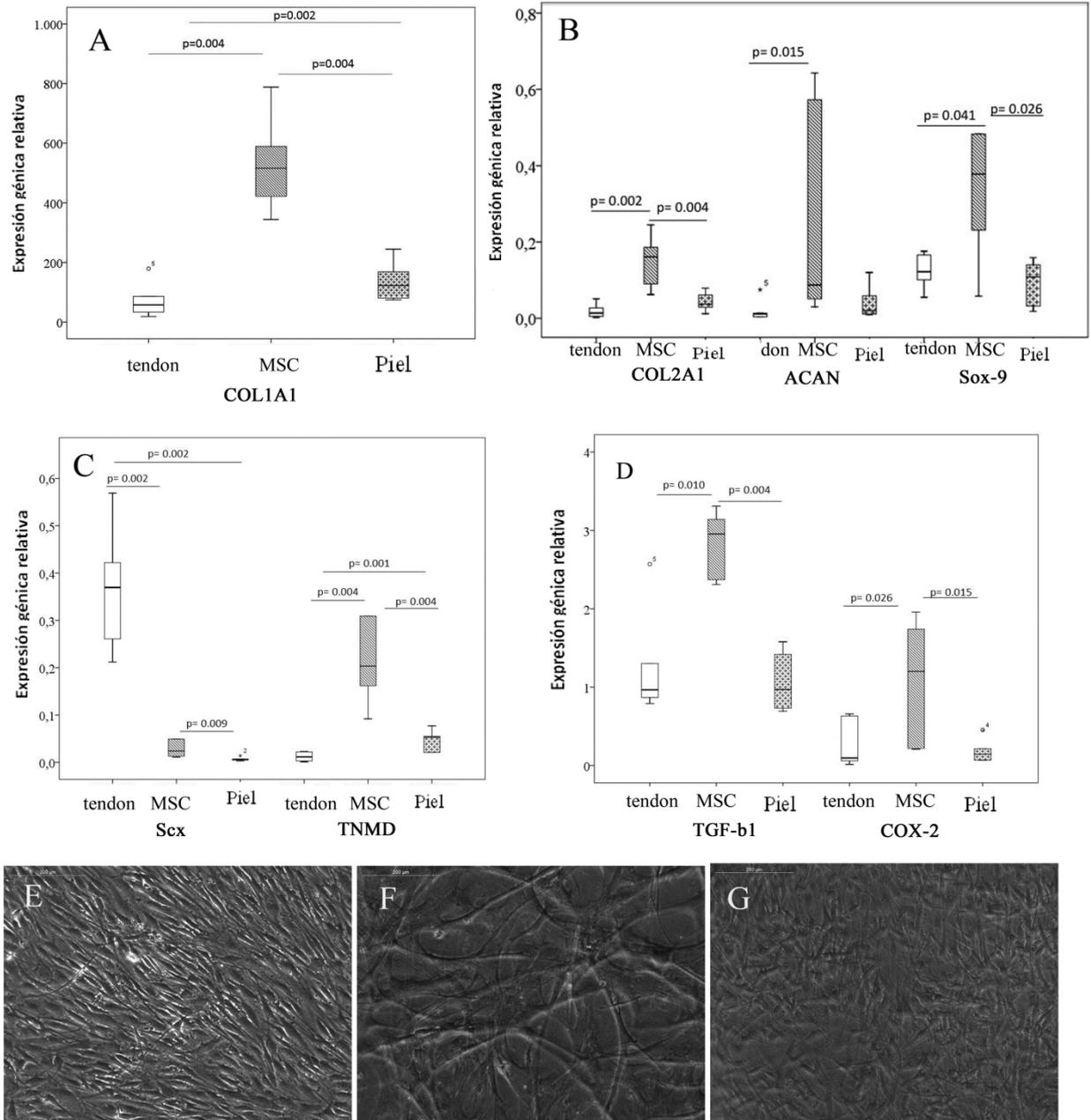


Figura 42. Expresión génica relativa de los genes *COL1A1* (A), *COL2A1*, *ACAN*, *Sox-9* (B), *Scx*, *TNMD* (C), *TGFβ1* y *COX-2* (D) expresada como $2^{-\Delta Ct}$ y calculada utilizando la media de la expresión de los genes de expresión constitutiva *GAPDH* y *TBP* como factor normalizador. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25-75 de la expresión génica relativa. Fotografías de las células de tendón (E), BM-MSCs (F) y fibroblastos de piel (G) a los 15 días de cultivo en

hidrogeles de PRP, a 10 aumentos obtenidas mediante una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases.

La expresión génica del *COL1A1* era 4 veces superior en BM-MSCs comparada con la expresión en fibroblastos de piel ($p=0,004$) y 7 veces superior comparada con la de células de tendón ($p=0,004$) (Fig. 42A). A su vez, los fibroblastos de piel expresaban *COL1A1* en niveles superiores a las células de tendón ($p=0,002$).

La expresión de *COL3A1* no mostró diferencias entre los fenotipos celulares, pero el ratio *COL1A1:COL3A1*, cuyos niveles adecuados son críticos en la regeneración tendinosa, presentó variaciones importantes entre los distintos fenotipos. Las células de tendón presentaron un ratio *COL1A1:COL3A1* muy bajo (10,9 (95% CI 6,6-15,2)) en comparación con las BM-MSCs (139,3 (95% CI 46,3-232,4)) y los fibroblastos de piel (79,7 (95% CI 17,9-141,9)) ($p=0,002$ para ambos).

La expresión de *IL-33*, que parece que aumenta en tendones tendinopáticos para promover la transición de la expresión de colágeno 1 a colágeno 3 y promover la regeneración tisular, no se encontró en BM-MSCs, pero sí moderadamente baja en células de tendón y en fibroblastos de piel.

En cuanto a las moléculas relacionadas con la matriz de cartílago, las BM-MSCs en hidrogeles de PRP expresaban mayores niveles de las tres moléculas estudiadas: *COL2A1*, *ACAN* y *SOX9* en comparación con los otros dos fenotipos, entre los que no se encontraron diferencias significativas (Fig. 42B).

De forma coherente, el factor de transcripción *Scx* presentó niveles de expresión superiores en tendón en comparación con BM-MSCs y fibroblastos de piel ($p=0,002$ para ambos). Los fibroblastos de piel presentaron niveles de expresión muy bajos que eran más elevados en BM-MSCs ($p=0,009$) aunque mucho menores que los de las células de tendón.

Sorprendentemente, el fenotipo que presentó niveles de expresión más elevados del gen que codifica para la glicoproteína *TNMD* fue las BM-MSCs, con niveles muy superiores que las células de tendón y los fibroblastos ($p=0,004$ para ambos). Incluso, las células de tendón presentaron niveles significativamente más bajos de *TNMD* que los fibroblastos de piel ($p=0,001$) (Fig. 42C).

Por otro lado, la expresión génica de los mediadores de la inflamación y los procesos de reparación *COX-2* y *TGF β 1* fue superior en BM-MSCs en comparación con los otros dos

fenotipos que no presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión de ambos genes (Fig. 42D).

En resumen, a diferencia de lo que ocurría en la expresión constitutiva, en cultivo en hidrogeles de PRP en 3D, las BM-MSCs tienen una expresión génica más alta de todos los genes estudiados, salvo *Scx*, en comparación con los otros dos fenotipos celulares.

En las fotografías de contraste de fases (Fig. 42E, F y G), se observa que las células en los hidrogeles de PRP en 3D tras 15 días de cultivo tienen una forma alargada y estructura desorganizada en el hidrogel, salvo los tenocitos, que parecen tener una estructura organizada con las células alineadas.

5.4.1.3. Los niveles de secreción de mediadores moleculares de los procesos inflamatorios eran distintos entre los 3 tipos celulares

Los niveles de secreción de mediadores de los procesos inflamatorios en células de tendón, BM-MSCs y fibroblastos de piel cultivados en hidrogeles de PRP durante 15 días eran diferentes (n=9 para cada tipo celular) (Fig. 43).

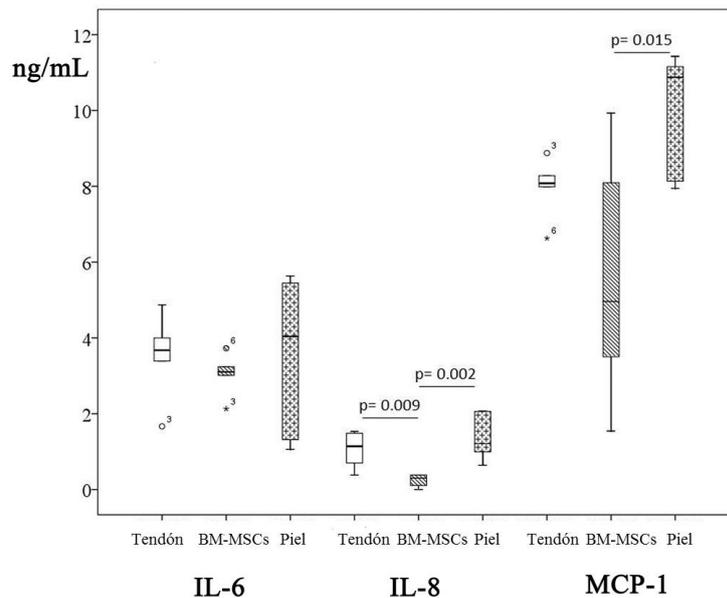


Figura 43. Secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1, en cultivos en hidrogeles de PRP en 3D durante 15 días, producida por las células de tendón, las BM-MSCs y los fibroblastos de piel expresada en ng/ml.

En los cultivos en hidrogeles de PRP, no se encontraron diferencias en la secreción de IL-6 entre los 3 fenotipos celulares. En cambio, las BM-MSCs secretaron menos IL-8 que las células de tendón (p=0,009) y los fibroblastos de piel (p=0,002). Además, las BM-

MSCs secretaron menos cantidad de MCP-1 que los fibroblastos de piel ($p=0,015$) (Fig. 43).

5.4.2. Efecto del pre-acondicionamiento de los tenocitos con PRP en los distintos tipos celulares

Para evaluar el efecto del pre-acondicionamiento del tendón con PRP antes de realizar la terapia celular, se recogió el medio condicionado (MC) de células de tendón tras el cultivo en hidrogeles de PRP durante 96 horas. Este MC se obtuvo mediante centrifugación del hidrogel que contenía las células de tendón, recuperación de la fase acuosa y filtración a través de filtros de $0,22\mu\text{m}$.

Para explorar el efecto de este pool molecular secretado por los tenocitos en contacto con PRP (MC) en las fases iniciales de la regeneración tisular, se realizó un co-cultivo indirecto en hidrogeles en 3D suplementados con un 50% de MC y se estudió la proliferación celular inducida por dicho MC y la migración de las células candidatas hacia un gradiente de MC. Además, se estudiaron las diferencias en la expresión génica de distintos marcadores génicos, así como la secreción de proteínas mediadoras de la inflamación, en comparación con el cultivo durante 15 días en hidrogeles en 3D no suplementados con MC.

5.4.2.1. El medio condicionado de tenocitos cultivados con PRP indujo la proliferación de BM-MSCs y fibroblastos de piel

El PRP estimuló la proliferación celular de todos los fenotipos celulares ($n=6$ para cada fenotipo celular). El medio condicionado de tenocitos (MC) también estimuló la proliferación celular, pero en menor medida que el PRP (Tabla 12).

	Tiempo de duplicación de la población celular (horas)		
	PRP	MC	DMEM (n.s)
Tenocitos	34.35 (4.50)	50.25 (2.08)	No proliferan
BM-MSCs	37.34 (3.37)	40.36 (3.37)	73.01 (10.54)
Fibroblastos de piel	36.78 (3.37)	41.09 (8.92)	82.39 (49.60)

Tabla 12. Tiempos de duplicación (en horas) de las poblaciones de células de tendón, BM-MSCs y de fibroblastos de piel expuestos a PRP, MC y DMEM (n.s = no suplementado).

5.4.2.2. El medio condicionado promovió la migración dirigida de los tres fenotipos celulares

Los tres tipos celulares migraron hacia el medio condicionado (Figura 44 y tabla 13) ($n=6$ para cada fenotipo). En el caso de las BM-MSCs, la rectitud del movimiento, fue superior en BM-MSCs comparadas con las células de tendón ($p=0,017$). La migración fue similar en los tres tipos celulares, sin diferencias en la velocidad o la distancia recorrida por el centro de masas (COM), que indica la dirección hacia la cual migró el conjunto de la población celular. El movimiento celular intrínseco, sin ningún estímulo, estudiado en los controles, fue superior en fibroblastos de piel comparado con las BM-MSCs ($p<0,001$) y los tenocitos ($p=0,004$).

