



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Veterinaria

Departamento de Medicina y Cirugía Animal

**EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN TENDINOSA
TRAS LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN
FACTORES DE CRECIMIENTO EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ROTURA DE TENDÓN DE
AQUILES EN OVEJA**

Trabajo presentado por
el Licenciado en Veterinaria

D. José Andrés Fernández Sarmiento
para optar al Grado de Doctor

TÍTULO: *Evaluación de la reparación tendinosa tras la aplicación de plasma rico*

en factores de crecimiento en un modelo experimental de rotura de tendón de Aquiles

AUTOR: *José Andrés Fernández Sarmiento*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

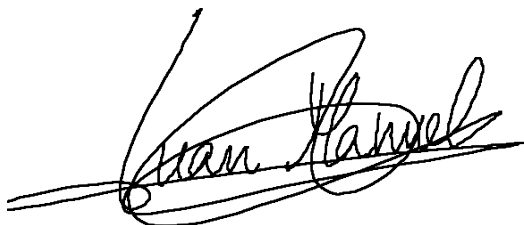
www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

D. JUAN MANUEL DOMÍNGUEZ PÉREZ y DÑA. MARÍA DEL MAR GRANADOS MACHUCA, Profesores del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba,

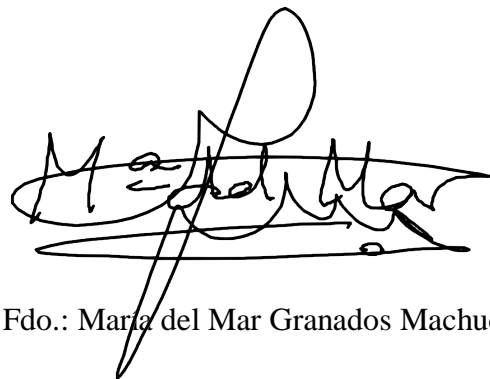
INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN TENDINOSA TRAS LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ROTURA DE TENDÓN DE AQUILES EN OVEJA”**, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. José Andrés Fernández Sarmiento, ha sido realizada bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, y reúne las condiciones necesarias para ser presentada ante el Tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Córdoba, a tres de Mayo de 2012.



Fdo.: Juan Manuel Domínguez Pérez



Fdo.: María del Mar Granados Machuca



TÍTULO DE LA TESIS: EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN TENDINOSA TRAS LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ROTURA DE TENDÓN DE AQUILES EN OVEJA

DOCTORANDO: JOSÉ ANDRÉS FERNÁNDEZ SARMIENTO

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral, llevada a cabo bajo nuestra dirección, el doctorado ha mostrado una plena dedicación e interés en las tareas de investigación que se le han asignado. El doctorando ha sido capaz de realizar una labor de investigación con rigor científico. Este trabajo de investigación ha sido plasmado en la presente Tesis Doctoral, que reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada y defendida ante un Tribunal. Durante el periodo de desarrollo de la Tesis Doctoral, la actitud del doctorando nos ha resultado gratamente positiva y hemos percibido una destacada progresión en cuanto a su capacidad investigadora.

Esta Tesis Doctoral ha seguido un plan de trabajo estructurado y distribuido a lo largo de cuatro años:

- Primer año: Estudio y recopilación de todo el material bibliográfico que resulte de interés y esté relacionado con la tesis. Comienzo de la escritura de la “Revisión Bibliográfica”.

- Segundo año: Diseño y puesta a punto de modelo experimental *in vivo* de rotura del tendón de Aquiles en la oveja. Continuación el estudio del material bibliográfico y redacción de la “Revisión Bibliográfica” de la Tesis Doctoral.
- Tercer año: Realización de la fase experimental y toma de datos. Redacción de la parte de “Material y Método” de la Tesis Doctoral. Análisis estadístico de los datos obtenidos y redacción de los “Resultados”.
- Cuarto año: Discusión de los resultados. Redacción de la “Discusión” de la Tesis Doctoral. Divulgación científica de las conclusiones extraídas de este trabajo.

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha generado hasta el momento la siguiente producción científica:

- a) Tres comunicaciones científicas en Congresos Internacionales:

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM., Granados MM., Martín de las Mulas M, Millán Y, García-Balletbó M. Histological Study of the Influence of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) in a Model of Tenotomized Achilles Tendon in Sheep. 15th Congress ESSKA (European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy). 2 – 5 Mayo 2012. Ginebra (Suiza).

Domínguez JM., **Fernández-Sarmiento JA.**, Granados MM., Morgaz J., Navarrete R., Carrillo JM, Rubio M., García-Balletbó M, Cugat R., Monterde J, Blanco A. Ultrastructural study of the healing process in tenotomized Achilles tendons treated with Plasma Rich in Growth Factors in sheep. 2012 World Congress on Osteoarthritis – OARSI (Osteoarthritis Research Society International). 26 – 29 Abril 2012. Barcelona (España).

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM., Granados MM., Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gómez Villamandos RJ, Muñoz-Rascón P, Martín de las Mulas M, Millán Y, García-Balletbó M, Cugat R. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) improves tendon healing in an experimental model of tenotomized Achilles tendon in sheep. 21th ECVS Annual Scientific Meeting (European College of Veterinary Surgeons). 5 – 7 Julio 2012. Barcelona (España).

b) Una comunicación científica en Congreso Nacional:

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gómez-Villamandos RJ, Muñoz P, Rubio M, Martín de las Mulas J, Millán Y, García-Ballebó M, Cugat R. Estudio Histológico de la Influencia del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) en un Modelo Experimental de Tenotomía del Tendón de Aquiles en Oveja. Curso de Formación Permanente: “La Investigación en Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos”. 7 – 11 Noviembre 2011. Córdoba (España).

c) Tres ponencias por invitación de los organizadores en Congresos Nacionales de Difusión Científica:

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM. Aplicación y experiencia de los factores de crecimiento en roturas del tendón. I Congreso Médico Nacional sobre Factores de Crecimiento. Organizadores: INVASA – Instituto Valenciano de la Salud y Fundación García-Cugat. 8 – 9 Abril 2011. Valencia (España).

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM. Aplicación y experiencia de los factores de crecimiento en roturas del tendón. Momento Actual de los Factores de Crecimiento en Humana y en Veterinaria. Organizadores: Fundación García-Cugat, IVOT (Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología), Facultad de Veterinaria CEU Valencia, y Colegio de Veterinarios de Barcelona. 22 Octubre 2011. Barcelona (España).

Fernández-Sarmiento JA., Domínguez JM. Aplicación de los factores de crecimiento en roturas de tendón: nuevos avances en la investigación. II Congreso Médico Nacional sobre Factores de Crecimiento Plasmático. Organizadores: INVASA – Instituto Valenciano de la Salud y Fundación García-Cugat. 14 Abril 2011. Valencia (España).

d) Una aportación científica en revista indexada:

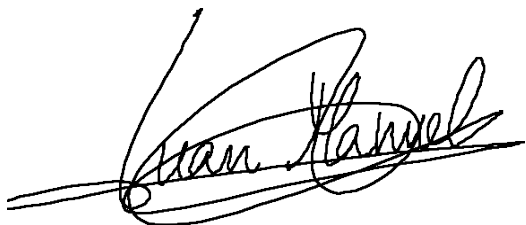
Domínguez JM., **Fernández-Sarmiento JA.**, Granados MM., Morgaz J., Navarrete R., Carrillo JM, Rubio M., García-Ballebó M, Cugat R., Monterde J, Blanco A. Ultrastructural study of the healing process in tenotomized achilles tendons treated with plasma rich in growth factors in sheep. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol 20, Supplement 1, April 2012, S250-S251. ISSN: 1063-4584. Impact Factor: 3.953.

Además de trabajar en el desarrollo de su trabajo de Tesis Doctoral, el doctorando ha participado de una forma muy activa y entusiasta con todos los proyectos de investigación que llevamos a cabo en nuestra unidad, figurando dentro de los autores de diversas comunicaciones y artículos científicos, e integrándose con facilidad dentro de nuestro grupo de trabajo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a 3 de Mayo de 2012.

Firma de los directores

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Manuel Domínguez Pérez'. The signature is stylized with a large, sweeping initial 'J' and 'M'.

Fdo.: Juan Manuel Domínguez Pérez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María del Mar Granados Machuca'. The signature is highly stylized with a large, looped initial 'M' and 'M'.

Fdo.: María del Mar Granados Machuca

Nunca dejes un camino,
por tomar una vereda.

Refranero Español

Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.

Gregorio Marañón (1887-1960)
Médico y escritor español

... que no te compren por menos de nada,
que no te vendan amor sin espinas,
que no te duerman con cuentos de hadas,
que no te cierren el bar de la esquina...

Joaquín Sabina
“Noches de boda” (1999)

A mis Padres,
A mi Hermano,
A mis Abuelos,
A ti, Eli.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	7
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. Anatomía, estructura, histología y biomecánica del tendón de Aquiles	13
1.1. Anatomía del tendón de Aquiles.....	16
1.1.1. Vascularización.....	17
1.1.2. Inervación	18
1.2. Estructura y composición del tendón de Aquiles	18
1.3. Histología del tendón de Aquiles.....	21
1.4. Biomecánica del tendón de Aquiles.....	23
2. Rotura del tendón de Aquiles	25
2.1. Epidemiología	27
2.2. Etiología.....	27
2.3. Patogenia.....	28
2.4. Diagnóstico	29
2.5. Tratamiento	30
2.6. Nuevas terapias en la rotura del tendón de Aquiles.....	33
3. Cicatrización del tendón	37
3.1. Fases de la cicatrización tendinosa	40
3.1.1. Fase inflamatoria.....	40
3.1.2. Fase proliferativa.....	41
3.1.3. Fase de remodelación	42
3.2. Cicatrización tendinosa intrínseca y extrínseca.....	43
3.3. Control de la cicatrización tendinosa.....	45
3.4. Efecto de la movilización precoz en el proceso de cicatrización del tendón.....	46
4. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)	49
4.1. Plasma rico en plaquetas (PRP) Vs. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)	51
4.2. Papel de las plaquetas en el proceso de cicatrización....	52
4.2.1. Origen y fisiología de las plaquetas	52
4.2.1.1. Membrana plasmática	53
4.2.1.2. Citoplasma plaquetario.....	53
4.2.1.3. Gránulos plaquetarios.....	54

	a. Gránulos alfa	54
	b. Gránulos densos.....	56
	c. Gránulos lisosomales	57
4.2.2.	Respuesta plaquetaria ante un daño tisular	57
4.2.2.1.	Proceso de activación plaquetaria.....	58
4.2.2.2.	Generación de la trombina	59
4.2.2.3.	Metabolitos activos derivados de la activación plaquetaria	59
4.3.	Factores de crecimiento.....	60
4.3.1.	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	61
	a. Funciones biológicas de PDGF	62
	b. Importancia del PDGF en la cicatrización tendinosa	63
	c. Importancia del PDGF en la cicatrización de otros tejidos.....	64
4.3.2.	Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β).....	65
	a. Funciones biológicas del TGF- β	66
	b. Importancia del TGF- β en la cicatrización tendinosa	67
	c. Importancia del TGF- β en la cicatrización de otros tejidos.....	68
4.3.3.	Factor de crecimiento insulínico (IGF)	69
	a. Funciones biológicas del IGF.....	70
	b. Importancia del IGF en la cicatrización tendinosa	71
	c. Importancia del IGF en la cicatrización de otros tejidos.....	72
4.3.4.	Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	73
	a. Funciones biológicas de FGF.....	74
	b. Importancia del FGF en la cicatrización tendinosa	74
	c. Importancia del FGF en la cicatrización de otros tejidos.....	75
4.3.5.	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	76
	a. Funciones biológicas de EGF.....	76
	b. Importancia del EGF en la cicatrización tendinosa	77
	c. Importancia del EGF en la cicatrización de otros tejidos.....	77
4.3.6.	Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	78
	a. Funciones biológicas de VEGF	78
	b. Importancia del VEGF en la cicatrización tendinosa	79

c.	Importancia del VEGF en la cicatrización de otros tejidos.....	80
4.3.7.	Factor de crecimiento neutrófico (NGF)	80
4.3.8.	Factor de crecimiento hepatocítico (HGF)	81
4.4.	Metodología para la obtención de PRP	82
4.4.1.	Obtención de PRP mediante sistemas de aféresis	83
4.4.2.	Obtención del PRP mediante sistema de centrifugación en tubo: PRGF System® (BTI Biotechnology Institute) .	84
4.4.3.	Obtención de PRP mediante sistemas de doble centrifugación en tubo	88
4.4.3.1.	Método de Landesberg	88
4.4.3.2.	Curasan PRP® Kit	89
4.4.3.3.	Friadent-Schiitze PRP® Kit	91
4.4.4.	Obtención de PRP mediante sistemas semiautomáticos comerciales	93
4.4.4.1.	Platelet Concentrate Collection System (PCCS® Kit).....	93
4.4.4.2.	Gravitational Platelet Separation (GPS® System).....	95
4.4.4.3.	Smart PReP® System	97
4.4.4.4.	Plateltex®	99
4.4.4.5.	Seequire PRP® System.....	100
4.4.4.6.	Arthrex ACP® System.....	101
5.	Empleo de PRP en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas.....	105
5.1.	Empleo del PRP en lesiones óseas.....	108
5.1.1.	Estudios experimentales	109
5.1.2.	Estudios clínicos.....	112
5.2.	Empleo del PRP en lesiones de cartílago y lesiones articulares.....	115
5.2.1.	Estudios experimentales	116
5.2.2.	Estudios clínicos.....	118
5.3.	Empleo del PRP en lesiones de músculo	121
5.3.1.	Estudios experimentales	121
5.3.2.	Estudios clínicos.....	122
5.4.	Empleo del PRP en lesiones de ligamentos	125
5.4.1.	Estudios experimentales	126
5.4.2.	Estudios clínicos.....	129
5.5.	Empleo del PRP en lesiones de menisco.....	133
5.6.	Empleo del PRP en lesiones de tendón.....	134
5.6.1.	Estudios experimentales	135
5.6.2.	Estudios clínicos.....	142

5.6.2.1.	Rotura del tendón de Aquiles	143
5.6.2.2.	Tendinopatía crónica del tendón de Aquiles ..	144
5.6.2.3.	Tendinopatía del codo	146
5.6.2.4.	Tendinopatía del tendón rotuliano	147
5.6.2.5.	Reparación del manguito rotador.....	148
5.6.2.6.	Lesiones tendinosas en caballos de deporte ...	150
5.6.3.	Conclusiones sobre el empleo de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas.....	151
5.7.	Riesgos potenciales del empleo clínico de PRP	151
5.8.	Controversias acerca del empleo clínico de PRP	153
6.	Evaluación ecográfica del tendón.....	157
6.1.	Historia	160
6.2.	Conceptos ecográficos	160
6.3.	Técnica y aparataje	163
6.4.	Realización del examen ecográfico	163
6.5.	Artefactos de la imagen ecográfica.....	164
6.6.	Ventajas del examen ecográfico	166
6.7.	Inconvenientes del examen ecográfico	166
6.8.	Ecografía normal de los tendones	167
6.9.	Aspecto ecográfico del tendón patológico	170
6.10.	Estudio ecográfico del tendón de Aquiles.....	171
6.11.	Sistemas de evaluación de la imagen ecográfica.....	171
 IV. MATERIAL Y MÉTODO		 175
1.	Modelo experimental in vivo de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.....	178
1.1.	Animales	178
1.2.	Condiciones de estabulación.....	179
1.3.	Procedimiento anestésico y manejo preoperatorio	180
1.4.	Procedimiento quirúrgico	184
1.5.	Protección del tendón de Aquiles en el periodo postoperatorio.....	187
1.6.	Cuidados postoperatorios	191
2.	Metodología de obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles de la oveja.....	193
2.1.	Metodología de obtención del PRGF en la especie ovina.....	193

2.1.1.	Extracción de sangre	194
2.1.2.	Protocolo de centrifugado	195
2.1.3.	Fraccionamiento y aislamiento del PRGF.....	196
2.1.4.	Activación del PRGF	199
2.2.	Aplicación del PRGF en la zona lesionada	200
2.2.1.	Aplicación intraquirúrgica del PRP	200
2.2.2.	Aplicaciones de PRGF durante el periodo postoperatorio	202
3.	Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología del estudio	204
4.	Exámenes físicos durante el periodo postoperatorio....	205
5.	Estudio anatomopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles.....	207
5.1.	Eutanasia de los animales	207
5.2.	Examen macroscópico de los tendones	207
5.3.	Examen microscópico de los tendones.....	210
5.3.1.	Procesado y tallado de las muestras de tendón.....	210
5.3.2.	Preparación de las cortes histológicos	211
5.3.3.	Tinción histoquímica (Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson)	212
5.3.4.	Tinción inmunohistoquímica (detección de colágeno tipo I y III)	213
5.3.5.	Muestreo, selección y digitalización de las capturas hitológicas	216
5.3.6.	Valoración microscópica de la cicatrización tendinosa	218
a)	Morfometría del núcleo de los fibroblastos.....	219
b)	Densidad de fibroblastos.....	221
c)	Respuesta vascular.....	223
d)	Evaluación de la infiltración inflamatoria.	224
e)	Organización de las fibras de colágeno...	225
f)	Evaluación inmunohistoquímica del colágeno tipo I y III	227
6.	Estudio ecográfico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles	228
6.1.	Ecografía del tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio.....	228
6.2.	Valoración ecográfica del tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio	231
6.2.1.	Evaluación ecográfica mediante escala de valoración semicuantitativa.....	231

6.2.2. Valoración ecográfica asistida por ordenador.....	232
1. Análisis computerizado de la imagen ecográfica	233
2. Determinación del valor medio de grises, diámetro, y área de corte transversal de la imagen ecográfica	236
7. Análisis estadístico de los datos obtenidos	237
7.1. Análisis de los datos en los exámenes físicos semanales	237
7.2. Análisis de los datos del estudio anatomopatológico	237
7.3. Análisis de los datos del examen ecográfico	238
8. Fuentes de financiación.....	239
V. RESULTADOS	241
1. Modelo experimental in vivo de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.....	244
2. Exámenes físicos durante el periodo postoperatorio....	246
2.1. Exámenes físicos semanales	246
2.2. Exámenes ortopédicos semanales	247
3. Seguimiento ecográfico semanal	252
3.1. Valoración ecográfica mediante escala de valoración semicuantitativa.....	252
3.2. Análisis computerizado de la imagen ecográfica	264
3.3. Valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica.....	283
3.4. Diámetro del tendón de Aquiles	286
3.5. Área de corte transversal de la imagen ecográfica	288
4. Estudio anatomopatológico del tendón de Aquiles.....	291
4.1. Evolución macroscópica.....	291
4.2. Exámenes microscópicos mediante técnicas histoquímicas	294
4.2.1. Morfometría del núcleo de los fibroblastos.....	294
4.2.2. Densidad de fibroblastos.....	303
4.2.3. Respuesta vascular.....	305
4.2.4. Infiltración inflamatoria	308
4.2.5. Organización de las fibras de colágeno.....	311

4.3.	Exámenes microscópicas mediante técnicas inmunohistoquímicas.....	317
4.3.1.	Colágeno tipo I.....	318
4.3.2.	Colágeno tipo III.....	320
VI.	DISCUSIÓN.....	323
1.	Modelo experimental in vivo de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.....	325
1.1.	Elección de la especie ovina.....	325
1.2.	Elección del tendón de Aquiles.....	326
1.3.	Caracterización de la lesión tendinosa.....	327
1.4.	Protección de la tenotomía en el postoperatorio.....	329
1.5.	Evaluación del modelo experimental.....	330
2.	Aplicación de PRGF en la cicatrización del tendón	332
2.1.	Uso de PRGF en nuestro modelo experimental.....	334
2.2.	Pauta de administración del PRGF.....	336
3.	Evaluación anatomopatológica del efecto del PRGF en el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles ..	339
3.1.	Evaluación macroscópica.....	339
3.2.	Evaluación histoquímica.....	340
3.2.1.	Morfología de los fibroblastos.....	341
3.2.2.	Densidad de fibroblastos.....	344
3.2.3.	Organización de las fibras de colágeno.....	347
3.2.4.	Respuesta vascular.....	349
3.2.5.	Evaluación de la infiltración inflamatoria.....	351
3.3.	Evaluación inmunohistoquímica del colágeno tipo I y III.....	352
4.	Evaluación ecográfica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles tras la aplicación de PRGF.....	354
5.	Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP para mejorar el proceso de cicatrización.....	358
6.	Limitaciones de nuestro estudio experimental.....	363
7.	Líneas de investigación en curso y futuras.....	365

VII. CONCLUSIONS	367
VIII. RESUMEN/SUMMARY	371
IX. AGRADECIMIENTOS	379
X. BIBLIOGRAFÍA	389

Introducción

Hipócrates fue el primero en registrar y describir una lesión en el tendón de Aquiles. En 1575, Ambroise Paré describió por primera vez el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles. Pero no fue hasta el año 1888 cuando un cirujano francés, Gustave Polaillon, describió la primera reparación quirúrgica de una rotura del tendón de Aquiles, aunque se cree que un médico árabe ya realizó estos procedimientos en el siglo X. En el siglo XX, un cirujano italiano, Guglielmo di Faliceto, escribió que la naturaleza era incapaz de unir los tendones rotos, y que por tanto el tratamiento quirúrgico era necesario (Maffulli, 1999; Yinger et al., 2002). Desde entonces han aparecido numerosos artículos científicos acerca de la epidemiología, etiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles.

Los mecanismos de cicatrización del tejido tendinoso constituyen un proceso complejo que involucra diversas fases de quimiotaxis y división celular, neovascularización, síntesis de matriz extracelular y remodelado del tejido neoformado. Para que se lleve a cabo correctamente todo este proceso deben interactuar de manera armónica multitud de elementos; desde diferentes tipos celulares, hasta diversas proteínas, metabolitos y electrolitos, todos ellos englobados dentro de un ambiente fisiológico adecuado.

Las plaquetas desempeñan un papel crucial en el inicio y mantenimiento de todo este proceso de reparación-regeneración de los tejidos. De manera general, podemos decir que tras un daño tisular se produce una extravasación de células sanguíneas que acaba produciendo un coágulo y la degranulación de las plaquetas que lo constituyen. En el interior de los gránulos plaquetarios encontramos diversos factores de crecimiento que inician la cascada de eventos que conduce a la cicatrización del tejido (Bennett y Schultz, 1993; Anitua et al., 2004). De esta manera, además del importante papel que juegan las plaquetas en el mecanismo hemostático, cabría resaltar su actividad como moduladoras del crecimiento, morfogénesis y diferenciación celular, merced a los factores de crecimiento residen en el interior de sus gránulos alfa (Anitua et al., 2004). Otras estirpes celulares implicadas en el proceso de cicatrización tisular también son capaces de producir factores de crecimiento. Entre ellas destacan las células inflamatorias, fibroblastos, células epiteliales y células del endotelio vascular (Bennett y Schultz, 1993).

El concepto de emplear los factores de crecimiento que existen dentro de las plaquetas para favorecer los procesos de cicatrización tisular se inició a principios de los años 80. Knighton y colaboradores (1982) evidenciaron la capacidad del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) para inducir angiogénesis, fibroplasia y síntesis de colágeno en la cicatrización de tejidos. Estos estudios derivaron de los trabajos de Ross y colaboradores, quienes a mediados de la década de los 70 ya apuntaban a las plaquetas como una importante fuente de factores de crecimiento (Ross et al., 1974; Rutherford y Ross, 1976). Pero fue a partir de mediados de los años 90 cuando empezaron a surgir diversos estudios que tenían como objetivo el aprovechamiento de estos factores de crecimiento existentes en el interior de las plaquetas en la reparación tisular. De esta manera, el PRP ha sido empleado con éxito en diferentes campos de la Medicina, como es el caso de la cirugía oral y maxilofacial (Marx et al., 1998; Anitua, 1999; Carlson y Roach, 2002), cirugía plástica (Powell et al., 2001; Bhanot y Alex, 2002) y cirugía ortopédica (Lowery et al., 1999; Sánchez et al., 2003a; Mishra et al., 2009b).

El manejo terapéutico de las roturas tendinosas puede resultar complejo, debido sobre todo a que el tendón es una estructura anatómica con un bajo potencial de cicatrización. Este bajo potencial de cicatrización del tendón se debe a que es un tejido con una vascularización relativamente baja, y a que sus células residentes (tenocitos) son también escasas y con un metabolismo bajo (Fenwick et al., 2002; Kader et al.,

2002). Recientemente, algunos autores han propuesto el empleo de factores de crecimiento como una alternativa para estimular el proceso cicatricial del tendón (Maffulli et al., 2002). Existen una serie de factores de crecimiento que desarrollan papeles clave en el proceso de cicatrización del tendón. Entre estos factores de crecimiento podríamos destacar al PDGF, TGF- β 1, VEGF, EGF, bFGF y IGF-I entre otros muchos (Molloy et al., 2003; Hsu y Chang, 2004). Aunque estos factores de crecimiento podrían utilizarse de manera individual para acelerar el proceso de cicatrización tendinosa, algunos autores han planteado que parece poco probable que la acción de un único factor de crecimiento produzca un efecto terapéutico importante y significativo en un escenario *in vivo* (Maffulli et al., 2002). La cicatrización del tendón es un proceso biológico muy complejo, y por tanto resulta más razonable pensar que para observar una verdadera mejoría en el cicatrización del tendón sería necesaria la participación de varios factores de crecimiento y otras moléculas, que se encontrasen en un equilibrio anabólico y catabólico, y que estuviesen disponibles en una concentración adecuada en el momento adecuado (Maffulli et al., 2002). Por desgracia, actualmente desconocemos buena parte de los procesos bioquímicos que tienen lugar en el tejido tendinoso durante el proceso de cicatrización (Andía et al., 2010).

El uso de terapias basadas en la aplicación de plasma autólogo, generalmente conocidas como PRP, proporciona una fuente autóloga de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas (como el fibrinógeno, fibronectina o vitronectina), derivados de los gránulos alfa de las plaquetas (Anitua et al., 2004). Estas sustancias autólogas administradas en el foco de lesión tienen la ventaja de encontrarse en equilibrio biológico, y además, al ser autólogas, se eliminan los riesgos potenciales derivados de una reacción inmunológica adversa (Anitua et al., 2004). Existen numerosos estudios experimentales que han puesto de manifiesto la eficacia de la aplicación de PRP para mejorar los procesos de cicatrización tendinosa. Estos resultados obtenidos sobre modelo experimental se han llevado al escenario clínico con éxito.

Los problemas de tendón son una de las principales causas de morbilidad de carácter musculoesquelético. Se estima que entre del 30 al 50 % de las lesiones deportivas tienen relación directa con un patología de tipo tendinosa (Andía et al., 2010a). De ahí que en los últimos años la comunidad científica esté haciendo grandes esfuerzos para intentar encontrar terapias eficaces que ayuden a optimizar el tratamiento

de este tipo de lesiones. Los prometedores resultados que se han ido obteniendo con la aplicación de PRP para fomentar los procesos de cicatrización tisular no han pasado desapercibidos para los profesionales sanitarios que se ocupan de las lesiones deportivas, y rápidamente han incorporado estos nuevos tratamientos a su arsenal terapéutico. Y probablemente sea en las lesiones del tendón donde más rápidamente se ha extendido su uso clínico, a pesar que cuando se empezaron a emplear por primera vez apenas existían estudios experimentales al respecto (Engebretsen et al., 2010). Sin embargo, algunos estudios clínicos no han evidenciado ningún efecto beneficioso de la aplicación de PRP para incrementar el proceso de cicatrización del tendón. Estos resultados contradictorios han hecho que exista actualmente una gran controversia acerca de la utilidad clínica real de estos productos biológicos para el manejo terapéutico de patologías del tendón (Andía et al., 2010; Engebretsen et al., 2010; Kon et al., 2011; Paoloni et al., 2011).

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto que tiene la aplicación de inyecciones intratendinosas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre la cicatrización del tendón de Aquiles, usando para ello un modelo experimental en oveja. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon tres objetivos parciales:

- 1.- Diseño de un modelo experimental *in vivo* de tenotomía del tendón de Aquiles en la especie ovina, que nos sirviese para poder aplicar las inyecciones de PRGF y evaluar posteriormente su efecto sobre la cicatrización del tendón.
- 2.- Evaluación a nivel histopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles tras la aplicación de PRGF, y su comparación con la cicatrización en tendones infiltrados con solución salina.
- 3.- Seguimiento ecográfico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles tras el tratamiento con PRGF, y su comparación con la cicatrización en tendones infiltrados con solución salina.

Revisión Bibliográfica

1. Anatomía, estructura, histología y biomecánica del tendón de Aquiles

El tendón de Aquiles (*tendo Achillis*) o tendón calcáneo (*tendo calcaneus*) recibe su nombre en honor al guerrero griego Aquiles. Según cuenta la mitología griega, Aquiles fue el héroe más fuerte y veloz que peleó en la Guerra de Troya. De acuerdo con la *Iliada* de Homero, su madre, Tetis, que sabía que su hijo moriría en Troya, lo sumergió en el río Estigia para hacerlo inmortal. Aquiles consiguió así la invencibilidad en todo su cuerpo a excepción del talón por el que su madre lo sujetó al sumergirlo y que se convirtió en su único punto vulnerable. En la Guerra de Troya, Aquiles condujo magistralmente a las tropas griegas, que capturaron y destruyeron la ciudad de Troya tras matar al príncipe troyano Héctor. Sin embargo, el hermano de Héctor, Paris, hirió a Aquiles en su talón con una flecha envenenada y acabó muriendo poco después (Maffulli; 1999; Yinger et al., 2002).

1.1. Anatomía del tendón de Aquiles

El tendón de Aquiles es el tendón más fuerte y grueso del cuerpo y sirve para conectar el músculo tríceps sural (músculo sóleo y las dos cabezas del músculo gastrocnemio) al hueso calcáneo (O'Brien, 2005; Benjamin et al., 2007). Las cabezas lateral y medial del músculo gastrocnemio se originan de los cóndilos femorales y su contribución al tendón de Aquiles comienza como una ancha aponeurosis en la porción más distal de los vientres musculares. El músculo sóleo se origina en la cara posterior de la cabeza del peroné y línea del sóleo de la tibia, y su contribución al tendón de Aquiles es más gruesa pero más corta (Benjamin et al., 2007). A medida que las fibras tendinosas derivadas de las cabezas del músculo gastrocnemio descienden, van convergiendo y el tendón de Aquiles se estrecha. Además, las fibras tendinosas van rotando en torno a las fibras procedentes del músculo sóleo, de modo que a nivel de la inserción en el calcáneo, las fibras del gastrocnemio se insertan lateralmente, y las del sóleo lo hacen más medialmente (Benjamin et al., 2007). Una proporción variable de las fibras más superficiales del tendón de Aquiles no se insertan en el hueso calcáneo, sino que pasan bajo el talón y se continúan con las fibras de la fascia plantar (Benjamin et al., 2007). La forma del tendón de Aquiles varía notablemente entre su porción proximal y su porción distal. Como otros muchos tendones en otras partes del cuerpo, el tendón de Aquiles se ensancha a medida que se acerca a su inserción ósea (Benjamin et al., 2007) (Fig. 1).