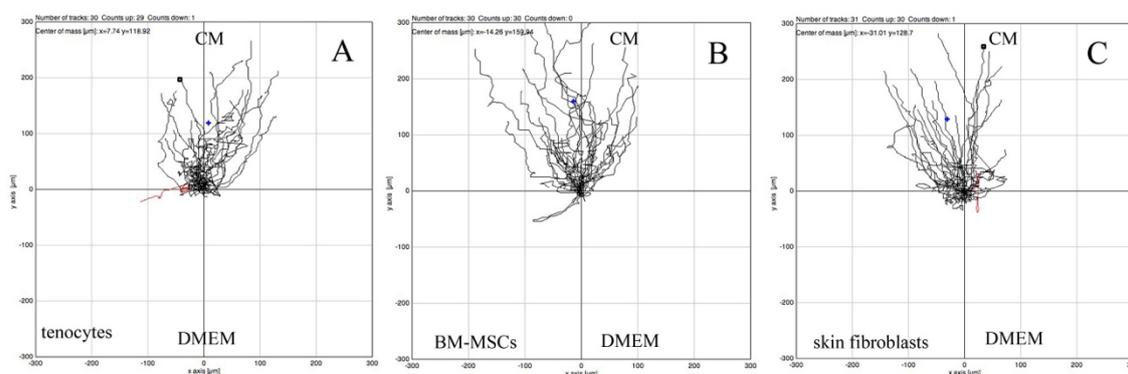


Figura 44. Gráficas representativas de la migración de las células de tendón (A), de las BM-MSCs (B) y de los fibroblastos de piel (C) hacia el medio condicionado (MC) ($n \geq 30$). El medio condicionado se inyecta inicialmente en la parte superior del μ -slide y se crea un gradiente progresivamente por difusión. El seguimiento de las células se realizó mediante la obtención de un time-lapse con microscopía de contraste de fases durante 24 horas.

MC/ DMEM (+/-)	Células de tendón	BM-MSCs	Fibroblastos piel
Velocidad ($\mu\text{m}/\text{min}$)	0.200 (0.009)	0.227 (0.013)	0.192 (0.01)
COM (μm)	132.63 (19.04)	136.87 (33.51)	145.30 (18.28)
Rectitud	0.519 (0.021) ^a	0.629 (0.025)	0.563 (0.024)
Test de Rayleigh (p)	3.865E-10 (0.57E-10)	1.75E-10 (1.68E-10)	5.406E-10 (6.71E-10)
MC/MC (+/+)			
Velocidad ($\mu\text{m}/\text{min}$)	0.176 (0.017) ^b	0.254 (0.013)	0.228 (0.013)
COM (μm)	14.09	22.32	11.46
Rectitud	0.265 (0.031)	0.237 (0.024)	0.229 (0.024)
Test de Rayleigh (p)	0.543	0.299	0.984

DMEM/DMEM (-/-)

Velocidad ($\mu\text{m}/\text{min}$)	0.184 (0.011) ^c	0.173 (0.015) ^d	0.269 (0.019)
COM (μm)	28.01	16.38	18.84
Rectitud	0.352 (0.03)	0.309 (0.036)	0.200 (0.023)
Test de Rayleigh (p)	0.100	0.457	0.334

Tabla 13. Parámetros que describen el movimiento celular hacia un gradiente de un compuesto quimiotáctico, en este caso el medio condicionado de tenocitos (+/-). Se muestran también los controles positivo (+/+) y negativo (-/-). La velocidad se expresa en $\mu\text{m}/\text{min}$, el Centro de Masas (COM), que expresa el movimiento de todo el grupo celular se expresa en μm , la rectitud, que expresa en qué medida las células van directas hacia el estímulo y el test de Rayleigh que indica si el compuesto a estudio es quimiotáctico cuando es inferior a 0,05. ^ap=0,017 BM-MSCs migran de manera mas directa que las células de tendón. ^bp=0,012 la velocidad de BM-MSCs en el control positivo (+/+) es superior a la de células de tendón. En el control negativo (-/-), la velocidad de los fibroblastos de piel fue superior a la de BM-MSCs (^cp<0,001) y a la de las células de tendón (^dp=0,004).

5.4.2.3. *EL medio condicionado indujo cambios en la expresión de moléculas de matriz y de factores de crecimiento en los 3 fenotipos celulares*

El cultivo en los hidrogeles de PRP en 3D suplementados con MC de tenocitos expuestos a PRP, indujo cambios en la expresión génica en los tres fenotipos celulares (n=9 para cada fenotipo celular; 3 donantes de células candidatas + MC de 3 donantes distintos de células de tendón). La estructura del cultivo también se vio afectada por el MC, observándose alineación de las células en el caso de las BM-MSCs y los fibroblastos de piel, pero no en el caso de las células de tendón (Fig. 45).

Las células en las que la adición de MC al cultivo indujo más cambios en la expresión génica fueron los fibroblastos de piel (Figura 45G y H). De modo interesante, el MC de tenocitos indujo un aumento de la expresión de *Scx* de 3 veces el obtenido sólo con el hidrogel de PRP en BM-MSCs (p=0.002) y de 5 veces en fibroblastos de piel (p=0,001). El MC también influyó en el patrón de expresión de las proteínas fibrilares *COL1A1*, *COL3A1*, pero no de *COL2A1*, más relacionado con el fenotipo cartilaginoso. Específicamente, el *COL1A1* aumentó 2,3 veces en fibroblastos de piel (p=0,005), pero no cambió en BM-MSCs. *COL3A1* aumentó 3,6 veces en BM-MSCs y 2,7 veces en fibroblastos de piel (p=0,002 para ambos). Por ello, tras la exposición a MC, el ratio *COL1A1:COL3A1* pasó a ser superior en fibroblastos de piel comparados con BM-MSCs (Fig. 45).

Los fibroblastos de piel presentaron también un aumento simultáneo de dos veces los niveles de expresión en hidrogeles de PRP del gen de *TGF β 1* (p=0,008) cuando los

hidrogeles se suplementaron con MC, así como de seis veces la expresión de *ACAN* ($p=0,018$) (Fig. 45).

El MC disminuyó de manera significativa la expresión los genes *COL1A1* ($p=0,018$) y *COL3A1* ($p=0,005$); y además redujo a la mitad la expresión de *Scx* ($p=0,050$) y *TGF β 1* ($p=0,001$) en células de tendón (Fig. 45A y B).

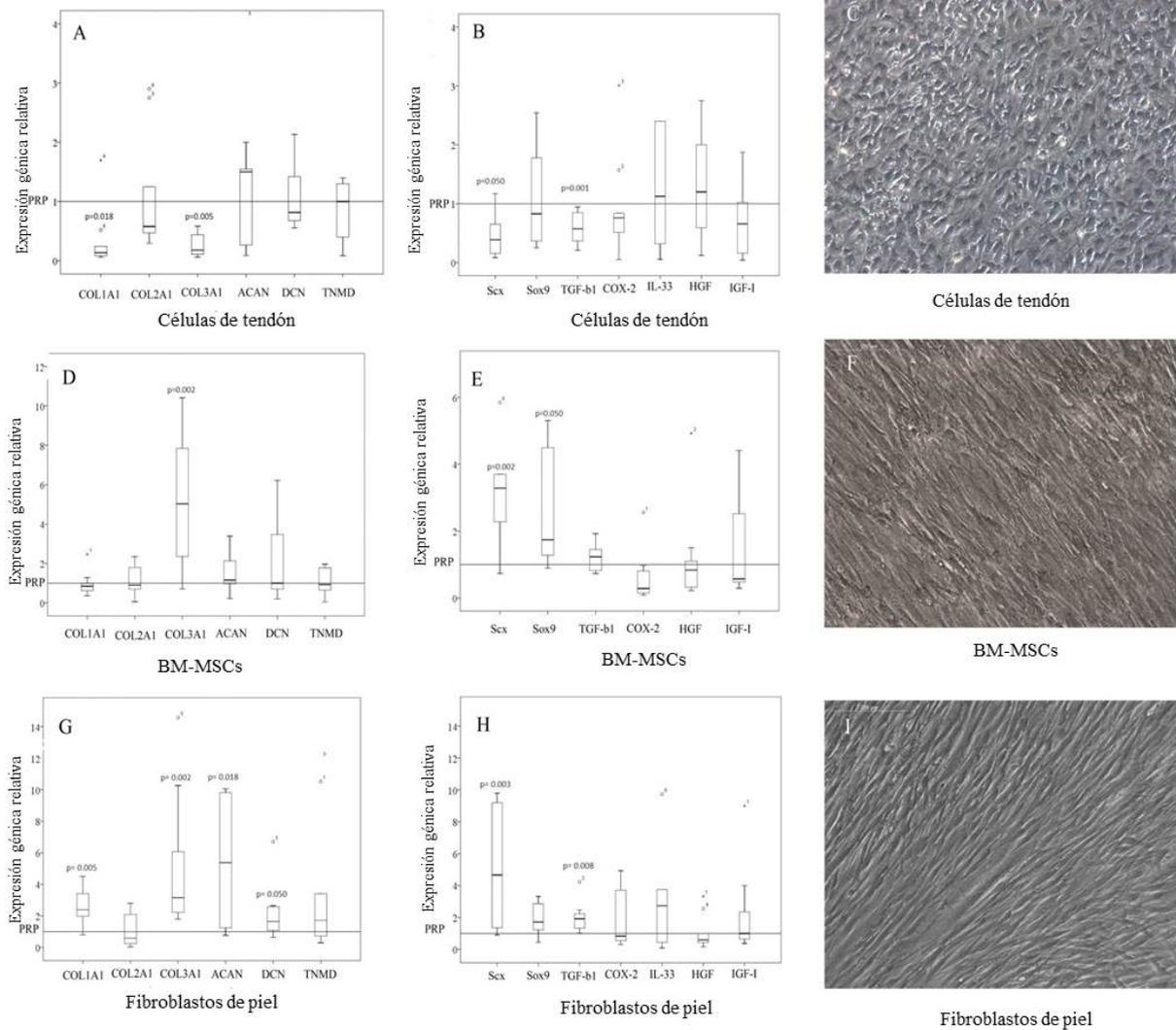


Figura 45. Expresión génica relativa de células de tendón (A, B), BM-MSCs (D, E) y fibroblastos de piel (G, H) cultivados en hidrogeles suplementados con MC, de los genes *COL1A1*, *COL2A1*, *COL3A1*, *ACAN*, *DCN*, *TNMD*, *Scx*, *Sox-9*, *TGF β 1* y *COX-2*, *IL-33*, *HGF* e *IGF*, expresada como 2^{-ΔΔCt} utilizando como control la expresión génica en los hidrogeles de PRP no suplementados con MC. Las cajas muestran la mediana y los percentiles 25-75 de la expresión génica relativa. Fotografías de las células de tendón (C), BM-MSCs (F) y fibroblastos de piel (I) a los 15 días de cultivo en hidrogeles de PRP suplementados con MC, a 10 aumentos obtenidas mediante una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases.

5.4.2.4. El medio condicionado modificó el fenotipo secretor de mediadores moleculares de los procesos inflamatorios de BM-MSCs y Fibroblastos de piel

La suplementación de los cultivos en hidrogeles de PRP con MC de tenocitos (n=9 para cada fenotipo celular; 3 donantes de células + MC de 3 donantes distintos de células de tendón), provocó modificaciones en la secreción citoquinas en BM-MSCs y fibroblastos de piel (Fig. 46).

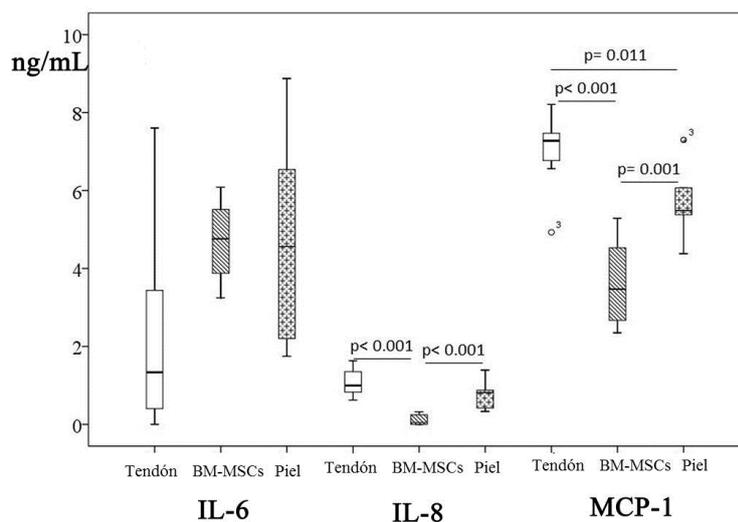


Figura 46. Secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1, en cultivos en hidrogeles de PRP en 3D suplementados con un 50% de MC durante 15 días, producida por las células de tendón, las BM-MSCs y los fibroblastos de piel expresada en ng/ml.