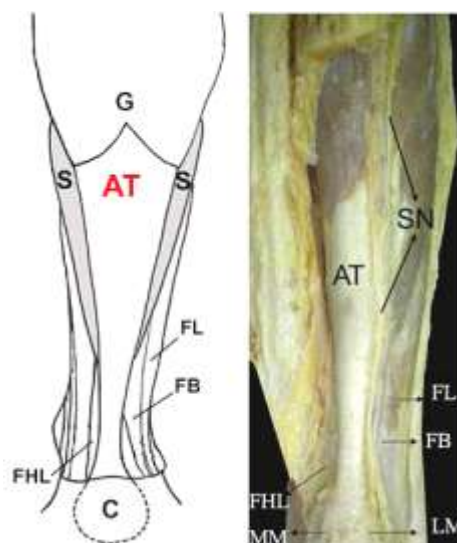


Fig. 1. Anatomía del tendón de Aquiles en la especie humana.

El tendón de Aquiles carece de una verdadera vaina sinovial, pero posee paratendón, que es una envuelta elástica que permite al tendón deslizarse con respecto al resto de estructuras que lo rodean. El paratenon consiste en una envuelta de tejido conjuntivo compuesta principalmente por fibras de colágeno de tipo I y III, y fibrillas elásticas, cuya superficie interna está tapizada por sinoviocitos que producen pequeñas cantidades de líquido sinovial. Este paratendón probablemente no sea tan eficaz como una verdadera vaina sinovial, pero facilita el movimiento del tendón con respecto a los tejidos adyacentes (Kannus, 2000). Se trata de una estructura rica en vasos sanguíneos y nervios. El epitendón rodea al tendón, y su capa más externa se continúa con el paratendón, constituyendo ambas estructuras el peritendón (Benjamin et al., 2007).

El nervio sural transcurre en íntimo contacto con el paratenon del tendón de Aquiles, y cruza su borde lateral aproximadamente unos 10 centímetros por encima de su inserción (Benjamin et al., 2007). Precisamente cerca de su inserción en el calcáneo, el tendón de Aquiles está flanqueado por dos bolsas sinoviales: una superficial entre la piel y el tendón, y otra en profundidad (bolsa retrocalcánea) entre el tendón y la tuberosidad del calcáneo (Benjamin et al., 2007).

1.1.1. Vascularización

El tendón de Aquiles recibe parte de su aporte vascular a través de vasos sanguíneos que transcurren por el paratendón, y que se derivan principalmente de la arteria tibial posterior. La porción media del tendón está relativamente poco vascularizada y esto puede contribuir a que la mayor parte de las roturas del tendón de Aquiles tengan lugar precisamente 2 – 6 cm por encima de su inserción en el calcáneo. La zona proximal del tendón recibe un aporte vascular adicional a partir de los vientres musculares que continúan hacia el tendón a través del endotendón. La zona distal también recibe vasos sanguíneos a través de un plexo arterial periostal existente en la zona posterior del calcáneo. La entesis fibrocartilaginosa en condiciones normales es avascular, de modo que los vasos sanguíneos no pueden pasar directamente desde el hueso hacia el tendón a nivel de la unión osteotendinosa (Benjamin et al., 2007).

1.1.2. Inervación

El aporte nervioso sensorial del tendón de Aquiles y su paratenon es nociceptivo y propioceptivo, y es proporcionado por ramas sensoriales de los músculos que lo forman y por ramas de los nervios cutáneos adyacentes, principalmente del nervio sural. El paratenon está más inervado que el propio tendón, y contiene los corpúsculos de Pacini, que juegan un papel importante en la propiocepción (Benjamin et al., 2007). Además de los corpúsculos de Pacini, en el tendón encontramos los corpúsculos de Ruffini y los de Golgi que funcionan como sensores de presión (Platt, 2005). Estudios experimentales han puesto de manifiesto que la integridad del aporte nervioso juega un papel fundamental en el proceso de cicatrización tendinosa. La denervación periférica del tendón de Aquiles en ratas empeoró las propiedades biomecánicas de tendones en cicatrización a las dos semanas de la tenotomía en comparación con los tendones que no habían sido denervados (Aspenberg y Forslund, 2000).

1.2. Estructura y composición del tendón de Aquiles

El peso seco del tendón es aproximadamente de un 30% de la masa total del tendón, mientras que el 70% restante es agua. Al igual que el resto de tendones, el tendón de Aquiles está constituido fundamentalmente por fibras de colágeno de tipo I (aproximadamente un 80% del peso seco del tendón). Aparte de las fibras de colágeno, en el tendón encontramos fibras de elastina (aproximadamente un 2 – 3% del peso seco) y proteoglicanos (aproximadamente 1%) que constituyen parte de la matriz extracelular (Platt, 2005). Mientras que el colágeno proporciona fuerza tensil, la elastina contribuye a la flexibilidad del tendón (O'Brien, 2005). Se han identificado más de 12 tipos diferentes de colágeno. Los colágenos de tipo I y III son formadores de fibras y constituyen la mayor parte del colágeno secretado al espacio extracelular. El colágeno tipo I es el más abundante en el tendón y constituye aproximadamente el 95% del colágeno existente en este tejido. El colágeno del cartílago articular es principalmente de tipo II, y también forma fibras. Existen otros tipos de colágeno no formadores de fibras, entre los que destacan los tipos IV y V, que son los que forman en su mayoría las

membranas basales (Kirkendall y Garret, 2004). Mientras que en el tendón de Aquiles normal la mayor parte del colágeno existente es de tipo I, en el tendón de Aquiles patológico existe una proporción importante de colágeno de tipo III. Los fibroblastos procedentes de tendones de Aquiles rotos producen tanto colágeno tipo I como tipo III cuando se cultivan. El colágeno tipo III es menos resistente a las fuerzas tensiles que el tipo I, y por tanto disminuye el umbral de ruptura del tendón (Maffulli, 1999).

Las moléculas solubles de procolágeno son secretadas por los tenocitos y tenoblastos al espacio extracelular, donde se transforman en tropocolágeno. Estas moléculas de tropocolágeno se ensamblan mediante puentes cruzados para ir formando progresivamente moléculas insolubles de colágeno. Las moléculas de colágeno a su vez se van agregando mediante uniones cruzadas covalentes para dar lugar a la típica estructura en triple hélice que hace fuerte a esta molécula (Kirkendall y Garret, 2004) (Fig. 2).

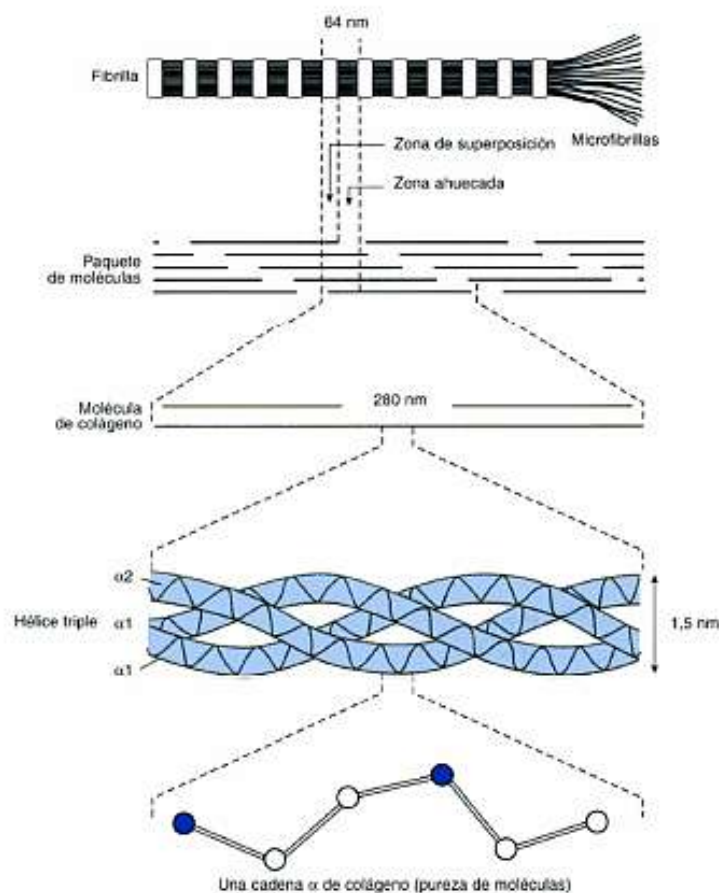


Fig. 2. Estructuración de las moléculas de colágeno hasta formar las fibrillas de colágeno.

Las microfibrillas de colágeno de tipo I se organizan jerárquicamente en fibrillas y posteriormente en fibras de colágeno. El tamaño medio de las fibras de colágeno en el tendón de Aquiles es 60 μm . Las fibrillas de colágeno tienen un diámetro entre 50 – 90 nm. Las fibras se unen para formar haces de fibras primarios (subfascículos), que a su vez se agrupan para dar lugar a haces de fibras secundarios (fascículos) y haces de fibras terciarios, de modo similar a como se estructura un cable trenzado (Kannus, 2000) (Fig. 3). El fascículo es la estructura de colágeno más pequeña que puede ser testada biomecánicamente (O'Brien, 2005). Estos haces de fibras de colágeno se rodean del endotendón, que es una fina membrana de tejido conectivo rica en elastina que penetra en el interior del tendón, y mantiene unidos los haces de colágeno y permite cierto movimiento entre ellos. A través del endotendon es por donde caminan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Kannus, 2000; O'Brien, 2005). El epitendón es la capa más externa del tendón y consiste en una membrana fibrilar relativamente densa de colágeno que se fusiona por su cara interna con el colágeno de los haces de fibras más externos y por su cara externa se continúa con el paratendón (Kannus, 2000).

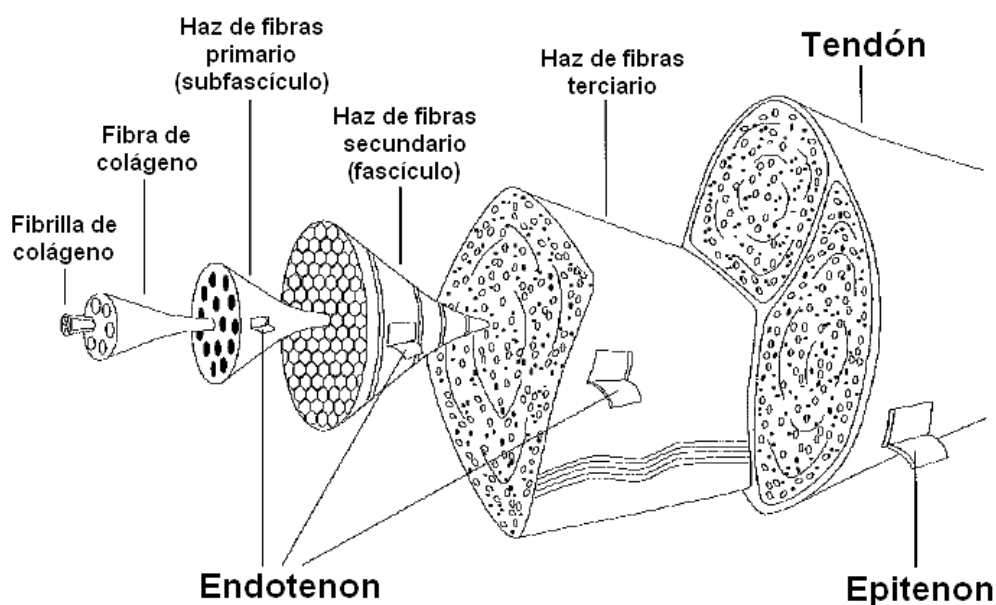


Fig. 3. Las fibrillas de colágeno se organizan de manera jerárquica hasta dar lugar los haces de colágeno, que constituyen la estructura básica de los tendones.

1.3. Histología del tendón de Aquiles

Los tenocitos (que son un tipo especializado de fibrocitos) y tenoblastos (tipo especializado de fibroblastos) constituyen el 90 – 95% de los elementos celulares del tendón, mientras que otras estirpes celulares como condrocitos, células vasculares, sinoviocitos y células de músculo liso constituyen el restante 5 – 10% (Kannus, 2000; Doral et al., 2010). En condiciones patológicas pueden aparecer otras estirpes celulares como células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas) (Kannus, 2000). El tendón de Aquiles normal posee un patrón celular altamente organizado, donde los tenocitos aparecen alineados y empaquetados entre los haces de colágeno, y perfectamente alineados con respecto al eje longitudinal del tendón. Esta organización es debida a que tanto tenocitos como tenoblastos producen de manera uniforme y centrífuga la matriz extracelular, tanto fibrilar como no fibrilar, y llega un momento en el que la célula se ve rodeada y compactada por dicha matriz extracelular (Maffulli, 1999) (Fig. 4). En estado de reposo, las fibras de colágeno del tendón muestran una configuración ondulada, que se aprecia bajo microscopía óptica como bandas regulares a lo largo de la superficie de la fibra de colágeno (Kannus 2000).

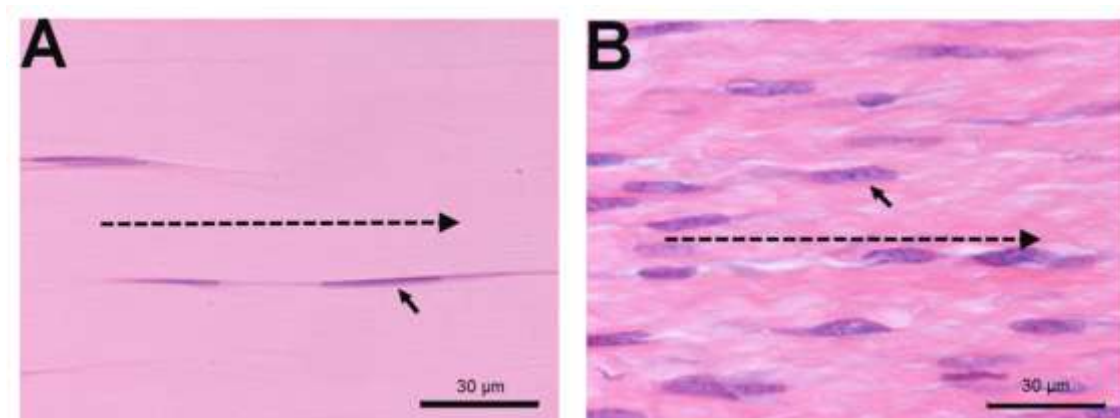


Fig. 4. Imagen microscópica del tendón de Aquiles normal (A) y en proceso de cicatrización (B). En el tendón normal (A) la flecha negra señala un tenocito, mientras que el tendón en cicatrización (B), la flecha indica un fibroblasto. Las líneas discontinuas de ambas imágenes indican la dirección del eje longitudinal del tendón de Aquiles. Cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina. Barra = 30 µm.

En el tendón del animal recién nacido, o en el tendón los primeros estadios del proceso de cicatrización, existe una relación células / matriz extracelular muy alta. En estos casos el principal componente celular son los tenoblastos. Estos tenoblastos varían en su morfología, pero tienden a tener un núcleo de forma ovalada y ampulosa. Su eje longitudinal mide entre 70 – 20 μm , y su eje transversal entre 8 – 20 μm . Esta estirpe celular se caracteriza por poseer un gran retículo endoplásmico y un aparato de Golgi muy desarrollado. Estas características morfológicas de los tenoblastos nos indican que son unas células con una alta tasa metabólica, y son las principales responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (Kannus, 2000). En el tendón adulto, o a medida que progresa la cicatrización tendinosa, la relación células / matriz extracelular disminuye paulatinamente. Los tenoblastos se van transformando en tenocitos (en algunas ocasiones se puede producir la transformación al contrario) y se convierten en unas células con un núcleo muy alargado y fusiforme. Estos tenocitos poseen un eje mayor de entre 30 – 80 μm y un eje menor de entre 2 – 10 μm . El ratio núcleo / citoplasma se incrementa drásticamente y disminuye el desarrollo del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico si los comparamos con el tenoblasto. El núcleo del tenocito es tan extenso que ocupa prácticamente toda la longitud de la célula y la cromatina nuclear se condensa en los márgenes de la membrana del núcleo. El análisis ultraestructural confirma que los tenocitos aún son células metabólicamente activas, pero a un nivel muy inferior al de los tenoblastos (Kannus 2000).

Las células tendinosas son capaces de sintetizar todos los componentes de la matriz extracelular, es decir fibras de colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales. Pero estas células también son las encargadas de los procesos de resorción e intercambio de los componentes de la matriz tendinosa. Por tanto tenocitos y tenoblastos poseen acciones tanto anabólicas como catabólicas para mantener así una correcta homeostasis y estructura en el tendón (Kannus, 2000). La tasa de intercambio de colágeno, incluyendo síntesis y catabolismo, en un tendón adulto sano es relativamente baja. Esta baja tasa metabólica del tejido tendinoso, junto con el buen desarrollo de mecanismos anaerobios de producción de energía hacen que el tendón pueda soportar cargas y mantener en tensión por periodos de tiempo prolongados sin riesgo de isquemia y necrosis. Sin embargo, el hecho de tener una baja

tasa metabólica hace que tanto la recuperación después de la actividad como los procesos de cicatrización sean lentos (Kannus, 2000).

1.4. Biomecánica del tendón de Aquiles

Los tendones son estructuras anatómicas interpuestas entre los músculos y el hueso que actúan como transmisores de la fuerza producida por la contracción muscular hasta el hueso, permitiendo de esta manera el movimiento de las articulaciones (Maffulli, 1999; Kannus, 2000). El tendón de Aquiles está sujeto a las mayores fuerzas que se generan en el organismo, con fuerzas tensiles que pueden llegar a ser de más de 10 veces el peso corporal durante actividades como la carrera o el salto (O'Brien, 2005). Sin embargo, los tendones no se comportan como meras conexiones rígidas, sino que exhiben un comportamiento viscoelástico (Maganaris et al., 2007). Las propiedades biomecánicas de los tendones han sido estudiadas tradicionalmente usando una metodología que implica el estiramiento del tendón hasta la ruptura, y registrando las fuerzas aplicadas y la elongación obtenida a lo largo de la prueba. El resultado de dichas pruebas es una curva de fuerza-elongación, en la cual se pueden diferenciar cuatro regiones diferentes (Maganaris et al., 2007). La región I, o región de baja rigidez, se asocia con fuerzas que no producen daño en el tendón, pero que hacen que se reduzca el grado de ondulamiento normal de la fibra de colágeno. En la región II, o región lineal, las cargas provocan un estiramiento de las fibras de colágeno que ya estaban alineadas, produciéndose alguna ruptura al final de esta fase. Si las fuerzas de elongación continúan, se entra en la región III, o región de alta rigidez, donde se producen roturas de fibras de colágeno de manera impredecible a medida que aumenta la fuerza el estiramiento. Si este estiramiento continúa, el tendón se rompe por completo y entramos en la región IV de la curva de fuerza-elongación (Maganaris et al., 2007) (Fig. 5). Aunque las regiones I, II, III y IV se presentan siempre que un tendón se somete a tracción hasta que se rompe, la forma de la curva fuerza-elongación obtenida varía entre diferentes especímenes (Maganaris et al., 2007).

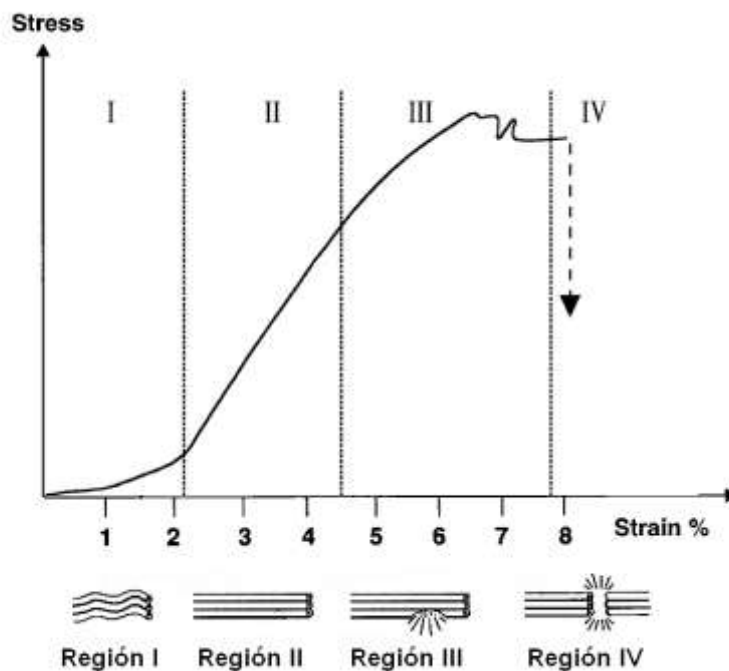


Fig. 5. Gráfica de la curva fuerza-elongación típica de un tendón normal, donde se representan gráficamente la diferentes regiones de la curva.

En un estado de reposo, los haces de fibras de colágeno poseen una configuración ondulada. La complianza del tendón es dependiente de este patrón de ondulamiento intratendinoso. Esta característica permite al tendón actuar hasta cierto punto como un muelle, de modo que cuando se somete a tensión se estira, almacenando parte de esa energía, y liberándola cuando recupera su morfología inicial. Esta configuración ondulada se pierde cuando la fibra de colágeno se somete a una fuerza de estiramiento por encima de un 2%. El tendón es capaz de recuperar su apariencia ondulada si el estiramiento ejercido no supera un 4%. Bajo un estiramiento entre el 4 – 8%, las fibras de colágeno comienzan a romperse y los puentes cruzados intermoleculares desaparecen, de modo que las fibras de colágeno no recuperan por completo su ondulamiento inicial (Maffulli, 1999; Doral et al., 2010).

2. Rotura del tendón de Aquiles

2.1. Epidemiología

El número e incidencia de las lesiones tendinosas se ha incrementado sustancialmente durante las últimas décadas. Se estima que las lesiones del tendón constituyen entre el 30% – 50% del total de lesiones relacionadas con el deporte, siendo el tendón de Aquiles uno de los que con más frecuencia se ve implicado (Jarvinen et al., 2005). La incidencia de rotura del tendón de Aquiles era poco frecuente hasta los años 50, pero a partir de entonces esta incidencia se ha incrementado notoriamente en los países industrializados, sobre todo durante las últimas dos décadas. Esto puede estar asociado con el incremento en la actividad deportiva de una sociedad eminentemente sedentaria (Leppilahti y Orava, 1998; Schepsis et al., 2002). La mayoría de roturas del tendón de Aquiles ocurren durante la práctica de actividades deportivas de recreo en pacientes entre 30 y 40 años. Una preparación insuficiente y la falta de condición física contribuyen a la aparición de esta lesión en este grupo de edad (Leppilahti y Orava, 1998; Schepsis et al., 2002).

La rotura del tendón de Aquiles conlleva unos costes sanitarios importantes (Goel et al., 2009), que se han de sumar a los costes derivados de la inactividad laboral del paciente. Este periodo de inactividad es dependiente del tipo de ocupación que desempeñe el paciente, pero puede oscilar entre las 8 y 10 semanas, aunque si aparecen complicaciones como la re-ruptura del tendón este periodo puede incrementarse por encima de los 6 meses (Leppilahti y Orava, 1998).

2.2. Etiología

La causa exacta de la ruptura del tendón de Aquiles es desconocida, ya que la mayoría de los pacientes que sufren este tipo de lesión nunca antes habían presentado síntomas hasta el momento de la rotura (Jarvinen et al., 2005). Sin embargo, estudios histopatológicos han revelado que la mayoría de los tendones de Aquiles rotos

mostraban cambios degenerativos evidentes en torno al lugar de rotura (Jarvinen et al., 2005). Se cree que el estilo de vida sedentario conduce a un incremento en la aparición de procesos degenerativos en el tendón (relacionados con procesos de hipovascularización del tendón y posterior hipoxia). La existencia de un proceso degenerativo en el tendón de Aquiles predispone a la aparición de roturas cuando éste se somete a breves periodos de intenso ejercicio físico (Jozsa et al., 1989; Jarvinen et al., 2005).

En la etiología de la rotura del tendón de Aquiles se han determinado una serie de causas predisponentes que incluyen factores relacionados con el ejercicio (sobrecarga, cambios de plan de entrenamiento, calentamiento y/o estiramientos inadecuados), mala alineación biomecánica del pie y tobillo (hiperpronación, pie cavo, deformaciones en varus o valgus), determinadas medicaciones (fluoroquinolonas, corticoides, anabolizantes y otras terapias hormonales), determinadas enfermedades sistémicas (obesidad, hipertensión, artritis reumatoide, gota), o el uso de calzado inapropiado (Leppilahti y Orava, 1998; Jarvinen et al., 2005; Weatherall et al., 2010).

2.3. Patogenia

Para explicar la patogénesis de la rotura del tendón de Aquiles se han propuesto dos teorías: la teoría degenerativa y la teoría mecánica. La teoría degenerativa es la más aceptada por la comunidad científica, y proclama que existe un proceso degenerativo previo en el tendón de Aquiles que hace que disminuya su umbral de ruptura. Este proceso degenerativo, en combinación con macrotraumas o bien microtraumas repetidos, conduce a la rotura del tendón (Yinger et al., 2002; Weatherall et al., 2010). La degeneración intrínseca del tendón puede ocurrir como consecuencia de diversos factores entre los cuales cabe destacar la menor vascularización de la porción central del tendón de Aquiles (Chen et al., 2009), cambios degenerativos asociados a la edad (Tuite et al., 1997), o cambios degenerativos asociados al desuso (Yinger et al., 2002). Varios estudios han detectado marcados cambios degenerativos en el lugar de la rotura tendinosa tras el examen histopatológico de una biopsia tomada en el momento de la reparación quirúrgica (Jozsa y Kannus, 1997; Cetti et al., 2003). Además, se ha

demostrado que los cultivos de tenocitos procedentes de tendones que han sufrido rotura muestran un incremento en la producción de colágeno de tipo III, que altera la arquitectura normal del tendón y hace al tejido menos resistente a fuerzas de tensión (Waterston et al., 1997). La teoría mecánica actualmente no se acepta como único factor en la patogenia de la rotura del tendón de Aquiles. Esta teoría propone que la causa primaria de la ruptura era una mala función del mecanismo inhibitorio normal de la unidad musculotendinosa, que prevenía de la ruptura frente a contracciones musculares excesivas o incoordinadas (Leppilahti y Orava, 1998).

El mecanismo de rotura puede ser debido a traumatismos directos o indirectos sobre el tendón. Dentro de los traumatismos indirectos se diferencian tres tipos principalmente: (i) empuje con la planta del pie apoyada mientras se extiende la rodilla, como por ejemplo en la salida de una carrera de 100 m; (ii) dorsiflexión del tobillo repentina e inesperada, como cuando pisamos en un agujero o nos resbalamos por unas escaleras de mano; y (iii) dorsiflexión violenta de un pie con la planta flexionada, como cuando caemos de una altura y aterrizamos con el pie con la planta flexionada (Leppilahti y Orava, 1998).

2.4. Diagnóstico

Los pacientes que sufren una rotura del tendón de Aquiles generalmente describen un chasquido audible seguido de un dolor de comienzo repentino en la extremidad afectada, y la sensación de haber sido golpeados por un objeto o pateados en la parte posterior de la pierna. El examen físico puede revelar edema difuso y hematoma, o incluso se puede palpar una discontinuidad en el tendón de Aquiles (Leppilahti y Orava, 1998; Yinger et al., 2002). Existen una serie de pruebas que permiten diagnosticar la rotura del tendón de Aquiles, entre las cuales encontramos el test de Thompson (Maffulli, 1999; Longo et al., 2009). El test de Thompson nos permite diagnosticar la rotura completa del tendón. Para ello se coloca al paciente tumbado boca abajo sobre una camilla con la rodilla flexionada 90°. Esta prueba consiste en evidenciar la falta de plantaro-flexión cuando se aprietan los músculos gemelos (Yinger et al., 2002; Weatherall et al., 2010).

Con respecto al diagnóstico por imagen, cabe destacar el empleo de la ecografía para la identificación de discontinuidades en el tendón de Aquiles. La ecografía del tendón de Aquiles es una técnica relativamente barata, disponible en la mayoría de hospitales, no invasiva, rápida, repetible y que permite hacer un estudio dinámico del tendón (Oreilly y Massouh, 1993). Sin embargo, se trata de una técnica en la cual la precisión del diagnóstico depende de manera decisiva de la experiencia del ecografista, resultando difícil diferenciar entre roturas totales y parciales (Robinson, 2009). La ecografía también ha sido usada para hacer un seguimiento del proceso de cicatrización tras el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles (Maffulli et al., 1990; Martinoli et al., 1993; Rupp et al., 1995). La resonancia magnética puede resultar de gran utilidad a la hora de demostrar la presencia, localización y severidad de roturas parciales o desgarros del tendón de Aquiles, así como para evaluar el estado del tendón tras la instauración de un tratamiento determinado (Yinger et al., 2002).

2.5. Tratamiento

Las roturas del tendón de Aquiles pueden ser tratadas de manera conservadora o quirúrgica. La mejor estrategia terapéutica para manejar de manera la rotura de este tendón es controvertida (Moller et al., 2001; Kocher et al., 2002; Khan et al., 2005). El manejo quirúrgico presenta una menor tasa de re-ruptura; sin embargo lleva consigo un riesgo potencial de complicaciones asociadas con la infección de la herida quirúrgica (Leppilahti y Orava, 1998; Weatherall et al., 2010). Por otro lado, el manejo conservador obvia el riesgo de infección quirúrgica; pero sin embargo se asocia con periodos de inmovilización más prolongados e incrementa significativamente en la tasa de re-ruptura (Leppilahti y Orava, 1998; Kocher et al., 2002; Weatherall et al., 2010). Tanto tratamiento quirúrgico como conservador consiguen unos buenos resultados a largo plazo, siempre y cuando no se produzcan rupturas postoperatorias (Moller et al., 2001). El tratamiento quirúrgico permite comenzar precozmente un programa de rehabilitación, lo que favorece el proceso de cicatrización tendinosa y limita la atrofia muscular (Leppilahti y Orava, 1998). Estudios recientes recomiendan el tratamiento

quirúrgico seguido de un programa de rehabilitación funcional precoz como una estrategia segura y eficaz para manejar la rotura del tendón de Aquiles (Weatherall et al., 2010). Actualmente, las indicaciones para el manejo conservador se limita a pacientes con enfermedades que podrían comprometer los procesos de cicatrización (diabetes, arterosclerosis), sedentarios y que tienen unas expectativas funcionales y deportivas limitadas (Yinger et al., 2002).

Las opciones quirúrgicas para el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles se agrupan en técnicas de cirugía abierta y técnicas percutáneas o mínimamente invasivas (Movin et al., 2005). Dentro de la cirugía abierta encontramos diferentes técnicas, desde la reparación mediante la anastomosis termino-terminal de los bordes tendinosos rotos, hasta técnicas de reparación con refuerzos de fascia o incluso técnicas reconstructivas del tendón. La reparación tendinosa mediante anastomosis termino-terminal es la técnica de elección para casos que se diagnostican precozmente, y persigue restaurar la continuidad de los bordes del tendón roto, permitiendo que cicatricen y que se recupere la función muscular (Movin et al., 2005). Para la reparación del tendón roto se pueden emplear diversos patrones de sutura con material sintético no reabsorbible. Algunos de los patrones de sutura más comunes son el Bunnell, Kessler, triple polea, o Krackow (Fig. 6). Es interesante reparar el paratendón para minimizar la formación de adherencias (Yinger et al., 2002; Weatherall et al. 2010).