El MC indujo un aumento de la secreción de IL-6 en BM-MSCs ($p=0,002$) pero los niveles de IL-8 y MCP-1 no cambiaron. En fibroblastos de piel el MC produjo una disminución de la secreción de IL-8 ($p=0,036$) y una fuerte disminución de los niveles de MCP-1 ($p<0,001$) (Fig. 43 y 46).

Comparando los tres tipos celulares, los datos mostraron que las BM-MSCs secretaron menos IL-8 que las células de tendón y los fibroblastos de piel ($p<0,001$ para ambos). Y también menos MCP-1 ($p<0,001$ y $p=0,001$ respectivamente). A su vez, las células de tendón secretaron mayor cantidad de MCP-1 que los fibroblastos de piel ($p=0,011$) (Fig. 46).

RESUMEN DE RESULTADOS:

1. Las células de tendón presentaron un patrón de expresión constitutiva de genes de matriz extracelular, mediadores de la inflamación y factores de crecimiento muy

diferente al de fibroblastos de piel y BM-MSCs, que no mostraron diferencias entre ellos.

2. El cultivo en hidrogeles de PRP durante 15 días produjo una expresión mayor de *COL1A1*, *COL2A1*, *ACAN*, *Sox9*, *TNMD*, *TGFβ1* y *COX-2* en BM-MSCs en comparación con las células de tendón y los fibroblastos de piel. El ratio *COL1A1:COL3A1* también fue superior en BM-MSCs.
3. Los niveles de secreción de las citoquinas IL-8 y MCP-1 en BM-MSCs cultivadas en hidrogeles de PRP eran significativamente inferiores a aquellos obtenidos de los otros dos fenotipos celulares.
4. El medio condicionado de células de tendón expuestas a PRP durante 96h (MC) indujo proliferación celular y quimiotaxis de los 3 fenotipos celulares estudiados.
5. El medio condicionado estimuló la tenogénesis en BM-MSCs y fibroblastos de piel traducido en un aumento del factor de transcripción *Scx*, marcador de células de tendón, así como la modificación de los ratios de *COL1A1:COL3A1*.
6. El medio condicionado indujo un aumento de la secreción de IL-6 en BM-MSCs y una disminución significativa de IL-8 y MCP-1 en fibroblastos de piel.

6. DISCUSIÓN

Los tendones son avasculares y aneurales y tienen escasa celularidad; por lo tanto disponen de pocos recursos endógenos para auto-repararse.

Las tendinopatías son consecuencia de un intento fallido de reparación tisular y en consecuencia aparecen cambios vasculares patológicos, hiper celularidad y alteraciones de la composición de la matriz extracelular.

El PRP es una mezcla multi-molecular de proteínas señalizadoras que intervienen en inflamación y angiogénesis y en base a esto los PRPs pueden modificar los cambios fisiopatológicos del tendón. Por otro lado, las terapias celulares se basan en la implantación de células sanas en el tendón patológico, ya que las células son el elemento clave para la recuperación de la homeostasia tisular.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido explorar aspectos claves con relevancia clínica para el desarrollo y la optimización de las terapias biológicas para la patología tendinosa.

Estos aspectos han sido tratados en los cuatro trabajos de investigación que se han publicado en revistas internacionales de alto impacto científico y cuyos resultados concretos se discuten a continuación en el contexto de los conocimientos actuales.

El PRP tiene un papel clave en la modulación de la inflamación molecular inducida por IL-1 β (Artículo I)

La IL-1 β es una de las moléculas que ha sido propuesta como iniciadora de los procesos que inducen a la tendinopatía (126), aunque su participación en estos procesos sigue siendo controvertida. Aun así, la aparición de macrófagos, fuente de altas cantidades de IL-1 β , en pacientes con tendinopatías crónicas en seguimientos a largo plazo podría respaldar dicha hipótesis (127). Por ello, postulamos que el tratamiento de las células con dicha molécula podría ser una buena herramienta para estudiar la inflamación de las células de tendón y el efecto del PRP en estas condiciones. Para comprobar las hipótesis en células sanas y tendinopáticas, teniendo en cuenta las limitaciones que imponen los requerimientos éticos, se obtuvieron células de dos fuentes anatómicas diferentes: del semitendinoso (fuente de células sanas) y del manguito rotador (fuente de células tendinopáticas). Para tener en cuenta la heterogeneidad de las muestras en las comparaciones estadísticas, se llevó a cabo un estudio longitudinal comparando el mismo

tipo celular tratado con IL-1 β y después con PRP. Además, para evitar aumentar la variabilidad entre donantes de plasma atribuida a los leucocitos, se utilizó PRP puro, en vez de leuco-enriquecido (L-PRP) que, a su vez, es el tipo de plasma más utilizado en terapias aplicadas a tendinopatía (128, 129).

Tras el tratamiento con PRP de las células de tendón inflamadas, se observó que la expresión génica de algunas moléculas mediadoras de la inflamación como la *IL6* y la *IL8* estaba disminuida. Además, este hallazgo se vio reforzado por la disminución a nivel de secreción proteica de dichas moléculas tras el tratamiento con PRP. Esto indica un efecto inmuno-modulador del PRP en células de tendón inflamadas.

Por otro lado, se ha observado que genes como el *COL1A1*, *VEGF*, *IL6*, *IL6r* y *COX2* aumentan su expresión en tendones de Aquiles con rupturas en humanos (130). En concordancia, los datos obtenidos en este estudio mostraron que el PRP tenía la capacidad para provocar una disminución en los niveles de expresión de *COL1A1*, *VEGF*, *IL6*, *IL6r* y *COX2*. Otros estudios han demostrado que células de tendón activadas con TNF- α expresan elevados niveles de *MMP1*, *IL1 β* e *IL6* (131). De la misma forma, en nuestro estudio, estos genes disminuyen sus niveles tras el tratamiento con PRP. De hecho, la respuesta extrínseca celular a las lesiones involucra a los dos tipos de genes: primero, a los genes de moléculas involucradas en la inflamación y en mecanismos de adaptación tisular como la angiogénesis, y después a genes que regulan la matriz extracelular como los de colágenos fibrilares y enzimas de remodelación de matriz (*MMP1*, *MMP3*, *ADAMTS4*, *ADAMTS5*) (132).

En este estudio, encontramos evidencias que respaldan el concepto de que las células de tendón son inmunológicamente activas y responden al PRP disminuyendo la secreción de proteínas inmuno-reguladoras como IL-6, IL-8 y MCP-1, cuya secreción había sido previamente estimulada por IL-1 β . La asociación entre IL-6 e IL-8 con mecanismos de reparación en tendón de Aquiles ha sido identificada recientemente (133), pero hasta ahora hay escasa evidencia sobre la participación de MCP-1 en la biología del tendón (134, 135). Esta quimiocina participa en la inflamación y en la generación de dolor causada por la inflamación, así como en el dolor neuropático (136, 137).

Así, se podría postular que la reducción de los niveles de quimiocinas podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales el PRP puede modular la inflamación y disminuir el dolor en un contexto inflamatorio. De hecho, el MCP-1 atrae monocitos que expresan el

receptor de membrana CCR2 a la zona de la lesión. En un modelo experimental de osteoartritis, Miller et al (138) demostraron que la señalización mediante el receptor CCR2 modula el mecanismo de aparición de dolor en esta patología. Además, en un meta-análisis reciente que analiza estudios de microarrays, se identificó a MCP-1 como uno de los factores importantes de la propiocepción en muchos modelos de estudio del dolor (139). Ahora mismo, varios inhibidores de los receptores CCR2 para MCP-1 se están probando en ensayos clínicos para el tratamiento del dolor. Aunque no se conoce si la interacción del receptor CCR2 con MCP-1 está involucrada en la aparición de dolor en tendinopatías, esta interacción podría producirse en nervios periféricos presentes en el tendón y en su alrededor (140).

En este trabajo, también demostramos que la elevación de los niveles de IL-6 producida por la IL-1 β se disminuía tras el tratamiento con PRP, y se ha visto que la neutralización de IL-6 puede neutralizar la hiperalgesia (141). La confirmación de que la disminución de los niveles de MCP-1 e IL-6 en el contexto del tendón puede tener relevancia clínica en la aparición de dolor necesitaría de una mayor investigación.

El tratamiento con PRP también disminuyó los niveles de IL-8, pero no modificó los de GRO- α , quimiocinas con papel similar en la atracción de neutrófilos y en su desgranulación. Aunque hay discrepancias en el papel de los neutrófilos en la modulación de la inflamación y el dolor, sus efectos pueden depender de la presencia de distintos subtipos de receptores en el tejido y de la composición molecular del microambiente tisular local (142). Por ejemplo, en un estudio se observó que el reclutamiento selectivo de neutrófilos por GRO- α no indujo dolor en tejido no inflamado (143). De manera interesante, los neutrófilos participan en el control endógeno del dolor inflamatorio liberando sustancias opiáceas que actúan en las terminales de los nervios periféricos (142). La activación del receptor CCR2 por la IL-8 en neutrófilos produjo una liberación de β -endorfina y met-enkefalina in vitro (140, 143); por lo que estas quimiocinas pueden tener acciones directas en neuronas nociceptivas. De hecho, las acciones de GRO- α están mediadas por el receptor CXCR2 presente en las membranas de neuronas de pequeño diámetro, en las que induce cambios pronociceptivos en la excitabilidad (144).

Comparando la respuesta a PRP de células normales y patológicas no se identificaron diferencias notables. Aun así, la secreción de RANTES y HGF en respuesta a PRP fue diferente en células sanas y tendinopáticas, siendo superior en las últimas. El primero está

involucrado en la migración de leucocitos. El HGF tiene distintos papeles; es antiinflamatorio en tendones actuando a través de NF-kB (144) y es quimiotáctico y mitogénico para células endoteliales. La acción de estas proteínas y su papel en el cambio desde las condiciones sanas a las patológicas en tendón no se conoce y garantiza una investigación más a fondo.

En conclusión, el PRP influye la biología del tendón porque induce un fenotipo inmuno-modulador y pro-angiogénico, coherente con los mecanismos de reparación y la reducción del dolor. El PRP podría ayudar a recuperar la homeostasis tisular bajo condiciones patológicas porque produce una disminución de la expresión génica de mediadores inflamatorios además de la secreción de proteínas inmuno-moduladoras y angiogénicas en células de tendón inflamadas. La neutralización de citoquinas pro-inflamatorias puede atenuar la hiperalgesia (141), pero la relevancia clínica de dicha neutralización debería ser objeto de una investigación más a fondo.

La investigación llevada a cabo en este artículo tiene diversas limitaciones que deben ser citadas. Primero, las limitaciones propias de los cultivos celulares, que no mimetizan a la perfección las condiciones que se dan en los tejidos ya que sólo hay un tipo celular y no hay irrigación sanguínea ni señalización paracrina con otros fenotipos celulares, pero la ventaja de utilizar cultivos primarios en pasajes bajos es que las células son lo más parecidas posible a aquellas presentes en las biopsias. Por otro lado, las células utilizadas en este trabajo expresaban escleraxis pero no expresaban tenomodulina, marcador de células de tendón; pero se ha demostrado que la expresión de tenomodulina no sólo se encuentra en células de tendón, sino que también se encuentra en condrocitos y osteoblastos (145) y que está condicionada por la estructura del cultivo (146). Los resultados de este artículo deberían comprobarse en estudios en cocultivos e *in vivo* para confirmar los mecanismos paracrinos en la inmunidad innata y angiogénicos que proponemos. Además debería tenerse en cuenta el contexto espacio-temporal que tiene el *cross-talk* de las citoquinas en los procesos de reparación y la implicación del PRP en dichos mecanismos

Los hidrogeles de PRP proporcionan un modelo de cultivo tridimensional que mimetiza mejor las condiciones fisiológicas del tendón que los modelos de cultivo tradicionales en dos dimensiones (Artículo II)

Los datos experimentales obtenidos en experimentos con cultivos celulares apoyan el uso del PRP para mejorar la reparación tisular en tendón por su potencial mitogénico y su capacidad para estimular la síntesis de moléculas de matriz extracelular (147-148). Pero a pesar de haberse obtenido estos resultados, esta información no está en concordancia con los resultados clínicos reportados previamente tras la aplicación de PRP en patología tendinosa (149). Teniendo en cuenta la complejidad de los microambientes moleculares *in vivo*, es necesario estudiar la influencia del PRP en la biología de las células de tendón en condiciones fisiológicamente relevantes. Para ello, desarrollamos un modelo de cultivo en hidrogeles de PRP en 3D y lo comparamos con los modelos de cultivo tradicionales en 2D.