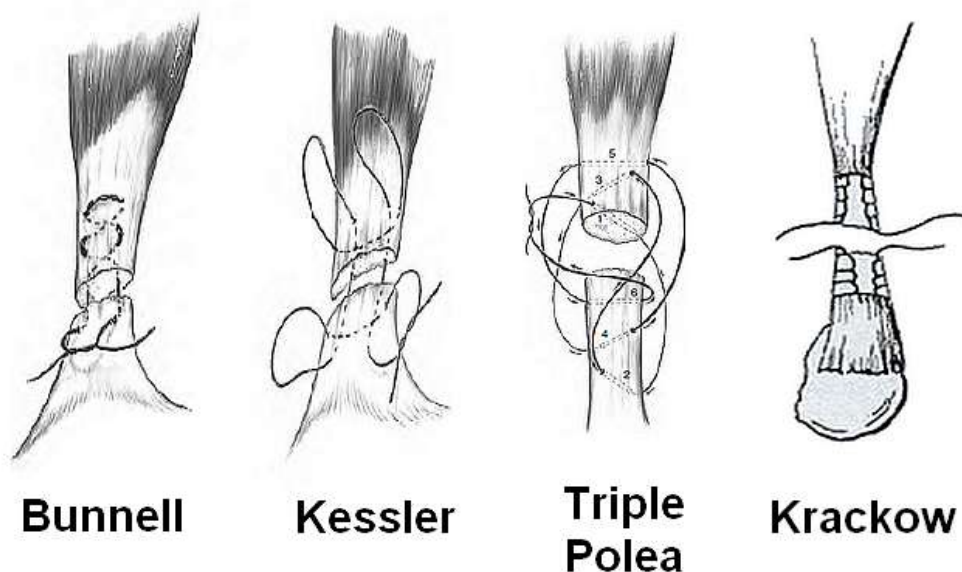


Fig. 6. Patrones se sutura más empleados para la anastomosis termino-terminal del tendón roto.

Las técnicas quirúrgicas de reparación mínimamente invasivas permiten reparar el tendón roto a través de pequeñas incisiones cutáneas, lo que disminuye el riesgo de complicaciones relacionadas con la herida quirúrgica, y reducen el tiempo de la intervención y hospitalización. Por desgracia, la mayoría de estudios muestra una mayor tasa de re-ruptura con estas técnicas percutáneas debido a que la reparación es menos fuerte que con la cirugía abierta (Yinger et al., 2002; Movin et al., 2005). Sin embargo, la técnica percutánea de reparación del tendón de Aquiles está evolucionando y en un estudio reciente se muestran unos resultados muy prometedores (Maffulli et al., 2011).

La reparación tendinosa con refuerzo permite suplementar la fuerza de la anastomosis termino-terminal, sobre todo en casos de re-ruptura, diagnósticos tardíos o cuando la integridad de la reparación sea cuestionable. La mayoría de los procedimientos de refuerzo emplean colgajos de fascia de los músculos gastrocnemios, o bien del tendón plantar (Yinger et al., 2002; Movin et al., 2005). Existen determinadas roturas del tendón de Aquiles en las que se pueden necesitar técnicas reconstructivas empleando para ello material endógeno (fascia lata, transferencias del tendón peroneo corto o del tendón flexor digital largo) o material exógeno (mallas de polipropileno, implantes de polilactato, injertos vasculares de tereftalato de polietileno) (Yinger et al., 2002).

Posiblemente uno de los factores más determinantes en la recuperación de la funcionalidad del tendón de Aquiles tras su ruptura sea la instauración de un programa de rehabilitación precoz. La movilización controlada de los tendones y el apoyo de peso progresivo durante las primeras fases de la cicatrización conduce a una recuperación más rápida y satisfactoria (Maffulli et al., 2003; Suchak et al., 2008).

Aunque existe una tendencia hacia la total recuperación de la actividad deportiva, con un nivel competitivo similar al que existía antes de la rotura del tendón de Aquiles, este tipo de lesión puede comprometer seriamente el rendimiento deportivo de los atletas afectados, o incluso puede llegar a apartarlos de la competición profesional (Leppilahti y Orava, 1998; Parekh et al., 2009).

2.6. Nuevas terapias en la rotura del tendón de Aquiles

En la actualidad han surgido una serie de nuevas terapias adyuvantes en el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles, algunas de las cuales aún se encuentran en fases de experimentación animal (Sharma y Maffulli, 2005b). Entre ellas podemos encontrar el empleo de citoquinas y factores de crecimiento recombinantes. Kurtz y colaboradores (1999) estudiaron los efectos del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) en un modelo experimental de cicatrización tendinosa en rata, y encontraron que en los animales tratados con IGF-I existía un mecanismo antiinflamatorio, así como un menor déficit funcional y un tiempo de recuperación más corto (Kurtz et al., 1999). Aspenberg y Forslund (1999) implantaron esponjas de colágeno con factor de diferenciación del crecimiento 5 y 6 en un modelo de rotura del tendón de Aquiles en rata y observaron que a las dos semanas existía un incremento en la fuerza tensil de los tendones tratados (Aspenberg y Forslund, 1999). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un potente mitógeno endotelial que promueve la angiogénesis. El tratamiento con VEGF en el momento de la reparación quirúrgica en un modelo experimental de tenotomía del tendón de Aquiles en rata demostró que los animales tratados presentaban un incremento significativo de las características biomecánicas de los tendones a las 2 semanas, aunque no mostraron diferencias a las 4 semanas (Zhang et al., 2003). La inyección de proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMP) mejoró la fuerza mecánica de los tendones tratados, tanto en un modelo experimental de laceración del tendón de Aquiles en rata (Forslund et al., 2003) como en conejo (Forslund & Aspenberg 2003). Sin embargo, el tratamiento con CDMP en un modelo animal de mayor tamaño como la oveja no mostró un efecto significativamente beneficioso (Virchenko et al., 2008). Kashiwagi y colaboradores (2004) demostraron que la administración local de factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en un modelo experimental de tenotomía del tendón de Aquiles en rata producía una mayor expresión de procolágeno tipo I y III, así como una mayor resistencia biomecánica de los tendones tratados (Kashiwagi et al., 2004).

Las terapias génicas consisten en la modificación genética de una determinada población celular para promover la síntesis de una o varias proteínas por parte de estas

células. Normalmente el material génico que se desea incorporar al genoma de esas células es transportado a través de vectores virales o liposomas. Estudios en animales de experimentación han demostrado que la terapia génica puede modificar el proceso de cicatrización en el tendón (Sharma y Maffulli, 2005b). Estudios experimentales en un modelo animal de rotura del tendón de Aquiles han mostrado unos resultados prometedores al usar terapias génicas con proteínas morfogénicas óseas (BMP) (Bolt et al., 2007), y TGF- β y VEGF (Hou et al., 2009a; Hou et al., 2009b).

La utilización de células mesenquimales derivadas de médula ósea también ha sido empleada para mejorar el proceso de cicatrización tendinosa. Young y colaboradores (1998) estudiaron el efecto de células mesenquimales derivadas de médula ósea transportadas en implantes de colágeno en un modelo experimental de defecto tendinoso en conejo. Estos autores encontraron una mejoría significativa en las propiedades mecánicas y estructurales en los tendones tratados, con unos haces de colágeno de mayor área de corte transversal y mejor alineados (Young et al., 1998). Se manera similar, otros autores emplearon implantes de colágeno sembrados con células mesenquimales derivadas de médula ósea en un defecto en el tendón rotuliano de conejo y observaron una mejoría en los parámetros biomecánicos (Awad et al., 1999). La ingeniería tisular es un campo emergente y fascinante, pero aún existen una serie de dificultades que deben de ser resueltas antes de poder usar este tipo de terapias en el manejo de patologías tendinosas como la rotura del tendón de Aquiles (Sharma y Maffulli, 2005b; Juncosa-Melvin et al., 2006).

El empleo de fotoestimulación de baja energía a determinadas longitudes de onda puede también incrementar la cicatrización tendinosa a través de la liberación de ciertos factores de crecimiento por parte de los fibroblastos. Reddy y colaboradores (1998) encontraron un 26% de incremento en la concentración de colágeno tras el tratamiento diario con laser de helio-neón en un modelo experimental de rotura tendinosa en conejos (Reddy et al., 1998).

El uso de ondas de choque extracorpóreas aplicadas a sobre un tendón de Aquiles de conejo que había sido previamente seccionado mostró un incremento de la neovascularización y de los marcadores relacionados con la angiogénesis (Wang et al., 2003). Otro estudio en ratas demostró que las ondas de choque extracorpóreas

promovían la cicatrización del tendón de Aquiles, con menor formación de adherencias (Orhan et al., 2004).

El uso de ultrasonidos es otra modalidad terapéutica física que ha mostrado efectos positivos en el proceso de cicatrización tendinosa. Varios estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento con ultrasonidos aceleró el proceso de cicatrización del tendón y mejoró las propiedades biomecánicas de estos tendones en un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en ratas (Ng et al., 2003; Yeung et al., 2006).

Pero probablemente una de las terapias emergentes para el tratamiento de lesiones musculotendinosas sobre la que más se ha escrito en los últimos años sea el Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Actualmente existe un intenso debate acerca de la utilidad clínica de este producto para el manejo de lesiones tanto tendinosas como de otra naturaleza, y aún quedan muchos interrogantes que deben ser esclarecidos (Engebretsen et al., 2010; Andía et al., 2011; Kon et al., 2011). Precisamente uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es aportar luz acerca de los efectos del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), un tipo de PRP, durante el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles, y es por ello por lo que se dedicará un apartado específico dentro de esta revisión bibliográfica donde se detallarán los estudios experimentales previos en los que se hayan empleado este tipo de terapias biológicas para el tratamiento de procesos de cicatrización en lesiones musculoesqueléticas.

Los prometedores resultados que se están obteniendo con estas nuevas terapias, en combinación con las técnicas quirúrgicas clásicas y los nuevos programas de rehabilitación, hacen que tanto los atletas como el resto de la población puedan mejorar sustancialmente sus expectativas de recuperación y puedan regresar a un nivel de actividad física similar al que tenían antes de la rotura del tendón de Aquiles.

3. Cicatrización del tendón

El entendimiento de los procesos de cicatrización tendinosa es importante para el manejo de enfermedades que afectan al tendón. El daño en el tendón desencadena una serie de señales moleculares que producen el reclutamiento de fibroblastos desde tejidos adyacentes, y estimulan a la población local de tenocitos para la síntesis de colágeno y otros componentes extracelulares que persiguen establecer una continuidad física en el tendón roto. El tejido cicatricial que se produce debe ser sometido a una serie de estímulos mecánicos durante el periodo de cicatrización. Estos estímulos mecánicos son fundamentales durante el proceso de remodelación para obtener un tejido con una correcta funcionalidad, aunque el tendón reparado suele ser biomecánicamente de menor calidad que el tendón normal. La falta de uso o movilidad del tendón durante el periodo de reparación conduce a la formación de adherencias. Estas adherencias impiden un correcto deslizamiento del tendón sobre la vaina sinovial o paratendón, y tiene un marcado efecto negativo sobre el resultado funcional final. Sin embargo, una movilización excesiva e inadecuada durante el periodo de reparación puede provocar la ruptura del tendón (James et al., 2008). Un conocimiento adecuado del proceso normal de cicatrización tendinosa permite desarrollar estrategias para cuando este proceso normal no ocurre de la manera deseada, o bien para acelerar o mejorar el proceso de regeneración tisular.

3.1. Fases de la cicatrización tendinosa

Tras sufrir un daño, en el tendón se desencadena una respuesta inflamatoria que da comienzo al proceso de cicatrización, al igual que en otros muchos tejidos. Este proceso de cicatrización transcurre a lo largo de diferentes fases que se continúan en el tiempo y que se solapan entre sí. Estas fases han sido divididas desde un punto de vista didáctico, para facilitar su comprensión. La duración de cada fase puede variar según el lugar y tipo de tendón afectado, según las características del daño infligido, y según el manejo terapéutico empleado. Las diferentes fases de la cicatrización tendinosa son: fase inflamatoria, fase proliferativa, y fase de remodelación (Hope y Saxby, 2007) (Fig.7).

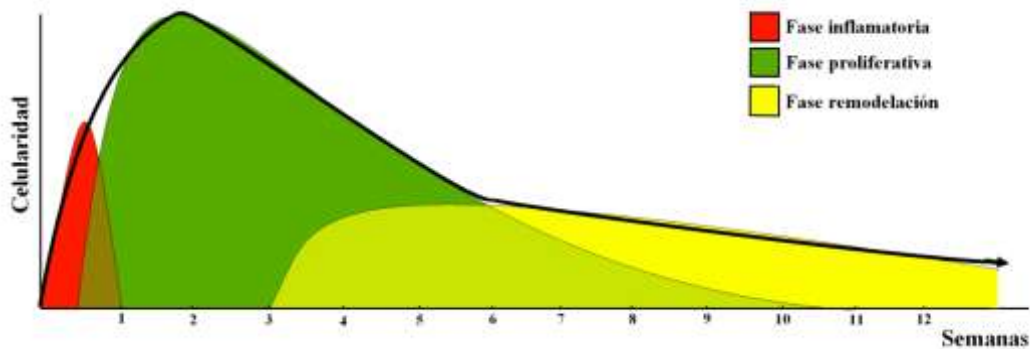


Fig. 7. Representación gráfica de las diferentes fases del proceso de cicatrización en el tendón, donde se muestra la celularidad del tejido a lo largo del tiempo.

3.1.1. Fase inflamatoria

La fase inflamatoria ocurre inmediatamente después del daño tendinoso y dura entre 4 y 7 días (Platt, 2005). En un primer momento, los bordes tendinosos rotos se retraen y el defecto comienza a rellenarse con un hematoma. La agregación plaquetaria produce la liberación de diversos mediadores proinflamatorios y factores de crecimiento. Estos mediadores proinflamatorios inician el proceso de reclutamiento

leucocitario. Los neutrófilos son las primeras células que llegan al sitio de lesión, donde liberan citoquinas que ejercen un papel quimiotáctico para los macrófagos. La concentración de neutrófilos disminuye tras las primeras 24 horas, y posteriormente los macrófagos se convierten en la estirpe leucocitaria predominante hasta el final de la fase inflamatoria. Los macrófagos activados pueden liberar a su vez determinados factores de crecimiento que inducen la formación de matriz extracelular, y estimulan la proliferación de los fibroblastos. Durante esta fase inflamatoria, la actividad fagocítica de los macrófagos elimina los restos de tejido necrótico y rompe el hematoma inicial (Hope y Saxby, 2007). Durante la primera semana, el defecto entre los bordes del tendón se rellena de fibroblastos, y a partir del quinto día comienza la síntesis de colágeno (Platt, 2005). La liberación de determinados factores de crecimiento promueve los procesos de angiogénesis y la posterior formación de una red de capilares sanguíneos. El restablecimiento de una red capilar que garantice un adecuado transporte de oxígeno en el lugar de la lesión es de vital importancia para una adecuada cicatrización tendinosa, ya que el proceso de síntesis de colágeno es altamente oxígeno-dependiente (Hope y Saxby, 2007).

3.1.2. Fase proliferativa

La fase inflamatoria inicial se solapa con la siguiente fase de la cicatrización, la fase proliferativa. Esta segunda fase dura aproximadamente hasta la 3 – 4 semana tras la reparación (Platt, 2005). Los modelos experimentales de rotura tendinosa han permitido observar que tres días después de la reparación del tendón, los fibroblastos del epitendón comienzan a proliferar, principalmente en torno a los bordes de la tenotomía y en torno a los trayectos de las suturas. El continuo reclutamiento y proliferación de fibroblastos en el lugar de la lesión incrementa exponencialmente la síntesis de colágeno, proteoglicanos, y otros componentes de la matriz extracelular. En un primer momento, estos componentes de la matriz extracelular se organizan de manera aleatoria, y predomina sobre todo el colágeno de tipo III (James et al., 2008). A los siete días de la reparación del tendón, se observan evidencias de neovascularización en forma de canales vasculares que se extienden hasta la zona de reparación. Aunque en el endotendón también se observa un incremento moderado de la celularidad, la principal

respuesta proliferativa tiene lugar a nivel el epitendón y las zonas más superficiales del lugar de reparación (Hope y Saxby, 2007).