Las plaquetas liberan un pool de moléculas pequeñas y difusibles, que incluyen a factores de crecimiento, interleucinas y otras citoquinas. El PRP contiene, entre otras, concentraciones relevantes de IGF-1, TGF- β y PDGF-BB, factores cruciales que se han asociado con la regeneración de tendón (150). Notablemente, el potencial mitogénico de este pool molecular se mantiene cuando las células están cultivadas en los hidrogeles de PRP en 3D, indicando que las moléculas de señalización presentes en el PRP se diseminan espacialmente en el hidrogel. Además, la arquitectura de los hidrogeles de PRP modula la morfología de las células de tendón y promueve la expresión génica de los marcadores de tendón.

Los factores que permiten definir las células de tendón además de su localización anatómica son todavía objeto de debate. Además, la falta de biomarcadores específicos de tendón limita la identificación de subpoblaciones de células dentro de las subpoblaciones residentes en el tendón. En la actualidad, las células de tendón se identifican en base a la detección de la expresión génica simultánea de un panel de factores de transcripción no específicos como *Scx*, *MKX*, y moléculas de matriz extracelular como *COL1A1*, *COL3A1*, *FN*, *TNMD* y *DCN* (14). En las células cultivadas en los hidrogeles de PRP en 3D, se detectaron niveles superiores de expresión del factor de transcripción *Scx* y de la glicoproteína de transmembrana *TNMD*, moléculas clave para la formación de tendón y para el mantenimiento del fenotipo celular, en comparación con el cultivo tradicional en 2D. Este hallazgo es relevante porque las células derivadas de

tendón muestran signos de des-diferenciación y pérdida del fenotipo (pérdida de la expresión de *Scx* y *TNMD*) tras los primeros tres pases en cultivos en 2D (151).

Se ha reportado un aumento de la expresión de los marcadores de tendón como *Scx*, *TNMD* y *DCN* en presencia de IGF-1 y TGF- β 3 en cultivos en 2D (152). De forma interesante, en el cultivo en hidrogeles en 3D, la expresión de *Scx* y *TNMD* se vio aumentada no sólo en pases bajos (pase 2), sino también en pases celulares altos (pase 10), indicando que la configuración en 3D *per se* puede incrementar la expresión de estos marcadores génicos asociados al tendón. De la misma forma, se ha observado que el cultivo de tenocitos en soportes de colágeno cubiertos con fibrina produjo un aumento de la expresión de *TNMD* (153).

Una morfología alargada es esencial para que los tenocitos mantengan su fenotipo y, muy probablemente, su función (154). Se ha demostrado que los niveles de expresión de diversas moléculas de matriz incluyendo colágenos, glucosaminoglicanos e integrinas se modulan por el alcance de las adhesiones celulares, por lo que dicha morfología puede afectar a la secreción de matriz extracelular por parte de las células del tendón.

La reparación de tendón se atribuye a diversos mecanismos concomitantes. Principalmente, la verdadera regeneración de tendón se cree que recapitula procesos de desarrollo como la diferenciación celular y la fibrilogénesis, que permiten la restauración de las propiedades nativas del tejido. La investigación *in vitro* en constructos de fibrina en 3D ha demostrado que las células de tendón maduras son capaces de recapitular la fibrilogénesis (155). Estos resultados sugieren que los déficits regenerativos en los tendones maduros no están asociados a las capacidades intrínsecas del tendón, sino que están relacionadas con un microambiente molecular tisular hostil. De hecho, las diferencias en la capacidad de respuesta ante una lesión de los tendones maduros en comparación a los embrionarios se atribuyen a procesos inflamatorios (156). En esta línea, demostramos que los procesos inflamatorios y angiogénicos inducidos por el PRP involucran la secreción de IL-6, IL-8, MCP-1 y VEGF por parte de las células de tendón (157). Debido a sus propiedades pleiotrópicas, el papel de estas citoquinas sigue siendo controvertido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Los déficits regenerativos de los tendones, en particular su limitada respuesta ante una lesión, pueden atribuirse, entre otras, a su capacidad limitada para detectar una lesión. Este fracaso puede deberse a la ausencia de señalización molecular. En este sentido, el

PRP provee de un pool de señales moleculares relacionadas con las lesiones que pueden ayudar a los tendones a superar esta limitación. Estas señales se propagan espacialmente a lo largo del tejido para activar la respuesta de intrínseca de las células.

En estudios previos, nosotros y otros investigadores hemos reportado la respuesta angiogénica e inflamatoria de las células de tendón al tratamiento con PRP (148,157). Para verificar si los efectos paracrinicos del PRP se mantienen en condiciones 3D, realizamos un *array* proteómico específico para angiogénesis e inflamación. Nuestro análisis sólo reveló pequeñas diferencias entre los cultivos en 2D y 3D, pero la secreción de las principales citoquinas angiogénicas e inflamatorias se mantuvo inafectada, indicando que la arquitectura del cultivo no modifica la respuesta de las células de tendón al PRP con respecto a estos mecanismos.

Este estudio presenta diversas limitaciones. Las células de tendón muestran distintos patrones de expresión génica en las distintas condiciones de cultivo, pero la expresión génica es un proceso dinámico que necesitaría múltiples evaluaciones en distintos puntos temporales para estar plenamente caracterizada. En cuanto a la secreción proteica, tiempos de cultivo más largos podrían proveer de una imagen más completa de la fibrilogénesis y de los procesos inflamatorios y angiogénicos desencadenados por el PRP.

Para la optimización del estudio del efecto del PRP en tendones patológicos, se deben obtener resultados significativos en la investigación *in vitro* que faciliten la comprensión del efecto de esta terapia biológica en tendinopatías. En este contexto, hemos demostrado el efecto del cultivo en hidrogeles de PRP en 3D de las células de tendón en contraste con los cultivos tradicionales en 2D. Estudios futuros utilizando estimulación mecánica y condiciones de hipoxia en la presencia de PRP deberían llevarse a cabo para mejorar aún más el modelo de cultivo de células de tendón. Aunque la investigación experimental no puede sustituir a la investigación clínica, creemos que la mejora de los modelos de investigación puede permitir mejorar el conocimiento sobre la influencia del PRP en la biología de las células de tendón, y con él la traslación directa de resultados que permita la mejora de las terapias de PRP y el diseño de los ensayos clínicos.

Distintas formulaciones de plasma presentan distintas ventajas biológicas para su aplicación en tendinopatías (*Artículo III*)

En este estudio, se buscó analizar las diferencias funcionales inducidas por 3 formulaciones de plasma diferentes al tratar las células de tendón patológico. Así, demostramos que el tratamiento con PRP y L-PRP promovió la hipercelularidad aumentando la proliferación celular y la migración. También probamos que el PPP y el PRP tenían una mayor capacidad de estimular a las células de tendón para la síntesis de matriz extracelular. El PRP y el L-PRP mostraron ser más pro-inflamatorios que el PPP, pero las células cultivadas en los hidrogeles de PPP secretaron más cantidad de MCP-1.

En clínica, se han obtenido resultados controvertidos en relación a la eficacia del tratamiento conservador de tendinopatías con inyecciones de PRP (134, 158, 159). Estudios previos han demostrado que la presencia de leucocitos, el enriquecimiento en plaquetas y el número de inyecciones pueden influenciar la variabilidad de los resultados clínicos en el tratamiento de tendinopatías con PRP (97, 147, 160, 161, 162). Comparando células tendinopáticas cultivadas en hidrogeles de tres formulaciones diferentes de plasma en 3D (PPP, PRP y L-PRP), obtuvimos información relevante en relación a sus efectos diferentes en procesos críticos para la reparación tisular como la quimiotaxis, la proliferación, el anabolismo de matriz extracelular y la inflamación.

Un acercamiento razonable hacia la mejora de la reparación tisular en tendón sería el de aumentar la migración celular dirigida de células mesenquimales hacia las zonas tendinopáticas. La inhabilidad del PPP para estimular la migración, y el aumento de dicha capacidad en el L-PRP comparado con el PRP, están de acuerdo con estudios previos demostrando que las moléculas secretadas por las plaquetas aumentan la migración celular (163). Tanto L-PRP como PRP pueden formar gradientes de moléculas quimiotácticas como SDF-1 o PDGF-AB, que, como se ha observado en los resultados, en los que la suplementación del PPP con SDF-1 a pesar de ser un potente agente quimiotáctico, no permite recuperar la capacidad quimiotáctica del PRP, actúan de manera sinérgica para favorecer la migración de las células de tendón, pero también se produce la infiltración de células precursoras en el tejido dañado (163). La migración celular es crucial para la reparación de tendones degenerados que tienen una celularidad muy reducida. Se ha visto que el PRP aumenta la proliferación celular en células de manguito rotador degenerado (99), y también que el L-PRP aumenta la proliferación de células progenitoras de tendón en comparación con el PRP (164). Estas diferencias

podrían atribuirse al enriquecimiento de plaquetas diferentes en cada formulación y también a la presencia/ausencia de leucocitos (164).

En un tendón degenerado, la aplicación de una formulación de plasma que produzca un aumento del anabolismo de la matriz extracelular puede ser la mejor opción terapéutica. Nuestros resultados revelaron que los hidrogeles de L-PRP tienen propiedades catabólicas en células tendinopáticas, basándonos en la reducción de la expresión génica de *COL1A1* y *COL3A1* y el aumento de *MMP1*. Estos resultados están en concordancia con estudios anteriores realizados en células sanas de tendón de caballo (165). Este grupo también demostró que una reducción en el número de leucocitos es más importante para minimizar la señalización molecular catabólica comparada con el incremento en el número de plaquetas en el plasma. Se ha visto que la expresión del enzima MMP1, que degrada principalmente el colágeno tipo 1 de la matriz extracelular, está regulada al alza en pacientes con desgarros totales del supraespinoso (166). Además, se ha comprobado que esta regulación al alza correlaciona fuertemente con la incapacidad de desarrollar mecanismos de curación en tendones de manguito rotador en un estudio caso-control (167).

La estructura del colágeno esta entrelazada con otras proteínas no-fibrilares que permiten a los tendones soportar altas cargas y les proveen de estabilidad (168, 169, 170). Junto con las propiedades catabólicas del L-PRP, encontramos que su aplicación está acompañada de una reducción significativa de la expresión de *DCN*. La decorina es un proteoglicano rico en leucinas cuya deficiencia, se ha demostrado en ratones *knockout* *Dcn* (-/-), resulta en una formación deficiente de la estructura de las fibrillas de colágeno con propiedades mecánicas inferiores a las de las fibras de colágeno de tendones sanos (171). El contenido de decorina afecta principalmente a las propiedades visco-elásticas del tendón (168, 172, 173). Además, la expresión de fibronectina, llamada también “organizadora maestra”, por su implicación en en la iniciación, progresión y maduración de la fibrilogénesis, se ve reducida en las células tendinopáticas cultivadas en los hidrogeles de L-PRP.

El PPP es una mezcla multi-molecular, aunque menos compleja que le PRP y el L-PRP, y su aplicación en clínica no ha sido explorada aún. Contiene cantidades considerables de IGF-1, IGF-BP y HGF, sintetizados principalmente en el hígado, que pueden ser útiles en ciertas fases de los procesos de reparación tisular por sus propiedades anabólicas y antiinflamatorias. En nuestro estudio, el PPP provocó un aumento del anabolismo y la

expresión de las proteínas *DCN* y *FN*, pero el PPP no es mitogénico. Estudios previos han demostrado que las células tendinopáticas tratadas con PPP pueden ser una fuente de CTGF paracrino, que puede inducir la proliferación y la diferenciación de células endógenas progenitoras de tendón CD146+ perivasculares (174, 175). Además, el CTGF disminuye la actividad pro-inflamatoria de IL-1 β vía NF- κ B.

Los aspectos positivos del L-PRP y del PRP incluyen una fuerte inducción de la proliferación y la migración, mecanismos cruciales en los procesos de curación. La locomoción celular y la migración hacia estímulos quimiotácticos son características importantes en las fases tempranas de la reparación tisular. La baja velocidad de las células al migrar hacia gradientes de PPP demuestra que la quimiotaxis está inducida sobre todo por el secretoma plaquetario, que podría sobrepasar las ventajas ofrecidas por su potencial anabólico.