El pico máximo en la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas no-colágenas de la matriz extracelular ocurre aproximadamente a los 10 días de la reparación quirúrgica. Entre la segunda y tercera semana tras la cirugía aparecen importantes procesos catabólicos de resorción de parte de los haces de colágeno, junto con una reordenación de los fibroblastos a lo largo del eje longitudinal del tendón, lo que fomenta que los haces de colágeno producidos por estas células estén correctamente orientados (Hope y Saxby, 2007). Durante este periodo de degradación de colágeno existe un riesgo importante de re-ruptura si la reparación tendinosa no es lo suficientemente fuerte como para soportar la movilización precoz del tendón. En la región adyacente a la superficie tendinosa aparecen fibras de colágeno que puentean la región reparada. Durante estas primeras semanas, el incremento en la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas coincide con un incremento significativo en las propiedades biomecánicas del tendón. La mayor proliferación celular y vascular en el área lesionada tiene lugar en torno a la 3 – 4 semanas tras la reparación tendinosa (Hope y Saxby, 2007).

3.1.3. Fase de remodelación

La remodelación del tejido tendinoso cicatrizado es un proceso lento y de vital importancia para la correcta recuperación del tendón. Su importancia reside en el hecho de que el resultado final debe de ser un tejido cicatricial funcional, cuyas propiedades biomecánicas se asemejen lo más posible al tejido original. Se cree que la fase de remodelación comienza cuando la fase proliferativa alcanza su pico máximo de celularidad (en torno a las 3 – 4 semanas), pero puede empezar incluso antes, tan pronto como 1 ó 2 semanas tras la lesión (Hope y Saxby, 2007). La fase de remodelación se caracteriza por un descenso progresivo en la celularidad del tejido de reparación, junto con un alineamiento y organización progresiva de las fibrillas de colágeno en haces (Hope y Saxby, 2007; James et al., 2008). Las fibrillas de colágeno, principalmente las de tipo III, son reabsorbidas por la acción de colagenasas, y reemplazadas por fibras de colágeno de tipo I, que poseen más puentes cruzados y mayor fuerza tensil. Los haces de fibras de colágeno se orientan paralelos al eje longitudinal del tendón (Hope y Saxby,

2007, James et al., 2008. Durante esta fase, se produce el cambio desde un tejido de granulación celular, a un tejido principalmente fibroso. Los fibroblastos, con su gran núcleo ovalado, quedan interpuestos entre las fibras de colágeno que ellos mismos producen, y progresivamente su núcleo se va elongando, hasta que adoptan un aspecto similar al de los tenocitos maduros (Hope y Saxby, 2007).

La fase final de la remodelación es la fase de maduración. Durante esta fase el tejido cicatricial comienza a adquirir un aspecto histológico más parecido al del tendón sano. Se produce una disminución gradual en la celularidad, en la vascularización, en la actividad metabólica de los tenocitos, y un incremento en el grosor de los haces de colágeno. La fase de maduración es un proceso largo, que puede durar incluso años. Es importante tener en cuenta que las propiedades biomecánicas de tendón reparado difícilmente alcanzan los valores existentes antes de que ocurriese la lesión (Hope y Saxby, 2007).

3.2. Cicatrización tendinosa intrínseca y extrínseca

Se han propuesto dos modelos para intentar explicar el mecanismo de cicatrización tendinosa: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007). La cicatrización a través de la vía extrínseca sostiene que tanto fibroblastos como células inflamatorias invaden el lugar de la lesión en el tendón, procedentes de tejidos periféricos. Por el contrario la vía intrínseca mantiene que la cicatrización del tendón ocurre gracias a la migración y proliferación de células del propio endotendón y epitendón (James et al., 2008).

En los últimos 25 años se han producido importantes avances que han permitido profundizar en el conocimiento del proceso de cicatrización tendinosa. Antes de los años 70, se creía que el callo cicatricial del tendón se originaba exclusivamente a partir de la vaina sinovial, y que los bordes tendinosos seccionados no participaban en este proceso (Hope y Saxby, 2007). Como resultado de este proceso de cicatrización extrínseco, donde tanto vasos sanguíneos como fibroblastos migraban desde la vaina sinovial hacia el tendón, parecía inevitable la formación de adherencias. Existía mucha

controversia acerca del papel que jugaba el epitendón en la cicatrización del tendón. Inicialmente se postuló que todo el proceso de cicatrización tendinosa se debía al crecimiento fibroblástico que se originaba desde la vaina sinovial hacia el tendón lesionado (Potenza, 1962). Pero trabajos publicados a mediados de los 80 confirmaron que, además de la vía extrínseca de cicatrización tendinosa, existía un mecanismo intrínseco de cicatrización del tendón (Gelberman et al., 1986). En un estudio experimental se puso de manifiesto que el tendón podía experimentar procesos de cicatrización *in vitro* una vez aislado de su vaina sinovial (Manske et al., 1985). Para estudiar si la cicatrización tendinosa podía ocurrir con independencia de la migración de fibroblastos desde tejidos adyacentes, Lundborg y colaboradores (1985) aislaron al tendón con una membrana semipermeable con un tamaño de poro de 1 μm (para así evitar el paso de células) y lo trasplantaron a un bolsillo subcutáneo. A las seis semanas observaron una proliferación de células desde el propio epitendón del tendón y la producción de colágeno, a pesar que no pudo existir infiltración extrínseca de fibroblastos (Lundborg et al., 1985). Estos hallazgos aportaron serias evidencias acerca de la capacidad intrínseca de cicatrización del tendón, y plantearon que el tendón también podía experimentar procesos de cicatrización primaria (Hope y Saxby, 2007).

El proceso de reparación tendinosa es un balance entre cicatrización intrínseca y cicatrización extrínseca. Influencias externas tales como la extensión y localización del daño, el grado de trauma quirúrgico y la movilización durante el periodo postoperatorio pueden afectar la magnitud y localización de la síntesis de colágeno, favoreciendo así una cicatrización más extrínseca o más intrínseca (Hope y Saxby, 2007). El mecanismo de cicatrización extrínseco se activa antes que el intrínseco, y es responsable de la formación de las adherencias que ocurren inicialmente, de la desorganización de la matriz de colágeno y de la alta celularidad del lugar de la lesión. Por el contrario, el mecanismo intrínseco es responsable de la reorganización de los haces de colágeno y del mantenimiento de la continuidad del patrón fibrilar (James et al., 2008).

3.3. Control de la cicatrización tendinosa

El complejo proceso de cicatrización tendinosa es iniciado, mantenido y, en ocasiones, terminado por diferentes mediadores físicos y químicos. La fase inflamatoria se inicia cuando se produce un daño en el tendón, que normalmente suele ser de naturaleza mecánica. Este daño inicial produce la activación de respuestas tanto celulares como vasculares. La respuesta vascular comienza con una intensa vasoconstricción, que se continúa con un estado de vasodilatación a lo largo de toda la fase inflamatoria. Esta vasodilatación se mantiene gracias a mediadores químicos (histamina, prostaglandinas) y a la influencia adicional del sistema nervioso autónomo (Hope y Saxby, 2007).

La respuesta celular está controlada por una serie de mediadores que pueden inducir quimiotaxis, otros que pueden regular la proliferación celular, o bien por factores que modulan la síntesis y degradación proteica. Dentro de estos mediadores destacan cinco factores de crecimiento que ejercen importantes acciones en el proceso de cicatrización tendinosa: el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y el factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF) (Hope y Saxby, 2007). IGF-I se expresa sobre todo durante las primeras etapas de la fase inflamatoria y promueve la proliferación y migración de los fibroblastos del tendón, y posteriormente incrementa la síntesis de colágeno y proteoglicanos (Wang, 2006). Al poco tiempo del daño tendinoso ya se han detectado niveles elevados de PDGF en el lugar de la lesión. Este factor de crecimiento estimula la síntesis de proteínas, tanto colágenas como no colágenas, y además fomenta la producción de otros factores de crecimiento (IGF-I) por parte de las células implicadas en el proceso de reparación (Molloy et al., 2003). El TGF- β es un factor de crecimiento activo prácticamente en todas las fases del proceso de cicatrización tendinosa. TGF- β juega un papel muy importante en el proceso de reparación del tendón y tiene efectos muy diversos que van desde la estimulación de la migración de células extrínsecas hasta la deposición de matriz extracelular (Molloy et al., 2003). Una sobreexpresión de este factor de crecimiento se relaciona con una excesiva fibrosis

cicatricial (Molloy et al., 2003). El VEGF es más activo durante las fases de remodelación y maduración cicatricial. Este factor de crecimiento es clave durante los procesos de angiogénesis, ya que estimula la proliferación de células endoteliales e incrementa la permeabilidad capilar (Molloy et al., 2003). Una baja tensión tisular de oxígeno también estimula los procesos de angiogénesis, merced a que la hipoxia incrementa los niveles de VEGF (Hope y Saxby, 2007).

Además de estos factores de crecimiento, citoquinas y metabolitos, existen un grupo de enzimas denominadas metaloproteasas (MMPs) que desempeñan un papel clave en los procesos de remodelación de la matriz extracelular del tendón. A lo largo del proceso de cicatrización tendinosa, el nivel de MMPs va cambiando. Existen un grupo de moléculas, conocidas como inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs), que bloquean la acción de estas MMPs. La remodelación de la cicatriz tendinosa está regulada por un balance entre las acciones de las MMPs y la actividad de las TIMPs. Un desequilibrio en esta relación puede ocasionar anomalías en el tejido cicatricial resultante (Hope y Saxby, 2007).

3.4. Efecto de la movilización precoz en el proceso de cicatrización tendinosa

La fuerza de la reparación tendinosa se creyó que era insuficiente para permitir una movilización antes de las tres semanas. Además, se creía que el empleo de una sutura suficientemente fuerte como para permitir una movilización precoz del tendón reparado produciría problemas a la hora de formar tejido conectivo o incluso podría acabar necrosando el tendón (Hope y Saxby, 2007). Pero por otro lado, aparecían estudios que ponían de manifiesto que la movilización precoz del tendón reparado disminuía la formación de adherencias entre el tendón y la vaina sinovial. Los estudios de Gelberman y colaboradores (1983) en un modelo canino de reparación de tendón flexor evidenciaron que los animales que se sometían a un programa de movilización pasiva controlada desarrollaban menor cantidad de adherencias que aquellos animales que se inmovilizaban. Además, en los animales donde se practicaban movimientos

pasivos controlados existía una mayor síntesis de proteínas, en contraste con un predominio de la resorción de colágeno en los tendones inmovilizados (Gelberman et al., 1983). Como resultado de estos trabajos, el objetivo de la reparación quirúrgica de los tendones flexores persiguió favorecer los procesos de cicatrización intrínseca. Para ello era indispensable la obtención de una buena aposición de los bordes tendinosos y una reparación lo suficientemente fuerte como para permitir una movilización precoz que minimizase la formación de adherencias (Hope y Saxby, 2007).

4. Plasma Rico en Factores de Crecimiento

4.1. Plasma Rico en Plaquetas (PRP) Vs. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC)

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como un producto biológico autólogo, derivado de la sangre del paciente, y en el cual tras un proceso de centrifugación se obtiene una fracción plasmática con una concentración de plaquetas mayor que la existente en sangre circulante. Las plaquetas contenidas en esa fracción de plasma pueden ser activadas artificialmente para que liberen el contenido del interior de sus gránulos. Entre las sustancias contenidas en el interior de los gránulos plaquetarios se encuentran diversos factores de crecimiento (Marx et al., 1998; Anitua, 1999).

En los últimos años ha surgido una enorme controversia con respecto a la nomenclatura y definición del PRP (Marx, 2001; Anitua et al., 2008; Everts et al., 2008). De acuerdo con Anitua y sus colaboradores (2008), el término “Plasma Rico en Plaquetas” es un término vago y poco preciso. Dentro de este término se engloban un gran número de preparados sanguíneos autólogos que difieren en el protocolo de procesado y preparado, y por tanto en las características cuantitativas y cualitativas del mismo. De ahí la importancia de definir con exactitud y claridad las condiciones de preparado y procesado del PRP (concentración plaquetaria, tipo de anticoagulante empleado, número de centrifugaciones y velocidad de la/s misma/s, tipo de activador plaquetario empleado, presencia o ausencia de leucocitos) (Anitua et al., 2008).

El término Plasma Rico en Factores de Crecimiento, o en inglés *Platelet Rich in Growth Factors* (PRGF), fue acuñado por Anitua y sus colaboradores en 2007, y hace referencia a un producto completamente autólogo y biocompatible, elaborado a partir de la sangre del paciente tras una única centrifugación y mediante el empleo de citrato sódico como anticoagulante y cloruro cálcico como activador plaquetario. El PRGF es un tipo de PRP que presenta una concentración moderada de plaquetas (en torno a 2 – 3 veces los niveles basales), y se caracteriza por no contener ni células de la serie blanca ni eritrocitos (Anitua et al., 2007).

4.2. Papel de las plaquetas en el proceso de cicatrización

Los procesos de reparación y regeneración de los tejidos dañados implican una serie de sucesos fascinantes en los cuales intervienen una multitud de mecanismos celulares y moleculares. En todo este proceso participan diversos tipos de células que producen y/o son sensibles a determinadas moléculas (citoquinas, factores de crecimiento, eicosanoides, entre otras), y cuyo objetivo final es la cicatrización y recuperación funcional del tejido dañado. Dentro de este maremágnum celular, cabe destacar el papel que juegan las plaquetas en el proceso de cicatrización de los tejidos.

Las plaquetas son los elementos formes de menor tamaño que podemos encontrar en la sangre. A pesar de su pequeño tamaño, las plaquetas desempeñan una función clave en la hemostasia. Los mecanismos que gobiernan estos procesos de hemostasia han sido ampliamente estudiados (Savage et al., 1998; George, 2000). Pero la importancia de las plaquetas no sólo reside en sus cualidades hemostáticas, sino que poseen una importante actividad pro-inflamatoria, reguladora y regenerativa, merced a la interacción que establecen con otras células (principalmente neutrófilos y células endoteliales) y a través de la liberación de moléculas como los factores de crecimiento y las citoquinas, entre otras (Mannaioni et al., 1997; Hartwig y Italiano, 2003; Anitua et al., 2004).

4.2.1. Origen y fisiología de las plaquetas

Las células precursoras de las plaquetas son los megacariocitos, que representan aproximadamente el 0,1-0,5% de las células nucleadas de la médula ósea. Los megacariocitos se localizan en los senos capilares de la médula y emiten unas prolongaciones citoplasmáticas denominadas proplaquetas, que están en contacto con la sangre circulante. Estas prolongaciones citoplasmáticas, una vez que se escinden del megacariocito y son liberadas al torrente circulatorio, constituyen las plaquetas (Leven, 2000; Hartwig y Italiano, 2003).

La proliferación de los megacariocitos es un paso necesario en el origen de las plaquetas. Existen sustancias como ciertas citoquinas (IL-3, IL-6 y IL-11) o la

trombopoyetina que estimulan esta fase proliferativa. Los megacariocitos maduros experimentan una expansión constante de su citoplasma, que se va llenando con proteínas del citoesqueleto (α y β tubulina, actina, polímeros de miosina, entre otras), gránulos específicos y contenido granular. Aunque está ampliamente reconocido que las plaquetas se originan a partir de las elongaciones citoplasmáticas de los megacariocitos, el mecanismo fisiológico a través del cual se producen las plaquetas no está aún del todo esclarecido (Leven, 2000; Hartwig y Italiano, 2003).

4.2.1.1. Membrana plaquetaria

La membrana plaquetaria está constituida por tres capas: el glicocáliz, la capa fosfolipídica y la capa submembranosa (Tablin, 2000). El glicocáliz es la capa más externa y contiene una serie de receptores glicoproteicos implicados en la activación y adhesión plaquetaria. Estas glicoproteínas constituyen los antígenos de la membrana plaquetaria, y se dividen en tres familias: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas. La capa central está constituida por una bicapa fosfolipídica asimétrica con propiedades anticoagulantes. La capa más interna o capa submembranosa es parte del citoesqueleto y sujeta a algunas de las glicoproteínas de la capa más externa (Tablin, 2000).

4.2.1.2. Citoplasma plaquetario

El citoplasma plaquetario está constituido por las mismas proteínas citoplasmáticas que existen en los megacariocitos (Leven, 2000; Hartwig y Italiano, 2003). Los filamentos de actina actúan como soporte estructural para los diferentes gránulos plaquetarios y mitocondrias. El adecuado ensamblaje del citoesqueleto plaquetario es de vital importancia para el proceso de activación y secreción del contenido de los gránulos plaquetarios al espacio extracelular (Gentry, 2000; Tablin, 2000; Hartwig y Italiano, 2003).

4.2.1.3. Gránulos plaquetarios

Las plaquetas de los mamíferos contienen tres tipos diferentes de gránulos: gránulos alfa, gránulos densos y gránulos lisosomales (Gentry, 2000; Tablin, 2000; Hartwig y Italiano, 2003; Anitua et al., 2004). Cada uno de estos tipos de gránulos posee una serie de sustancias que difieren tanto en su estructura como en su papel fisiológico, y serán liberadas al medio extracelular durante el proceso de activación plaquetaria (Rendu y Brohard-Bohn, 2001). Precisamente, las actividades beneficiosas sobre los procesos de reparación-regeneración tisular que del empleo de plaquetas se derivan, dependen de las sustancias contenidas en el interior de los gránulos existentes en su citoplasma.

a) Gránulos alfa

Este grupo de gránulos plaquetarios es el más heterogéneo de todos en términos de estructura y composición. Los gránulos alfa son de forma esférica/ovoide y de unos 200 – 400 nm de diámetro (Harrison y Cramer, 1993). En el interior de estos gránulos podemos encontrar una amplia variedad de sustancias que desempeñan importantes papeles en la fisiología normal del organismo (Tabla 1). Algunas de estas sustancias son “específicas” de las plaquetas, debido a que sólo son sintetizadas en los megacariocitos; mientras que otras se consideran “selectivas” de las plaquetas, ya que además de ser sintetizadas (o endocitadas) por los megacariocitos también aparecen en algunos otros tipos celulares (Hartwig y Italiano, 2003; Reed, 2007).

Las sustancias liberadas por los gránulos α se agrupan de acuerdo con su funcionalidad. De este modo encontramos una serie de proteínas adhesivas como son fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1 y factor de von Willebrand. Este grupo de proteínas adhesivas desempeña un papel crucial en la fase de formación y crecimiento del trombo durante la hemostasia. Las plaquetas constituyen una fuente importante de citoquinas. Este tipo de sustancias ejercen un marcado efecto quimiotáctico sobre los leucocitos y activan otras plaquetas. Entre ellas cabe destacar RANTES, IL-8, MIP-1 α , growth-regulated oncogene- α , ENA-8, MCP-3, factor plaquetario-4 (PF-4) y tromboglobulina- β . El factor plaquetario-4, además de ser un

potente atrayente para neutrófilos y fibroblastos, es un regulador negativo de la angiogénesis y un potente inhibidor de la proliferación de las células endoteliales. Los gránulos alfa contienen ciertos factores de la coagulación (Factor V/V_a, Factor de von Willebrand, Factor XI) y otras sustancias que intervienen en la producción de trombina y en la cascada de la coagulación. De la misma manera existen sustancias con acción fibrinolítica, como son plasminógeno, inhibidor-activador del plasminógeno tipo I (PAI-I), macroglobulina α_2 , osteonectina, glicoproteína rica en histidina y antiplasmina α_2 . En los gránulos alfa de las plaquetas se han identificados sustancias con acción proteolítica como la metaloproteasa-4 (MP-4), y al mismo tiempo varias sustancias con acción antiproteasa como el inhibidor tisular de metaloproteasa-4 (TIMP-4), inhibidor plaquetario del factor IX, antitripsina- α_1 , inhibidor de la colagenasa derivado de plaquetas (PDCI) y nexin-proteasa-2. Tanto las sustancias fibrinolíticas como aquellas con una acción antiproteolítica juegan un papel indispensable en los procesos de angiogénesis y remodelación vascular (Harrison y Cramer, 1993; Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Gear y Camerini, 2003; Anitua et al., 2004; Reed, 2007).

Además de estas sustancias, en el interior de los gránulos α de las plaquetas podemos encontrar otras sustancias como condroitín 4-sulfato, albúmina, inmunoglobulinas (IgG) y trombocidinas. A estas últimas sustancias se les han atribuido propiedades bactericidas y fungicidas (Anitua et al., 2004).

Posiblemente uno de los grupos de sustancias de mayor interés biológico existentes en el interior de los gránulos α son los factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento son de suma importancia en los procesos de reparación-regeneración tisular. Entre ellos encontramos el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), con sus diferentes isoformas (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), factor de crecimiento transformante β_1 y β_2 (TGF- β_1 y TGF- β_2), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y factor de crecimiento neurotrófico (NGF) (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Anitua et al., 2004; Marx, 2004; Reed, 2007).

Tabla 1. Contenido de los gránulos alfa de las plaquetas.

Factores de crecimiento	PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), TGF- β_1 , TGF- β_2 , VEGF, bFGF, EGF, IGF-I, HGF, NGF
Proteínas adhesivas	Fibrinógeno, Fibronectina, Vitronectina, Trombospondina-1, Factor de von Willebrand
Citoquinas	RANTES, IL-8, MIP-1 α , Growth-regulated oncogene- α , ENA-8, MCP-3 PF-4, Tromboglobulina- β
Factores de la coagulación	Factor V/V _a , Factor de von Willebrand, Factor XI, Multimerina
Sustancias fibrinolíticas	Plasminógeno, PAI-I, Macroglobulina- α_2 , osteonectina, Glicoproteína rica en histidina, antiplasmina- α_2
Proteasas y antiproteasas	MP-4, TIMP-4, Inhibidor plaquetario del factor IX, Antitripsina- α_1 , PDCI, Nexin-proteasa-2
Otras sustancias	Condroitín-4-sulfato, Albúmina, IgG, Trombocidinas

b) Gránulos densos

Los gránulos densos son los más pequeños de los gránulos plaquetarios. Reciben su nombre como consecuencia del aspecto electrodensito que muestran cuando se estudian bajo microscopía electrónica. Los gránulos densos se forman precozmente en los megacariocitos, comenzando como sacos vacíos que se van llenando con serotonina y nucleótidos de adenina durante el proceso de maduración (Youssefian y Cramer, 2000). Este tipo de gránulos están constituidos por pequeñas moléculas no proteicas. Entre ellas cabe destacar las altas concentraciones de nucleótidos de adenina (ADP/ATP). En el interior de los gránulos densos existe también un importante reservorio de serotonina. Los gránulos densos contienen cationes bivalentes, destacando

entre ellos el calcio. Este tipo de gránulos plaquetarios tienen la particularidad de incorporar hacia su interior determinadas sustancias de carácter básico, como por ejemplo monoaminas (histamina, catecolaminas). Esto último es debido al pH ácido (6.1) existente en el interior de los gránulos densos, mantenido gracias a la acción de una bomba de protones ATP-asa (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

El ADP es una sustancia que promueve la migración plaquetaria, mientras que el ATP participa en la respuesta de las plaquetas al colágeno (Anitua et al., 2004). El calcio es un cofactor indispensable para la agregación plaquetaria y la formación de fibrina, desempeñando un papel muy importante en la cicatrización de las heridas (Lansdown, 2002). La serotonina posee receptores en las células del endotelio vascular y su liberación conduce a un incremento en la permeabilidad capilar (de Clerck et al., 1984). La histamina es una sustancia con un efecto importante en la respuesta inflamatoria (Mannaioni et al., 1997).

c) Gránulos lisosomales

Los lisosomas son la tercera categoría de gránulos de secreción que encontramos en las plaquetas. Su tamaño es intermedio entre los gránulos densos y los gránulos alfa, midiendo entre 175-250 nm de diámetro. Estos lisosomas contienen en su interior glucosidasas, proteasas, hidrolasas y proteínas catiónicas con actividad bactericida. En el interior de los gránulos lisosomales plaquetarios también se han detectado otras enzimas hidrolíticas como la colagenasa y elastasa (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

4.2.2. Respuesta plaquetaria ante un daño tisular

Cuando se produce un desgarro en un vaso sanguíneo, se desencadena una fuerte interacción entre diferentes tipos celulares. Las plaquetas juegan un papel importante en todo este proceso. Éstas experimentan una serie de cambios en su morfología y en su estructura interna que conducen a la formación del tapón hemostático primario y a la retracción del coágulo (Gentry, 2000; Tablin, 2000). Determinados receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, tales como las integrinas, se adhieren al

tejido subendotelial expuesto, y regulan la capacidad de comunicación intercelular durante la formación del tapón hemostático, el proceso inflamatorio y la fase de reparación celular. Como consecuencia se forma una agregación plaquetaria en torno al defecto en la pared vascular. Tanto el fibrinógeno como el factor de von Willebrand liberados por las propias plaquetas juegan un papel decisivo a la hora de mantener puentes de unión que mantengan el tapón plaquetario unido (George, 2000; Anitua et al., 2004).

De igual manera, las plaquetas constituyen una importante fuente de sustancias que desempeñan funciones de vital importancia en los procesos de reparación-regeneración tisular, influyendo de manera decisiva sobre el crecimiento, morfogénesis y diferenciación celular en los procesos de inflamación y angiogénesis. La capacidad de la plaquetas para liberar este tipo de sustancias, que residen en el interior de los gránulos plaquetarios, hacen de ellas una fuente natural de factores de crecimiento y citoquinas que pueden ser usadas desde el punto de vista terapéutico para acelerar los procesos de cicatrización tisular (Anitua et al., 2004).

4.2.2.1. Proceso de activación plaquetaria

La sucesión de eventos que conduce a la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios se conoce como proceso de activación plaquetaria. Las plaquetas son unas células muy reactivas que responden frente a diversos estímulos liberando las sustancias que almacenan en sus gránulos mediante un proceso de exocitosis. Para ello es necesario que un determinado agonista (trombina, ADP, colágeno, tromboxano A₂) interactúe con ciertos receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, lo que iniciará la señal de transducción que disparará el proceso de activación. Tras la activación, el calcio almacenado en el interior del retículo endoplásmico se libera rápidamente al citoplasma, lo que acaba produciendo el movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática. Una vez que se establece el contacto entre la membrana plasmática y la membrana del gránulo, se produce la fusión de las mismas. Tras la fusión de ambas membranas se produce el vaciado del contenido de los gránulos al espacio extracelular. A este proceso se le conoce como reacción de liberación, y requiere energía, que es proporcionada por el glucógeno y las mitocondrias existentes en el citoplasma plaquetario (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Reed, 2007).

La cinética de liberación es diferente para cada tipo de gránulos. En primer lugar, se produce la liberación del contenido de los gránulos alfa, posteriormente los gránulos densos, y por último se liberan los productos proteolíticos del interior de los gránulos lisosomales (Tablin, 2000).

4.2.2.2. Generación de trombina

Las plaquetas activadas son capaces de transformar la protrombina en trombina mediante un proceso dependiente de Ca^{2+} (Anitua et al., 2004). La trombina, además de jugar un papel muy destacado en mecanismo hemostático, es un potente agente mitógeno que estimula determinadas respuestas celulares (Bachli et al., 2003).

4.2.2.3. Metabolitos activos derivados de la activación plaquetaria

Las plaquetas constituyen una fuente de eicosanoides, sintetizados a partir del ácido araquidónico liberado de su membrana fosfolipídica. Entre ellos cabe destacar el tromboxano A_2 , sustancia implicada en los procesos de reparación vascular. Otro metabolito de interés es la esfingosina-1-fosfato, que se libera de las plaquetas activadas durante la formación del coágulo, y destaca por sus cualidades mitogénicas. El factor de activación plaquetario (PAF) es otro lípido bioactivo derivado de las plaquetas que juega un importante papel en la quimiotaxis leucocitaria, en la activación de las células endoteliales y en la adherencia plaquetaria (Weyrich et al., 2002; Anitua et al., 2004).

La liberación de las sustancias contenidas en el interior de los gránulos plaquetarios, junto con los metabolitos activos derivados de la activación de las plaquetas y la trombina generada, crean el ambiente propicio para que transcurran de manera adecuada los diferentes procesos de reparación y regeneración tisular.

4.3. Factores de Crecimiento

En general, los factores de crecimiento pueden ser definidos como sustancias polipeptídicas solubles y difusibles que actúan como agentes reguladores de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular a través de las interacciones que establecen con receptores específicos de la membrana de las células diana. Esto conduce a una serie de fenómenos intracelulares que afectan la expresión de genes que codifican funciones metabólicas, tales como la división celular o la síntesis de determinadas proteínas. Además, los factores de crecimiento pueden inducir la migración de otras células hasta el lugar donde se encuentran, de modo que ejercen un importante estímulo quimiotáctico para células tales como los leucocitos y fibroblastos, estirpes celulares de vital importancia en los procesos de reparación-regeneración tisular (Canalis, 1992; Kiritsy y Lynch, 1993; Lind, 1996).

Los factores de crecimiento son sintetizados por una amplia variedad de tipos celulares, y pueden ejercer su efecto sobre el metabolismo celular a nivel local, o bien pasar a circulación sistémica. En circulación, los factores de crecimiento se pueden encontrar libres o unidos a proteínas, o bien se pueden encontrar en el interior de los gránulos α de las plaquetas, de los cuales serán liberados tras el proceso de activación plaquetaria (Canalis, 1992; Grageda, 2004). A nivel local, los factores de crecimiento pueden actuar de forma autocrina (sobre las mismas células que los producen) y/o paracrina (sobre otras estirpes celulares situadas en las cercanías), regulando las funciones celulares (Canalis, 1992; Grageda, 2004).

A menudo, el mismo factor de crecimiento puede ser sintetizado por varios tipos celulares diferentes (Canalis, 1992). Las acciones de cada uno de estos factores de crecimiento dependen de un buen número de variables. Entre ellas cabe incluir el tipo celular expuesto, el microambiente tisular (densidad celular, tensión de oxígeno), la concentración del factor de crecimiento, y la presencia o ausencia de otros factores de crecimiento al mismo tiempo. Por todo ello, el efecto de los factores de crecimiento no será el mismo en todos los tejidos ni en todas las situaciones (Kiritsy y Lynch, 1993).

Fue en 1979 cuando se consiguió por primera vez aislar y estudiar las propiedades citoproliferativas de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas humanas (Antoniades et al., 1979; Kaplan et al., 1979). Estudios más recientes han puesto de manifiesto que los gránulos α plaquetarios contienen una gran variedad de factores de crecimiento, que pueden ser específicos de las plaquetas, o bien pueden ser encontrados además en otras estirpes celulares. Los principales factores de crecimiento liberados tras la activación plaquetaria son PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, TGF- β_1 , TGF- β_2 , VEGF, bFGF, EGF, IGF-I, HGF y NGF (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Anitua et al., 2004; Marx, 2004; Reed, 2007). La lista de factores de crecimiento aislados del interior de los gránulos plaquetarios irá previsiblemente incrementándose en la misma medida en que se optimizan las técnicas laboratoriales de detección de sustancias.