Los tenocitos aislados de tejido tendinopático juegan un papel importante en la inflamación debido a su involucramiento en la señalización paracrina con las células inmunes, mediante la producción y la secreción de interleucinas quimiotácticas, incluyendo IL-8, IL-6, MCP-1 y RANTES (157). La IL-6 es una interleucina pro-inflamatoria con actividades biológicas complejas, producida por células inmunes y estromales como consecuencia de la activación de receptores Toll-like, como respuesta a estrés, o activación celular por otras citoquinas como IL-1 β (176). En concordancia con estudios previos, el uso de PPP podría tener algunas ventajas sobre el de PRP y L-PRP, como por ejemplo en la disminución de la secreción de IL-6 por parte de células tendinopáticas al cultivarse en hidrogeles de PPP comparado con la de aquellas cultivadas en PRP y L-PRP (164). Además, las células en PPP crearon un gradiente de MCP-1, que precede a la regeneración nerviosa en regeneración tendinosa temprana (135) y atrae a monocitos desde el torrente sanguíneo. Este hallazgo es interesante y garantiza futuras investigaciones. Aunque permanece poco claro si la angiogénesis es un factor diagnóstico pobre para la tendinopatía, los ensayos de imagen utilizando ecografía Doppler muestran alta concentración de nuevos vasos sanguíneos en pacientes con rupturas en tendón (177). En contraste con esto, un estudio llevado a cabo por Carr et al (178) interpretó la reducción en el número de vasos sanguíneos y la celularidad tras 12 semanas después de una acromioplastia realizada por artroscopia acompañada con L-PRP como perjudicial para la reparación tisular. Desafortunadamente, este estudio no pudo revelar ninguna asociación entre la celularidad, la angiogénesis y los resultados clínicos.

En este estudio, investigamos las ventajas e inconvenientes del PPP, PRP y L-PRP. Establecer las características del tejido (por ejemplo celularidad, vascularización e hipocogenicidad) que puedan utilizarse como buenos parámetros de pronóstico para intervenciones biológicas es un gran desafío en la investigación en tendinopatía.

Una vez que se establezcan los parámetros de pronóstico que describan la biología del tejido tendinoso, planear la mejor estrategia terapéutica y sacar provecho de las propiedades biológicas de cada formulación de plasma será más fácil. Una descripción cuidadosa del tejido diana de la terapia biológica es primordial, ya que los efectos del plasma dependen de su interacción con él. La localización anatómica de la tendinopatía es crucial, ya que las diferencias entre la naturaleza de las células residentes en el cuerpo del tendón y en la entesis (células fibroblásticas vs condroides) así como en la composición de la matriz extracelular pueden condicionar el diseño y los resultados de la terapia. Hoy en día no es posible describir en detalle déficits principales de los tejidos tendinopáticos de pacientes, lo que representa un problema importante en el desarrollo de terapias eficaces para su tratamiento. Los avances en la investigación en esta dirección permitirían aprovechar las ventajas de las distintas formulaciones de plasma.

La pauta de tratamiento para la aplicación del PRP no está clara. Algunos autores reportan que el uso de varias inyecciones de plasma (por ejemplo 2-3 ciclos de inyecciones) no mejoran los resultados clínicos (179, 180). Los planes de tratamiento basados en administración secuencial de distintas formulaciones de plasma deben ser investigados. Por ejemplo, podría proponerse una primera inyección de L-PRP, tomando ventaja de sus propiedades quimiotácticas y mitóticas, seguida de una inyección de PPP tras 1 o 2 semanas para estimular el anabolismo de la matriz extracelular. La información sobre las características del tejido tendinopático puede influenciar la elección de las formulaciones de plasma diseñadas para satisfacer las necesidades temporales del tejido. Es necesario dilucidar en mayor profundidad los mecanismos básicos para entender las diferencias en los patrones moleculares de la secreción de moléculas inflamatorias entre las distintas formulaciones. El énfasis debería estar en las necesidades temporales y las características biológicas del tendón patológico, y las formulaciones de plasma deberían diseñarse en consecuencia.

Deben indicarse algunas limitaciones de este estudio. Primero, a pesar de que nuestro modelo en un sistema de cultivo en 3D, no se tuvieron en cuenta las fuerzas mecánicas externas. Algunos biorreactores buscan introducir algunos patrones e historial de carga

para reproducir las tensiones, pero el estrés de compresión y cizalladura no han conseguido ser replicadas en un modelo *in vitro* significativo. Otros acercamientos a los modelos de tejido tendinopático no han sido validados (181) y el comportamiento celular en el tejido patológico puede reflejar artefactos producidos por la muerte celular y la degradación de la matriz extracelular. Una segunda limitación de de nuestro estudio es que no utilizamos sistemas comerciales como los utilizados en la práctica clínica. Pero debido a que el PRP puede prepararse a partir de muestras de bancos de sangre o en instalaciones estériles siguiendo buenas prácticas de laboratorio, el PRP utilizado en este estudio fue preparado mediante un protocolo de una sola centrifugación en una sala blanca, que dio como resultado un PRP similar al obtenido con el dispositivo ACP (Arthrex Inc, Florida, USA) o con el dispositivo Cascade (MTF, NJ, USA), que se usan habitualmente en investigación como representativos de los PRP puros (160, 182). Por otro lado, el L-PRP se preparó siguiendo un protocolo de doble centrifugación que produce un L-PRP similar al obtenido con el dispositivo Magellan (Arteriocyte Medical Systems Inc, MA, USA), que es una formulación representativa de los L-PRPs obtenidos por doble centrifugación (129, 160). Para evitar los artefactos que según nuestra experiencia inducen los eritrocitos en los cultivos de células de tendón, no utilizamos el método de recogida del buffy coat para preparar el L-PRP. La tercera limitación de este estudio es que el L-PRP tenía una mayor concentración de plaquetas que el PRP puro, por lo que las diferencias entre los efectos de ambos podrían deberse a la diferencia en el enriquecimiento en plaquetas además de a la presencia de leucocitos. Aun así, esta formulación de L-PRP refleja la realidad clínica en la que los procedimientos de doble centrifugación para obtener L-PRP producen mayores concentraciones de plaquetas y leucocitos que los procedimientos de centrifugación simple.

En conclusión, nuestros hallazgos indican que las principales ventajas de la aplicación de L-PRP y PRP, en comparación con el PPP incluyen sus fuertes propiedades mitogénicas y quimiotácticas. Además, mientras el PPP y el PRP estimulan el anabolismo de la matriz extracelular, el L-PRP es más pro-inflamatorio. El énfasis debería ponerse en las necesidades temporales y las características biológicas del tendón lesionado; así las formulaciones de plasma deberían diseñarse en consecuencia a las necesidades de cada paciente.

¿Cuál es la mejor fuente de células para diseñar una terapia avanzada en combinación con PRP para su aplicación en tendinopatías? ¿Qué efecto podría tener pre-acondicionar el tejido receptor con PRP antes de implantar las células? (Artículo IV)

Las intervenciones biológicas basadas en la implantación de células expandidas *in vitro*, como fibroblastos de piel, células de tendón o BM-MSCs combinadas con PRP representan una estrategia potencial para la reparación de tendón (116, 182). Para la optimización de los resultados de la terapia de combinación, la fuente de las células, el vehículo y el pre-acondicionamiento del tejido receptor deben ser investigados.

En este estudio, hemos demostrado que dependiendo de la fuente anatómica de las células, estas responden de manera diferente al microambiente *in vitro* variando el fenotipo secretor de matriz extracelular y de proteínas mediadoras de la inflamación. La plasticidad *in vitro* de los 3 fenotipos estudiados provee información sobre cómo estas poblaciones se pueden comportar al ser implantadas embebidas en PRP en un tendón. Una preocupación común al implantar células en terapia celular es la gran proporción de células que no permanecen en el tejido diana y se pierden (182). Para superar este problema crucial, las células pueden ser implantadas utilizando PRP como vehículo para confinarlas en el lugar de la lesión.

La migración celular de células locales y la proliferación celular son dos mecanismos vitales que deben ser considerados a la hora de diseñar una terapia biológica. El PRP ha demostrado tener propiedades quimiotácticas y mitogénicas para las células de tendón. Además, en este estudio, hemos demostrado que el medio condicionado, es decir el conjunto de proteínas y otros compuestos secretados, de células de tendón tratadas con PRP es mitogénico y quimiotáctico para los propios tenocitos, así como para las BM-MSCs y los fibroblastos. Es decir, que el tratamiento del tendón con PRP puede estimular al propio tejido para que secrete moduladores que permitan la migración endógena de las células del propio tejido, así como de células residentes en la periferia del tendón, cuya participación puede ser crucial en los mecanismos de reparación (14). Pero, para lesiones severas en las que las células locales no pueden atender a los requerimientos de la lesión, combinar PRP con células exógenas puede ser un tratamiento adecuado ya que confina las células implantadas a la vez que ejerce un efecto llamada a las células locales y modifica el microambiente tisular.

La fuente de células óptima para utilizar en reparación de tendón puede depender del lugar anatómico exacto de la lesión, es decir, si se encuentra en la zona media del tendón o en la entesis de fibrocartílago. En este sentido, en este estudio, las BM-MSCs expresaron mayores niveles de genes de matriz extracelular relacionados con el cartílago como el *COL2A1*, el *ACAN* y el factor de transcripción *Sox9*, así como de *TNMD*, en comparación con las células de tendón y los fibroblastos de piel. La tenomodulina (TNMD) es un inhibidor de la angiogénesis que se expresa predominantemente en regiones avasculares del tendón y el cartílago (183). Aunque este problema no puede basarse en datos de expresión génica y requiere de una confirmación obligatoria *in vivo*, los resultados *in vitro* podrían sugerir que la terapia de combinación con BM-MSCs y PRP podría ser la más apropiada para regenerar la entesis fibrocartilaginosa en la que el tendón está unido al hueso. *In vivo*, se ha observado que, tras la resección quirúrgica de la entesis del tendón de Aquiles en ratas, el grupo tratado con una inyección de BM-MSCs mostró una mejor organización de la matriz y una mejora de las propiedades biomecánicas en comparación con los controles o las ratas tratadas con condrocitos (184).

Los fibroblastos de piel y las BM-MSCs embebidos en hidrogeles de PRP no expresan el factor de transcripción *Scx* en la misma medida que las células de tendón y, en consecuencia, no se consideran diferenciadas a células de tendón. *Scx* es un factor de transcripción clave que se expresa en las células de tendón y en sus progenitoras (185). El microambiente molecular provisto por las células de tendón estimuladas con PRP, es decir, el medio condicionado, estimuló la expresión de *Scx* en ambas, BM-MSCs y fibroblastos de piel, de acuerdo con otros modelos de co-cultivo en los que se han utilizado MSCs y células de tendón (150, 186, 187). Se han propuesto diversas moléculas que modulan la diferenciación tenogénica, como el TGF- β 1. En esa línea, en este artículo se encontró una correlación positiva entre la expresión de TGF- β 1 y *Scx* (188, 189).

Las BM-MSCs mostraron una expresión elevada de *COL1A1*, el componente mayoritario de la matriz extracelular del tendón y tuvieron el ratio *COL1A1:COL3A1* más elevado. Los tendones son tejidos funcionales mecánicamente y un ratio *COL1A1:COL3A1* se asocia con propiedades mecánicas debilitadas (190). Apoyando estos datos, la implantación de BM-MSCs en tendinopatías en tendones flexores digitales de caballos ha mostrado mejorar y normalizar los parámetros bioquímicos y composicionales de los tendones sin aparición de fibrosis tras un seguimiento de 6 meses (191).

Una desventaja de las BM-MSCs es que en este estudio, al ser expuestas a medio condicionado, mostraron una disminución del ratio colágeno 1: colágeno 3. En estas condiciones, los fibroblastos de piel, además de expresar marcadores de tendón, evidenciaron un mejor ratio colágeno 1: colágeno 3, lo que podría ser más adecuado para la curación de la porción media del tendón. Así, si se pre-acondiciona el tejido antes de la implantación de las células, los fibroblastos de piel podrían ser más adecuados. Por otro lado, la confirmación de esta hipótesis en modelos animales de tendinopatía es imperativa para sacar conclusiones acerca de la idoneidad de uno u otro tipo celular.

Los estudios sobre terapias celulares existentes no se han enfocado a la posible modificación del tejido diana, que presenta un microambiente molecular hostil, antes de aplicar la terapia celular. Una posibilidad es que el tejido receptor no sea receptivo para las células y por ello no suministre las señales tróficas adecuadas (192). Se ha propuesto un vínculo entre la inflamación y la síntesis de matriz extracelular en tendones representado por la IL-33 ya que, además de estar involucrada en la síntesis de colágeno III, opera en los tendones vía señalización mediante el receptor IL-1R y aumenta la síntesis de IL-6, IL-8 y MCP-1 *in vivo* e *in vitro* (193). Esta última se ha relacionado con cambio en tendinopatía temprana, más específicamente en desregulación de la expresión de colágeno III (193). Acorde a estos hallazgos, observamos que las células que expresaban *IL-33* (células de tendón y fibroblastos de piel) secretaban niveles más elevados de IL-8 y MCP-1.

El medio condicionado de las células de tendón expuestas a PRP indujo un aumento de la citoquina pleiotrópica IL-6 en BM-MSCs, pero tras 15 días de exposición, secretaban menos IL-8 y MCP-1 que las células de tendón y los fibroblastos de piel. Esto podría indicar que una respuesta inflamatoria celular más débil podría estar vinculada a un fenotipo secretor de matriz extracelular mejorado.

La plasticidad de las BM-MSCs las hace apropiadas para las terapias de tendón, pero un inconveniente de las BM-MSCs es que su extracción se realiza mediante un procedimiento invasivo y doloroso; y la reproducibilidad de dichos procedimientos es controvertida. En cambio, las biopsias de piel y de tendón pueden ser obtenidas más fácilmente evitando los problemas de incoherencia encontrados en de las muestras de médula ósea. En los estudios clínicos referenciados en este artículo, las biopsias de tendón se obtienen del tendón rotuliano, mientras que los fibroblastos de piel se obtienen del aspecto lateral del muslo mediante un punch de biopsias de 4mm de diámetro. Además,

para acelerar la expansión *ex vivo* de las células, se puede utilizar PRP de grado clínico para disminuir el tiempo que transcurre entre la recogida y la implantación (195).

Este estudio presenta diversas limitaciones que deben ser nombradas. No incluimos en nuestro estudio las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) que presentan ventajas (extracción y amplificación) comparadas con las BM-MSCs. Otro inconveniente de este estudio es que es meramente descriptivo y no se exploran mecanismos. Aunque hemos observado que los 3 tipos celulares se comportan de manera diferente en las condiciones experimentales analizadas, no sabemos por qué se comportan de una manera u otra. Para mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos que producen los cambios observados en expresión génica deberíamos estudiar vías de señalización intracelular como la de IL-1R o NF- κ B (196). En el estudio de perfil de expresión génica, exploramos un número limitado de genes, y el estudio de colágenos fibrilares adicionales, como el *COL5A1* y *COL11A1*, así como de genes reguladores del ensamblaje de fibrillas y fibras, como el *COL12A1* y *COL14A1* sería apropiado.

Para llegar a conclusiones robustas, los hallazgos encontrados *in vitro* deberían comprobarse en modelos animales de tendinopatía para más tarde estudiar las propiedades mecánicas y bioquímicas de los tendones tratados con la terapia de combinación propuesta con o sin pre-acondicionamiento con PRP. Así, podría deducirse la elección de la terapia más eficiente para la regeneración de cada zona del tendón.

Para concluir, en este estudio hemos provisto de información sobre cómo la elección de la fuente de las células utilizadas en terapias celular puede modificar los parámetros biológicos involucrados en la reparación de tendón. El medio condicionado de las células de tendón combinado con PRP estimuló la tenogénesis de BM-MSCs, como ya se ha visto en otros estudios (197), así como de los fibroblastos de piel.

Las BM-MSCs sintetizan menos proteínas inflamatorias IL-8 y MCP-1. Pero debido a que los fibroblastos de piel son más accesibles, su ratio de colágeno I: colágeno III apropiado y la secreción reducida de MCP-1 comparado con las células de tendón, así como su alta tasa proliferativa que reduce los tiempos de expansión *ex vivo*, parecen ser una elección alternativa a las BM-MSCs para tratar las lesiones de tendón.

Estos resultados son relevantes para el diseño de ensayos clínicos con células autólogas y PRP.

7. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral proporcionan nueva información sobre el efecto terapéutico del PRP y la Terapia Celular en los mecanismos biológicos de reparación tisular.

Concretamente, hemos mostrado que tanto el PRP (conjunto de moléculas de señalización celular) como las células adultas expandidas “*ex vivo*” intervienen en los procesos de reparación tendinosa, esto es proliferación y migración celular, síntesis de matriz extracelular y modulación de la inflamación y angiogénesis.

Asimismo hemos mostrado que la formulación de PRP así como la fuente celular son factores importantes en el diseño de terapias biológicas para la regeneración tendinosa.

Artículo I

- El PRP podría ayudar a recuperar la homeostasis tisular mediante la disminución de la expresión de genes sobre-expresados en condiciones patológicas inflamatorias.
- La acción moduladora de la respuesta inflamatoria e inmune del PRP también se observa en la disminución de la secreción proteica de mediadores de dicho proceso.
- El PRP induce un fenotipo celular inmuno-modulador y angiogénico en células inflamadas tanto sanas como tendinopáticas, asociado a mecanismos de reparación y a reducción del dolor, sin que existan diferencias entre células procedentes de tejido sano o patológico en nuestras condiciones experimentales.

Artículo II

- El modelo de cultivo celular en hidrogel de PRP en 3D mimetiza mejor las condiciones fisiológicas de las células de tendón que los cultivos tradicionales en 2D, en base a que las células adoptan una morfología celular más parecida a la fisiológica y en paralelo modifican la expresión de marcadores de tendón e integrinas de membrana. Sin embargo el patrón de expresión de proteínas angiogénicas e inflamatorias es similar excepto para IL-6 e IL-8.
- A pesar de ello, la utilización de los modelos de cultivos celulares clásicos en 2D se justifica mediante el uso correcto de controles que permitan comparar las distintas condiciones experimentales.

Artículo III

- El PRP y el L-PRP presentan propiedades quimiotácticas y proliferativas superiores a las del PPP para las células derivadas de tendón tendinopático.
- El PPP y PRP parecen estimular las capacidades anabólicas de las células porque estimulan la secreción de moléculas de matriz.
- El L-PRP parece tener un potencial más pro-inflamatorio que el PPP y el PRP.
- La utilización terapéutica del PPP, PRP o L-PRP debería considerarse dependiendo de las necesidades de cada tendinopatía, atendiendo a las propiedades biológicas de cada una de las formulaciones.

Artículo IV

- Las BM-MSCs embebidas en un hidrogel de PRP presentan una alta expresión de proteínas de matriz y una proporción colágeno 1/colágeno 3 adecuado para la regeneración de tendón, además parecen ser menos inflamatorias que los otros dos fenotipos celulares por su perfil de secreción de citoquinas. Pero tienen una alta expresión de moléculas relacionadas con la matriz de cartílago.
- El pre-acondicionamiento del tejido receptor con PRP antes de aplicar la terapia celular aumenta la proliferación y la quimiotaxis de las células implantadas
- El pre-acondicionamiento del tendón con PRP favorecería la tenogénesis de células mesenquimales de médula ósea y de fibroblastos de piel así como la disminución de la secreción de proteínas inflamatorias por lo que ambos serían adecuados para una terapia celular para tendón.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech.* 2003 Oct;36(10):1529-53.
2. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Apr;84:222-39.
3. Nourissat G, Berenbaum F, Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Apr;11(4):223-33.
4. Nadiarnykh O, Plotnikov S, Mohler WA, Kalajzic I, Redford-Badwal D, Campagnola PJ. Second harmonic generation imaging microscopy studies of osteogenesis imperfecta. *J Biomed Opt.* 2007 Sep-Oct;12(5):051805.
5. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008 Feb;4(2):82-9.
6. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 1994 Jun;53(6):359-66.
7. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci.* 1990 Apr;95 (Pt 4):649-57.
8. Berenson MC, Blevins FT, Plaas AH, Vogel KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res.* 1996 Jul;14(4):518-25.
9. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman B. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 1994 Jun;53(6):367-76.
10. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1219-27.
11. Wang JH, Iosifidis MI, Fu FH. Biomechanical basis for tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 2006 Feb;443:320-32.
12. Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF. Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev.* 1978;6:125-81.
13. Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):235.
14. Xu Y, Murrell GAC. The Basic Science of Tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2008;466(7):1528-1538.
15. Jafari L, Vachon P, Beaudry F, Langelier E. Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol Rep.* 2015 Jan 19;3(1).
16. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011 Jun 18;377(9783):2115-26.

17. Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med*. 2003 Oct;22(4):675-92.
18. Scott A, Ashe MC. Common tendinopathies in the upper and lower extremities. *Curr Sports Med Rep*. 2006 Sep;5(5):233-41.
19. Fredberg U, Stengaard-Pedersen K. Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation. *Scand J Med Sci Sports*. 2008 Feb;18(1):3-15.
20. Maffulli N, Longo UG, Denaro V. Novel approaches for the management of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Nov;92(15):2604-13.
21. Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes. *Sports Med*. 1994 Sep;18(3):173-201.
22. Hume PA, Reid D, Edwards T. Epicondylar injury in sport: epidemiology, type, mechanisms, assessment, management and prevention. *Sports Med*. 2006;36(2):151-70.
23. Kaux JF, Forthomme B, Goff CL, Crielaard JM, Croisier JL. Current opinions on tendinopathy. *J Sports Sci Med*. 2011 Jun 1;10(2):238-53.
24. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Feb;43(2):131-42.
25. Maffulli N, Longo UG, Loppini M, Denaro V. Current treatment options for tendinopathy. *Expert Opin Pharmacother*. 2010 Sep;11(13):2177-86.
26. Knobloch K, Schreibermueller L, Kraemer R, Jagodzinski M, Vogt PM, Redeker J. Gender and eccentric training in Achilles mid-portion tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010 May;18(5):648-55.
27. Huisman E, Lu A, McCormack RG, Scott A. Enhanced collagen type I synthesis by human tenocytes subjected to periodic in vitro mechanical stimulation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 Nov 21;15:386.
28. Oliva F, Piccirilli E, Berardi AC, Frizziero A, Tarantino U, Maffulli N. Hormones and tendinopathies: the current evidence. *Br Med Bull*. 2016 Mar;117(1):39-58.
29. Bryant AL, et al. Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. *J Appl Physiol (1985)* 2008;105:1035-43.
30. Hansen M, Kongsgaard M, Holm L, Skovgaard D, Magnusson SP, Qvortrup K, Larsen JO, Aagaard P, Dahl M, Serup A, Frystyk J, Flyvbjerg A, Langberg H, Kjaer M. Effect of estrogen on tendon collagen synthesis, tendon structural characteristics, and biomechanical properties in postmenopausal women. *J Appl Physiol (1985)*. 2009 Apr;106(4):1385-93.
31. Cook JL, Bass SL, Black JE. Hormone therapy is associated with smaller Achilles tendon diameter in active post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 2007;17:128-32.
32. Magnusson SP, et al. The adaptability of tendon to loading differs in men and women. *Int J Exp Pathol* 2007;88:237-40.
33. Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 May;45(5):508-21.
34. Abate M, Schiavone C, Salini V, Andia I. Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Apr;52(4):599-608.

35. Twigg SM, Chen MM, Joly AH, Chakrapani SD, Tsubaki J, Kim HS, Oh Y, Rosenfeld RG. Advanced glycosylation end products up-regulate connective tissue growth factor (insulin-like growth factor-binding protein-related protein 2) in human fibroblasts: a potential mechanism for expansion of extracellular matrix in diabetes mellitus. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):1760-9.
36. Berardi AC, Oliva F, Berardocco M, la Rovere M, Accorsi P, Maffulli N. Thyroid hormones increase collagen I and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) expression in vitro human tenocytes. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014 Nov 17;4(3):285-91.
37. Hast MW, Abboud JA, Soslowsky LJ. Exploring the role of hypercholesterolemia in tendon health and repair. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014 Nov 17;4(3):275-9.
38. Chhana A, Callon KE, Dray M, Pool B, Naot D, Gamble GD, Coleman B, McCarthy G, McQueen FM, Cornish J, Dalbeth N. Interactions between tenocytes and monosodium urate monohydrate crystals: implications for tendon involvement in gout. *Ann Rheum Dis*. 2014 Sep;73(9):1737-41.
39. Dilsher Singh, Darshan Pandit, Martin Doherty. High dose inhaled Corticosteroids can cause Achilles Tendonitis. *Respiratory Medicine CME*. 2009 Feb; 2(1):15-17.
40. Taguchi T, Kubota M, Saito M, Hattori H, Kimura T, Marumo K. Quantitative and Qualitative Change of Collagen of Achilles Tendons in Rats With Systemic Administration of Glucocorticoids. *Foot Ankle Int*. 2016 Mar;37(3):327-33.
41. Stephenson AL, Wu W, Cortes D, Rochon PA. Tendon Injury and Fluoroquinolone Use: A Systematic Review. *Drug Saf*. 2013 Sep;36(9):709-21.
42. Fu SC, Rolf C, Cheuk YC, Lui PP, Chan KM. Deciphering the pathogenesis of tendinopathy: a three-stages process. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*. 2010 Dec 13;2:30.
43. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006 May;24(5):227-34.
44. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Oct;10(10):1415-26.
45. Schwartz YSh, Svistelnik AV. Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype. *Biochemistry (Mosc)*. 2012 Mar;77(3):246-60.
46. Dymont NA, Galloway JL. Regenerative biology of tendon: mechanisms for renewal and repair. *Curr Mol Biol Rep*. 2015 Sep;1(3):124-131.
47. Tempfer H, Traweger A. Tendon Vasculature in Health and Disease. *Front Physiol*. 2015 Nov 18;6:330.
48. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2007 Jun 14;13(22):3056-62.
49. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006 Apr-Jun;6(2):181-90.
50. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech*. 2004 Jun;37(6):865-77.

51. Dakin SG, Martinez FO, Yapp C, Wells G, Oppermann U, Dean BJ, Smith RD, Wheway K, Watkins B, Roche L, Carr AJ. Inflammation activation and resolution in human tendon disease. *Sci Transl Med.* 2015 Oct 28;7(311):311ra173.
52. Andia I, Maffulli N. Meeting current musculoskeletal health demand through deeper insights into tissue homeostasis and regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Jun;15(6):767-71.
53. Millar NL, Hueber AJ, Reilly JH, Xu Y, Fazzi UG, Murrell GA, McInnes IB. Inflammation is present in early human tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2010 Oct;38(10):2085-91.
54. Zhou Z, Akinbiyi T, Xu L, Ramcharan M, Leong DJ, Ros SJ, Colvin AC, Schaffler MB, Majeska RJ, Flatow EL, Sun HB. Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging Cell.* 2010 Oct;9(5):911-5.
55. Rees JD, Stride M, Scott A. Tendons--time to revisit inflammation. *Br J Sports Med.* 2014 Nov;48(21):1553-7.
56. Alfredson H, Ohberg L. Sclerosing injections to areas of neo-vascularisation reduce pain in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005 May;13(4):338-44.
57. Fournier PE, Rappoport G. Tendinopathy: physiopathology and conservative treatment. *Rev Med Suisse.* 2005 Jul 27;1(28):1840-2, 1845-6.
58. Paavola M, Kannus P, Järvinen TA, Järvinen TL, Józsa L, Järvinen M. Treatment of tendon disorders. Is there a role for corticosteroid injection? *Foot Ankle Clin.* 2002 Sep;7(3):501-13.
59. Andres BM, Murrell GA. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Jul;466(7):1539-54.
60. Khan KM, Scott A. Mechanotherapy: how physical therapists' prescription of exercise promotes tissue repair. *Br J Sports Med.* 2009 Apr;43(4):247-52.
61. Mafi N, Lorentzon R, Alfredson H. Superior short-term results with eccentric calf muscle training compared to concentric training in a randomized prospective multicenter study on patients with chronic Achilles tendinosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2001;9(1):42-7.
62. Roos EM, Engström M, Lagerquist A, Söderberg B. Clinical improvement after 6 weeks of eccentric exercise in patients with mid-portion Achilles tendinopathy -a randomized trial with 1-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports.* 2004 Oct;14(5):286-95.
63. Rompe JD, Furia J, Maffulli N. Eccentric loading versus eccentric loading plus shock-wave treatment for midportion achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* 2009 Mar;37(3):463-70.
64. Furia JP. High-energy extracorporeal shock wave therapy as a treatment for insertional Achilles tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2006 May;34(5):733-40.
65. Chao YH, Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Chiang YF, Wang CC, Chen MH. Effects of shock waves on tenocyte proliferation and extracellular matrix metabolism. *Ultrasound Med Biol.* 2008 May;34(5):841-52.
66. Murrell GA. Using nitric oxide to treat tendinopathy. *Br J Sports Med.* 2007Apr;41(4):227-31.

67. Alfredson H. Conservative management of Achilles tendinopathy: new ideas. *Foot Ankle Clin.* 2005 Jun;10(2):321-9.
68. Abat F, Gelber PE, Polidori F, Monllau JC, Sanchez-Ibañez JM. Clinical results after ultrasound-guided intratissue percutaneous electrolysis (EPI®) and eccentric exercise in the treatment of patellar tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Apr;23(4):1046-52.
69. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
70. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
71. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35.
72. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* 2003 Oct;35(10):1648-52.
73. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007 Feb;35(2):245-51.
74. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Sep-Oct;26(5):910-3.
75. Sánchez M, Guadilla J, Fiz N, Andia I. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of osteoarthritis of the hip. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Jan;51(1):144-50.
76. Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):472-9.
77. Leo MS, Kumar AS, Kirit R, Konathan R, Sivamani RK. Systematic review of the use of platelet-rich plasma in aesthetic dermatology. *J Cosmet Dermatol.* 2015 Dec;14(4):315-23. 26205133.
78. Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. *Int J Neurosci.* 2011 Apr;121(4):176-80.
79. Andia I, Rubio-Azpeitia E, Martin JI, Abate M. Current Concepts and Translational Uses of Platelet Rich Plasma Biotechnology. *Biotechnology.* 2015. Book Chapter. Associate Prof. Deniz Ekinci (Ed). InTech. DOI: 10.5772/59954.
80. Sánchez M, Andia I, Anitua E, Sánchez P. Platelet Rich Plasma (PRP) Biotechnology: Concepts and Therapeutic Applications in Orthopedics and Sports Medicine. *Innovations in Biotechnology.* 2012. Book chapter. Dr. Eddy C. Agbo (Ed.). InTech. DOI: 10.5772/28908.

81. Hunt P. The physiologic role and therapeutic potential of the Mpl-ligand in thrombopoiesis. *Stem Cells*. 1995 Nov;13(6):579-87. Review. PubMed PMID: 8590859.
82. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*. 2015 Dec;13(12):2141-51.
83. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost*. 2007 Sep;5(9):1945-55.
84. Maurer-Spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine DV. Room temperature activates human blood platelets. *Lab Invest*. 2001 Apr;81(4):581-92.
85. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2009 Aug;102(2):248-57.
86. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3378-84.
87. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014 May 8;4(1):3-9.
88. Fukaya Y, Kuroda M, Aoyagi Y, Asada S, Kubota Y, Okamoto Y, Nakayama T, Saito Y, Satoh K, Bujo H. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Exp Mol Med*. 2012 May 31;44(5):330-9.
89. Zargar Baboldashti N, Poulsen RC, Franklin SL, Thompson MS, Hulley PA.
90. Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol*. 2012 Jan 13;3:1.
91. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*. 2009 Jan;28(1):113-25.
92. Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8260-70.
93. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*. 2007 Feb 2;282(5):2871-9.
94. Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen Med*. 2013 Sep;8(5):645-58.
95. Richardson TP1, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001 Nov;19(11):1029-34.
96. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med*. 2008 Jun;36(6):1171-8.

97. Anitua E, Sánchez M, Zalduendo MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, Andía I. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009 Apr;42(2):162-70.
98. Zhai W, Wang N, Qi Z, Gao Q, Yi L. Platelet-rich plasma reverses the inhibition of tenocytes and osteoblasts in tendon-bone healing. *Orthopedics.* 2012 Apr;35(4):e520-5.
99. Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Shin S. Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med.* 2012 May;40(5):1035-45.
100. Carofino B, Chowaniec DM, McCarthy MB, Bradley JP, Delaronde S, Beitzel K, Cote MP, Arciero RA, Mazzocca AD. Corticosteroids and local anesthetics decrease positive effects of platelet-rich plasma: an in vitro study on human tendon cells. *Arthroscopy.* 2012 May;28(5):711-9.
101. Baksh N, Hannon CP, Murawski CD, Smyth NA, Kennedy JG. Platelet-rich plasma in tendon models: a systematic review of basic science literature. *Arthroscopy.* 2013 Mar;29(3):596-607.
102. Lyras D, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Simopoulos C, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Patsouris E. Immunohistochemical study of angiogenesis after local administration of platelet-rich plasma in a patellar tendon defect. *Int Orthop.* 2010 Feb;34(1):143-8.
103. Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, Chronopoulos E, Tryfonidis M. Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010 Jun;96(4):381-7.
104. Lyras DN, Kazakos K, Georgiadis G, Mazis G, Middleton R, Richards S, O'Connor D, Agrogiannis G. Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing? *J Foot Ankle Surg.* 2011 May-Jun;50(3):276-82.
105. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports.* 2011 Aug;21(4):554-61.
106. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Tryfonidis M, Botaitis S, Agrogiannis G, Simopoulos C, Kokka A, Patsouris E. The influence of platelet-rich plasma on angiogenesis during the early phase of tendon healing. *Foot Ankle Int.* 2009 Nov;30(11):1101-6.
107. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A.* 2006 May;77(2):285-93.
108. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Kubo T. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol.* 2008 Jun;215(3):837-45.
109. Bosch G, René van Weeren P, Barneveld A, van Schie HT. Computerised analysis of standardised ultrasonographic images to monitor the repair of surgically created core lesions in equine superficial digital flexor tendons following treatment with intratendinous platelet rich plasma or placebo. *Vet J.* 2011 Jan;187(1):92-8.

110. Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *J Orthop Res.* 2010 Feb;28(2):211-7.
111. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakarlis A. The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009 Nov;129(11):1577-82.
112. Spang JT, Tischer T, Salzmann GM, Winkler T, Burgkart R, Wexel G, Imhoff AB. Platelet concentrate vs. saline in a rat patellar tendon healing model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011 Mar;19(3):495-502.
113. Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop.* 2006 Oct;77(5):806-12.
114. Lyras DN, Kazakos K, Tryfonidis M, Agrogiannis G, Botaitis S, Kokka A, Drosos G, Tilkeridis K, Verettas D. Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma. *Foot Ankle Surg.* 2010 Sep;16(3):137-41.
115. Andia I, Maffulli N. Clinical Outcomes of Biologic Treatment for Chronic Tendinopathy. *Operative techniques in orthopaedics.* Mar 2016. DOI: 10.1053/j.oto.2015.12.007.
116. Connell D, Datir A, Alyas F, Curtis M. Treatment of lateral epicondylitis using skin-derived tenocyte-like cells. *Br J Sports Med.* 2009 Apr;43(4):293-8.
117. Wang A, Mackie K, Bredahl W, Wang T, Zheng MH. Evidence for the Durability of Autologous Tenocyte Injection for Treatment of Chronic Resistant Lateral Epicondylitis: Mean 695 4.5-Year Clinical Follow-up. *Am J Sports Med.* 2015;43(7):1775-83.
118. Clarke AW, Alyas F, Morris T, Robertson CJ, Bell J, Connell DA. Skin derived tenocyte-like cells for the treatment of patellar tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2011;39(3):614-23.
119. Obaid H, Clarke A, Rosenfeld P, Leach C, Connell D. Skin-derived fibroblasts for the treatment of refractory Achilles tendinosis: preliminary short-term results. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Feb 1;94(3):193-200. Retraction in: *J Bone Joint Surg Am.* 2015 Apr 15;97(8):667.
120. Pascual-Garrido C, Rolón A, Makino A. Treatment of chronic patellar tendinopathy with autologous bone marrow stem cells: a 5-year-followup. *Stem Cells Int.* 2012;2012:953510.
121. Moon YL, Jo SH, Song CH, Park G, Lee HJ, Jang SJ. Autologous bone marrow plasma injection after arthroscopic debridement for elbow tendinosis. *Ann Acad Med Singapore.* 2008;37(7):559-63.
122. Centeno CJ, Al-Sayegh H, Bashir J, Goodyear S, Freeman MD. A prospective multi-site registry study of a specific protocol of autologous bone marrow concentrate for the treatment of shoulder rotator cuff tears and osteoarthritis. *J Pain Res.* 2015 Jun 5;8:269-76.

123. Ellera Gomes JL, da Silva RC, Silla LM, Abreu MR, Pellanda R. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Feb;20(2):373-7.
124. Tate-Oliver K, Alexander RW. 719 Combination of autologous adipose-derived tissue stromal vascular fraction plus high-density platelet rich plasma or bone marrow concentrates in Achilles tendon tears. *J Prolotherapy* 2013;5:e895-e912.
125. Nixon AJ, Watts AE, Schnabel LV. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012 Feb;21(2):278-94.
126. Mobasher A, Shakibaei M. Is tendinitis an inflammatory disease initiated and driven by pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 β ? *Histol Histopathol.* 2013 Aug;28(8):955-64
127. Kragstnaes MS, Fredberg U, Stribolt K, Kjaer SG, Bendix K, Ellingsen T. Stereological quantification of immune-competent cells in baseline biopsy specimens from achilles tendons: results from patients with chronic tendinopathy followed for more than 4 years. *Am J Sports Med.* 2014 Oct;42(10):2435-45.
128. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for muscle injury and tendinopathy. *Sports Med Arthrosc.* 2013 Dec;21(4):191-8.
129. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158-67.
130. Legerlotz K, Jones ER, Screen HR, Riley GP. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Jul;51(7):1161-5.
131. John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G. Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *J Orthop Res.* 2010 Aug;28(8):1071-7.
132. Kjaer M, Bayer ML, Eliasson P, Heinemeier KM. What is the impact of inflammation on the critical interplay between mechanical signaling and biochemical changes in tendon matrix? *J Appl Physiol (1985).* 2013 Sep;115(6):879-83.
133. Ackermann PW, Domeij-Arverud E, Leclerc P, Amoudrouz P, Nader GA. Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013 Aug;21(8):1801-6.
134. Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. Hyperuricemic PRP in tendon cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:926481.
135. Stålmán A, Bring D, Ackermann PW. Chemokine expression of CCL2, CCL3, CCL5 and CXCL10 during early inflammatory tendon healing precedes nerve regeneration: an immunohistochemical study in the rat. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Sep;23(9):2682-9.
136. Alvarez P, Green PG, Levine JD. Role for monocyte chemoattractant protein-1 in the induction of chronic muscle pain in the rat. *Pain.* 2014 Jun;155(6):1161-7.
137. Pflücke D, Hackel D, Mousa SA, Partheil A, Neumann A, Brack A, Rittner HL. The molecular link between C-C-chemokine ligand 2-induced leukocyte recruitment and hyperalgesia. *J Pain.* 2013 Sep;14(9):897-910.

138. Miller RE, Tran PB, Das R, Ghoreishi-Haack N, Ren D, Miller RJ, Malfait AM. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 11;109(50):20602-7.
139. LaCroix-Fralish ML, Austin JS, Zheng FY, Levitin DJ, Mogil JS. Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain. *Pain*. 2011 Aug;152(8):1888-98.
140. Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010 Nov;16(11):1267-76.
141. Oka Y, Ibuki T, Matsumura K, Namba M, Yamazaki Y, Poole S, Tanaka Y, Kobayashi S. Interleukin-6 is a candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS. *Neuroscience*. 2007 Mar 16;145(2):530-8.
142. Machelska H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*. 2007 Dec;41(6):355-63.
143. Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, Stein C, Brack A. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J*. 2006 Dec;20(14):2627-9.
144. Zhang ZJ, Cao DL, Zhang X, Ji RR, Gao YJ. Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. *Pain*. 2013 Oct;154(10):2185-97.
145. Wagenhäuser MU, Pietschmann MF, Sievers B, Docheva D, Schieker M, Jansson V, Müller PE. Collagen type I and decorin expression in tenocytes depend on the cell isolation method. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012 Aug 8;13:140.
146. Rubio-Azpeitia E, Sánchez P, Delgado D, Andia I. Three-Dimensional Platelet-Rich Plasma Hydrogel Model to Study Early Tendon Healing. *Cells Tissues Organs*. 2015;200(6):394-404.
147. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005 Mar;23(2):281-6.
148. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, Andia I. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Mar;119(3):950-9.
149. Andia I, Latorre PM, Gomez MC, Burgos-Alonso N, Abate M, Maffulli N. Platelet-rich plasma in the conservative treatment of painful tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of controlled studies. *Br Med Bull*. 2014 Jun;110(1):99-115.
150. Schneider PR, Buhrmann C, Mobasher A, Matis U, Shakibaei M. 2011. Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 29:1351-60.
151. Mazzocca AD, Chowanec D, McCarthy MB, Beitzel K, Cote MP, McKinnon W, Arciero R. In vitro changes in human tenocyte cultures obtained from proximal biceps tendon: multiple passages result in changes in routine cell markers. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Sep;20(9):1666-72.

152. Qiu Y, Wang X, Zhang Y, Carr AJ, Zhu L, Xia Z, Sabokbar A. In vitro two-dimensional and three-dimensional tenocyte culture for tendon tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 Mar;10(3):E216-26.
153. Pawelec KM, Wardale RJ, Best SM, Cameron RE. The effects of scaffold architecture and fibrin gel addition on tendon cell phenotype. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Jan;26(1):5349.
154. Zhu J, Li J, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, Liu W. The regulation of phenotype of cultured tenocytes by microgrooved surface structure. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(27):6952-6958.
155. Bayer ML, Schjerling P, Herchenhan A, Zeltz C, Heinemeier KM, Christensen L, Krogsgaard M, Gullberg D, Kjaer M. Release of tensile strain on engineered human tendon tissue disturbs cell adhesions, changes matrix architecture, and induces an inflammatory phenotype. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e86078.
156. Glass ZA, Schiele NR, Kuo CK. Informing tendon tissue engineering with embryonic development. *J Biomech*. 2014 Jun 27;47(9):1964-8.
157. Andia I, Rubio E, Maffulli N. Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1624-1634.
158. Ahmad Z, Brooks R, Kang SN, Weaver H, Nunney I, Tytherleigh-Strong G, Rushton N. The effect of platelet-rich plasma on clinical outcomes in lateral epicondylitis. *Arthroscopy*. 2013 Nov;29(11):1851-62.
159. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011;39(2):266-271.
160. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med*. 2012;40(6):1274-1281.
161. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2011;39(10):2135-2140.
162. Liu H, Li M, Du L, Yang P, Ge S. Local administration of stromal cell-derived factor-1 promotes stem cell recruitment and bone regeneration in a rat periodontal bone defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;53:83-94.
163. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, Wang JH. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells—implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:173.
164. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA. Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med*. 2014;42(1):42-49.
165. Shindle MK, Chen CC, Robertson C, DiTullio AE, Paulus MC, Clinton CM, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF. Full-thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears. *J Shoulder Elbow Surg*. 2011;20(6):917-927.

166. Robertson CM, Chen CT, Shindle MK, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF. Failed healing of rotator cuff repair correlates with altered collagenase and gelatinase in supraspinatus and subscapularis tendons. *Am J Sports Med.* 2012;40(9):1993-2001.
167. Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, Adams SM, Thomas SJ, Kumar A, Beason DP, Iozzo RV, Birk DE, Soslowky LJ. The injury response of aged tendons in the absence of biglycan and decorin. *Matrix Biol.* 2014 Apr;35:232-8.
168. Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:31-47.
169. Wang VM, Bell RM, Thakore R, Eyre DR, Galante JO, Li J, Sandy JD, Plaas A. Murine tendon function is adversely affected by aggrecan accumulation due to the knockout of ADAMTS5. *J Orthop Res.* 2012;30(4):620-626.
170. Gordon JA, Freedman BR, Zuskov A, Iozzo RV, Birk DE, Soslowky LJ. Achilles tendons from decorin- and biglycan-null mouse models have inferior mechanical and structural properties predicted by an image based empirical damage model. *J Biomech.* 2015;48(10):2110-2115.
171. Dunkman AA, Buckley MR, Mienaltowski MJ, Adams SM, Thomas SJ, Satchell L, Kumar A, Pathmanathan L, Beason DP, Iozzo RV, Birk DE, Soslowky LJ. The tendon injury response is influenced by decorin and biglycan. *Ann Biomed Eng.* 2014 Mar;42(3):619-30.
172. Robinson PS, Huang TF, Kazam E, Iozzo RV, Birk DE, Soslowky LJ. Influence of decorin and biglycan on mechanical properties of multiple tendons in knockout mice. *J Biomech Eng.* 2005;127(1):181-185.
173. Lee CH, Lee FY, Tarafder S, Kao K, Jun Y, Yang G, Mao JJ. Harnessing endogenous stem/progenitor cells for tendon regeneration. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2690-2701.
174. Liu J, Tao X, Chen L, Han W, Zhou Y, Tang K. CTGF positively regulates BMP12 induced tenogenic differentiation of tendon stem cells and signaling. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(5):1831-1845.
175. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16(5):448-457.
176. Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, Almazan A, Ibarra C. Effect of angiogenesis related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2011;4:43-53.
177. Carr AJ, Murphy R, Dakin SG, Rombach I, Whewy K, Watkins B, Franklin SL. Platelet-Rich Plasma Injection With Arthroscopic Acromioplasty for Chronic Rotator Cuff Tendinopathy: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2015 Dec;43(12):2891-7.
178. Kaux JF, Croisier JL, Forthomme B, Le Goff C, Buhler F, Savanier B, Delcour S, Gothot A, Crielaard JM. Using platelet-rich plasma to treat jumper's knees: exploring the effect of a second closely timed infiltration. *J Sci Med Sport.* 2016;19(3):200-204.

179. Mautner K, Colberg RE, Malanga G, Borg-Stein JP, Harmon KG, Dharamsi AS, Chu S, Homer P. Outcomes after ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for chronic tendinopathy: a multicenter, retrospective review. *PM R*. 2013;5(3):169-175.
180. Cross JA, Cole BJ, Spatny KP, Sundman E, Romeo AA, Nicholson GP, Wagner B, Fortier LA. Leukocyte-reduced platelet-rich plasma normalizes matrix metabolism in torn human rotator cuff tendons. *Am J Sports Med*. 2015;43(12):2898-2906.
181. Pifer MA, Maerz T, Baker KC, Anderson K. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligament fibroblasts. *Am J Sports Med*. 2014;42(5):1211-1218.
182. Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, Verrier S, Herrmann M. An In Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering. 2016. *Tissue Eng Part C Methods* ;22(1):49-58.
183. Yukata K, Matsui Y, Shukunami C, Takimoto A, Hirohashi N, Ohtani O, Kimura T, Hiraki Y, Yasui N. 2010. Differential expression of Tenomodulin and Chondromodulin-1 at the insertion site of the tendon reflects a phenotypic transition of the resident cells. *Tissue Cell* 42:116-20.
184. Nourissat G, Diop A, Maurel N, Salvat C, Dumont S, Pigenet A, Gosset M, Houard X, Berenbaum F. 2010. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PLoS One* 18;5(8):e12248.
185. Liu H, Zhang C, Zhu S, Lu P, Zhu T, Gong X, Zhang Z, Hu J, Yin Z, Heng BC, Chen X, Ouyang HW. 2015. Mohawk promotes the tenogenesis of mesenchymal stem cells through activation of the TGF β signaling pathway. *Stem Cells* 33:443-55.
186. Kraus A, Woon C, Raghavan S, Megerle K, Pham H, Chang J. 2013. Co-culture of human adipose-derived stem cells with tenocytes increases proliferation and induces differentiation into a tenogenic lineage. *Plast Reconstr Surg* 132:754e-766e.
187. Lovati AB, Corradetti B, Cremonesi F, Bizzaro D, Consiglio AL. 2012. Tenogenic differentiation of equine mesenchymal progenitor cells under indirect co-culture. *Int J Artif Organs* 35:996-1005.
188. Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R. 2009. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. *Development* 136:1351-61.
189. Liu H, Zhu S, Zhang C, Lu P, Hu J, Yin Z, Ma Y, Chen X, OuYang H. 2014. Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: their potential for tendon regeneration. *Cell Tissue Res* 356:287-98.
190. Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. 2002. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res* 20(6):1352-7.
191. Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. 2013. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One* 25;8(9):e75697.
192. Forbes SJ, Rosenthal N. 2014. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med* 20:857-69.

193. Millar NL, Gilchrist DS, Akbar M, Reilly JH, Kerr SC, Campbell AL, Murrell GA, Liew FY, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB. 2015. MicroRNA29a regulates IL-33-mediated tissue remodelling in tendon disease. *Nat Commun* 10;6:6774.
194. Henrich D, Nau C, Kraft SB, Zollfrank M, Konradowitz K, Oppermann E, Schultheiss J, Meier S, Frank J, Marzi I, Seebach C. Effect of the harvest procedure and tissue site on the osteogenic function of and gene expression in human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. 2016 Apr;37(4):976-88.
195. Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014 May 8;4(1):52-62.
196. Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. Platelet-Rich Plasma Activates Proinflammatory Signaling Pathways and 502 Induces Oxidative Stress in Tendon Fibroblasts. *Am J Sports Med*. 2016 Jul 503 8. pii: 0363546516637176.

9. ANEXOS

- Artículo I
- Artículo II
- Artículo III
- Artículo IV
- Autorización Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Cruces para el proyecto "Estudio clínico, piloto, aleatorizado para valorar la seguridad y eficacia potencial de la TENOTOMÍA CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) en la epicondilitis crónica" (código CEIC 13/04)
- Autorización Comité de Ética de Investigación Clínica de Euskadi (CEIC-E) para el proyecto "Diseño de un tratamiento personalizado para lesiones crónicas de tendones: investigación pre-clínica in vitro" (código PI2014108)
- Autorización Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Cruces para el proyecto "Influencia de la Inflamación en la Terapia de Plasma Rico en Plaquetas: investigación preclínica en tendón" (Dr. Guerrero/S" Traumatología) (código CEIC E14/40)
- Proyectos y Entidades Financiadoras