4.3.1. Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)

El PDGF fue aislado por primera vez del interior de la plaquetas, y de ahí le viene su nombre (Antoniades et al., 1979). Se encuentra principalmente en los gránulos plaquetarios alfa, donde es almacenado (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Anitua et al., 2004; Marx, 2004; Reed, 2007), aunque también puede ser encontrado en macrófagos, células endoteliales, monocitos, células de músculo liso vascular, fibroblastos, matriz ósea y diversas estirpes de células neoplásicas (Ross et al., 1986; Sitaras et al., 1987; Canalis et al., 1988; Rappolee et al., 1988; Antoniades et al., 1991). Es un polipéptido de naturaleza catiónica que permanece estable hasta alcanzar temperaturas próximas a los 100°C. Su punto isoeléctrico es muy básico (10.2) y tiene un peso molecular entre 27.000 y 30.000 daltons. (Antoniades et al., 1979; Deuel et al., 1981; Raines y Ross, 1982; Ross et al., 1986).

El PDGF se trata de una proteína dimérica, es decir está compuesta por dos subunidades. En la actualidad se reconocen cuatro tipos de subunidades diferentes; las clásicas PDGF-A y PDGF-B (Deuel et al., 1981; Ross et al., 1986), que fueron las dos primeras en identificarse; y las nuevas PDGF-C y PDGF-D, que han sido descubiertas recientemente (Li y Eriksson, 2003; Reigstad et al., 2005).

Los cuatro monómeros de la familia PDGF conservan una alta similitud estructural, y se caracterizan por poseer una región rica en cistina que les permite formar puentes disulfuro uniendo así dos cadenas polipeptídicas antiparalelas. Esto propicia que la proteína pueda adquirir una conformación tridimensional, formándose cinco PDGFs, ya sean homodímeros o bien heterodímeros (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Los PDGFs son inactivos en sus formas monoméricas (Reigstad et al., 2005). Todos los PDGFs comparten los mismos receptores tirosín-kinasa; el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas alfa (PDGFR- α) y beta (PDGFR- β). El PDGFR- α reconoce tanto PDGF-A como PDGF-B, de modo que puede ligarse a PDGF-AA, -AB y -BB. Sin embargo, el PDGFR- β reconoce solo la subunidad PDGF-B, y por tanto tendrá alta afinidad por PDGF-BB, se unirá a PDGF-AB con baja afinidad, y no se unirá a PDGF-AA (Bennett y Schultz, 1993). Ambos receptores se pueden combinar a su vez para formar homodímeros o heterodímeros, resultando así tres posibles combinaciones (PDGFR- $\alpha\alpha$, - $\alpha\beta$, - $\beta\beta$), teniendo cada uno de ellos afinidad variable hacia los diferentes PDGFs (Li y Eriksson, 2003; Reigstad et al., 2005).

La expresión de ambos receptores, y de cada uno de los diferentes PDGFs está bajo control independiente, lo que permite un alto grado de flexibilidad en las posibles combinaciones. Además, una α_2 -macroglobulina se liga de manera reversible con el PDGF, formando un complejo que evita la unión del PDGF a sus receptores, lo protege de la degradación proteolítica y lo elimina de la circulación (Reigstad et al., 2005).

a) Funciones biológicas de PDGF

El PDGF es un potente activador de las células de origen mesenquimal (Pierce et al., 1991). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto un destacado efecto mitogénico sobre fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso vascular y células de la glía (Kiritsy y Lynch, 1993). Además de sus propiedades mitogénicas, el PDGF posee otros muchos efectos biológicos. Este factor de crecimiento tiene un potente efecto quimiotáctico sobre fibroblastos, células de músculo liso y células inflamatorias (Kiritsy y Lynch, 1993). El PDGF estimula la síntesis de diversos componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo, como glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) o proteoglicanos (Castor et al., 1981; Hsu y Chang, 2004). Además de esto, el PDGF

modula importantes procesos relacionados con la remodelación tisular, tales como la endocitosis o la migración celular (Kiritsy y Lynch, 1993).

Las investigaciones dirigidas hacia el esclarecimiento del papel que desempeña el PDGF en los procesos de reparación-regeneración son muy numerosas, en particular porque se trata de uno de los primeros factores de crecimiento detectables en el foco de lesión tras un daño tisular (Hsu y Chang, 2004).

b) Importancia del PDGF en la cicatrización tendinosa

El PDGF juega un papel importante durante los procesos de cicatrización tendinosa. Así lo demuestra el trabajo de Duffy y sus colaboradores (1995), que evidencia niveles elevados de PDGF durante la cicatrización del tendón flexor digital en un modelo experimental canino (Duffy et al., 1995). Parece ser que el PDGF desempeña su papel fundamentalmente durante las fases más precoces de la cicatrización tendinosa, induciendo la síntesis de otros factores de crecimiento, tales como IFG-I (Molloy et al., 2003). Aunque estudios in vitro han evidenciado que el PDGF también desempeña un importante papel durante la fase de remodelación tisular (Yoshikawa y Abrahamsson, 2001). El PDGF estimula la síntesis de colágeno y de otras proteínas de la matriz extracelular tendinosa de manera dosis dependiente (Molloy et al., 2003).

Estudios in vivo llevados a cabo por Letson y Dahners en 1994 emplearon PDGF solo, o bien combinaciones de PDGF con IGF-I, ó PDGF con bFGF en la cicatrización ligamentosa de un modelo experimental en rata. Estos autores observaron una mejoría en los parámetros biomecánicos de los ligamentos tratados con PDGF, pero no apreciaron un efecto sinérgico en los casos en los que se combinaron los diferentes factores de crecimiento (Letson y Dahners, 1994). Posteriormente, otros autores han demostrado que la aplicación de PDGF-BB en el sitio de lesión ligamentosa incrementa la calidad de la cicatrización sobre un modelo experimental en conejo desde el punto de vista biomecánico pero, paradójicamente, esta mejoría no se observa a nivel histopatológico (Hildebrand et al., 1998). Estudios más recientes han demostrado que la liberación de PDGF-BB durante el proceso de cicatrización tendinosa mejora la

funcionalidad del tendón reparado en un modelo experimental canino (Thomopoulos et al., 2009).

c) Importancia del PDGF en la cicatrización de otros tejidos

A nivel articular, los condrocitos expresan receptores para el PDGF (Bowen-Pope et al., 1991). Esta sustancia es mitógena para los condrocitos articulares normales, cultivados y reimplantados (Ljung et al., 1995). La administración intraarticular de PDGF-BB en un modelo experimental en ratas tuvo como consecuencia un aumento transitorio y precoz de la actividad osteogénica en las capas profundas del cartílago articular (Hulth et al., 1996).

El PDGF parece ser que estimula la resorción ósea mediante el incremento en el número de osteoclastos, quienes desempeñan un papel clave en los procesos de remodelación ósea. La síntesis local de PDGF en la matriz ósea está regulada por otros factores de crecimiento como el TGF- β (Grageda, 2004). En estudios in vivo, el PDGF ha demostrado incrementar la formación de hueso ectópico y la actividad de la fosfatasa alcalina sobre un transportador de matriz ósea desmineralizada (Howes et al., 1988). Las aplicaciones locales de PDGF sobre modelos experimentales de osteotomía en conejos han mostrado efectos beneficiosos sobre la cicatrización ósea (Nash et al., 1994; Vikjaer et al., 1997).

El PDGF actúa como un importante agente quimiotáctico y mitogénico para estirpes celulares implicadas en el proceso de cicatrización de las heridas, como es el caso de fibroblastos, células de músculo liso, neutrófilos y monocitos (Pierce et al., 1991). El PDGF induce procesos de angiogénesis, y regula la expresión de metaloproteasa de la matriz tipo-1 (MMP-1) y de su inhibidor natural (TIMP-1) durante la fase más tardía de remodelación. Este factor de crecimiento estimula la proliferación fibroblástica, la migración epitelial, los procesos de vascularización y la infiltración neutrofílica durante el proceso normal de cicatrización de las heridas (Pierce et al., 1991; Reigstad et al., 2005). La aplicación tópica de PDGF sobre la herida incrementa la velocidad de cicatrización y la fuerza tensil del tejido cicatricial (Hsu y Chang, 2004).

4.3.2. Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)

La familia TGF- β comprende un gran número de factores de crecimiento relacionados desde el punto de vista estructural, cada uno de los cuales con capacidad para regular importantes procesos celulares. Los miembros de esta superfamilia comparten una región de residuos de cisteína que forma una estructura común mantenida mediante puentes disulfuro (Massagué, 1998). Dentro de esta familia encontramos a su vez importantes subfamilias, como la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que desempeñan importantes funciones durante el desarrollo embrionario, y posteriormente en la etapa postnatal y adulta (Chen et al., 2004). Otros importantes miembros de esta superfamilia son las activinas e inhibinas, o la sustancia inhibidora mülleriana de los mamíferos. Todas estas proteínas comparten entre un 25 y un 35% de la homología secuencial del TGF- β (Kiritsy y Lynch, 1993; Massagué, 1998). Actualmente se acepta que dentro de la familia TGF- β existe a su vez una subfamilia también denominada TGF- β , compuesta por tres miembros: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (Massagué, 1998).

Aunque los miembros de la familia TGF- β fueron identificados por primera vez en células transformadas (neoplásicas), de donde le viene el nombre, también han sido detectados en diferentes tejidos no neoplásicos, lo que sugirió ya desde hace varias décadas un papel fisiológico importante de estas sustancias en la modulación del crecimiento celular (Assoian et al., 1982).

En los mamíferos se han descrito tres isoformas del TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. La molécula bioactiva es un homodímero constituido por dos polipéptidos de 12500 Daltons cada uno, unidos por un puente disulfuro, de modo que forman una molécula de 25000 Daltons (Assoian et al., 1982; Clark y Coker, 1998). Los TGF- β s son secretados como precursores peptídicos latentes (LTGF- β) que requieren una activación previa para poder unirse a sus receptores (Clark y Coker, 1998; Todorovic et al., 2005). Estos LTGF- β pueden ser activados por proteasas como plasmina y trombina, o bien a través de interacciones físicas con proteínas como la trombospondina-1 o las integrinas. El óxido nítrico (NO) también activa el TGF- β (Clark y Coker, 1998; Blobel, 2000; Todorovic et al., 2005). Las funciones fisiológicas del TGF- β son mediadas por

la interacción con cinco receptores (T β Rs), aunque los principales receptores son T β RI y T β RII (Massagué, 1998; Huang y Huang, 2005).

Los gránulos alfa plaquetarios resultan ser el mayor reservorio de TGF- β , encontrándose en las plaquetas concentraciones de 40 a 100 veces superiores en comparación con otros tejidos no neoplásicos (Assoian et al., 1982). En el hueso también se han detectado concentraciones importantes de TGF- β , y los osteoblastos son las células que presentan mayor cantidad de T β Rs, lo que ya hace pensar en la importancia de este factor de crecimiento sobre el metabolismo óseo (Robey et al., 1987; Lind 1996). El TGF- β también puede ser secretado por linfocitos (Kehrl et al., 1986), macrófagos (Assoian et al., 1987) y fibroblastos (Lyons et al., 1988).

a) Funciones biológicas de TGF- β

El TGF- β es un péptido regulador de importantes funciones biológicas, tales como la proliferación, migración y metabolismo celular. Este factor de crecimiento puede tanto estimular como inhibir la diferenciación y proliferación celular, dependiendo de su concentración, del tipo celular al cual es expuesto y del ambiente tisular en el que se encuentra (Kiritsy y Lynch, 1993). En general, se considera que el TGF- β estimula las células de origen mesenquimal, mientras que produce la inhibición de aquellas de origen ectodérmico (Lind, 1996). El TGF- β participa en el crecimiento y desarrollo tanto embrionario como adulto, en la respuesta inflamatoria y en los procesos de reparación tisular (Clark y Coker, 1998). Este factor de crecimiento también desempeña un importante papel en la regulación del sistema inmune, ya que interviene en diversos procesos relacionados con la apoptosis, selección y activación de las células T (Huang y Huang, 2005).

Estudios in vitro han puesto de manifiesto que el TGF- β es un potente mitógeno para los osteoclastos (Centrella et al., 1987). Sin embargo, este mismo factor de crecimiento actúa inhibiendo la proliferación de células epiteliales y endoteliales, además del crecimiento de linfocitos T y B en estudios in vitro (Kiritsy y Lynch, 1993). Este efecto dual del TGF- β con respecto a la proliferación de diferentes estirpes celulares depende en buena medida de los otros factores de crecimiento que puedan estar actuando simultáneamente en ese mismo ambiente celular (Roberts et al., 1985).

Además de este efecto estimulador/inhibidor de la proliferación celular, el TGF- β posee otras muchas e importantes funciones biológicas. Se ha puesto de manifiesto que el TGF- β ejerce un potente efecto quimiotáctico sobre monocitos (Wahl et al., 1987) y sobre fibroblastos (Postlethwaite et al., 1987). El TGF- β estimula la síntesis de colágeno y fibronectina por parte de los fibroblastos en condiciones *in vitro* (Roberts et al., 1986; Igotz y Massagué, 1986), al mismo tiempo que inhibe la producción de proteasas y estimula la secreción de sustancias inhibitoras de las proteasas (Kiritsy y Lynch, 1993). El TGF- β también regula las acciones de otros muchos factores de crecimiento, influenciando ya sea positiva o negativamente la dirección de sus efectos (Kiritsy y Lynch, 1993).

b) Importancia del TGF- β en la cicatrización tendinosa

El TGF- β participa de manera activa prácticamente durante todas las fases de la cicatrización tendinosa, y desempeña importantes funciones en la zona de reparación tisular, tales como la estimulación de la migración de células extrínsecas, regulación de la actividad de las proteasas, estimulación de la producción de colágeno y cese de la proliferación celular (Molloy et al., 2003).

La expresión de ARNm de TGF- β 1 aumenta drásticamente poco después de producirse un daño en el tendón, y se cree que este factor de crecimiento juega un papel importante en la respuesta inflamatoria inicial tras el daño tisular (Sciore et al., 1998). Estudios *in vitro* en cultivo celular de epitendón y endotendón mostraron que las tres isoformas de TGF- β incrementaban significativamente la producción de colágeno tipo I y III (los tipos de colágeno más abundantes en el tendón) y la viabilidad celular (Klein et al., 2002).

Estudios *in vivo* sobre un modelo experimental de daño tendinoso han puesto de manifiesto que altas dosis de TGF- β 1 exógeno pueden llegar a producir efectos deletéreos sobre la reparación del tendón, como por ejemplo formación de adhesiones y fibrosis, lo cual conlleva una considerable disminución del rango de movilidad tendinosa (Molloy et al., 2003). Para evitar esto, se han usado con éxito la aplicación de dicho factor de crecimiento junto con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β 1,

consiguiendo así mejoras en el rango de movilidad del tendón (Chang et al., 2000). Otros miembros de la superfamilia TGF- β (proteínas morfogenéticas óseas) han sido empleados en un estudio *in vivo* de reparación tendinosa con éxito desigual, ya que una de las sustancias testadas indujo la formación de espículas óseas, y esto supuso una disminución de la fuerza mecánica del tendón (Aspenberg y Forslund, 2000).

c) Importancia del TGF- β en la cicatrización de otros tejidos

El TGF- β juega un papel muy importante en la cicatrización de las heridas. Las propiedades quimiotácticas de este factor de crecimiento sobre las células inflamatorias, junto con la estimulación de la síntesis de matriz extracelular y la inducción de neovascularización, son tres propiedades cruciales en los procesos de cicatrización tisular (Bennet y Schultz, 1993). La administración exógena de TGF- β ha conseguido revertir, en modelos experimentales de defectos cutáneos, factores perniciosos para la cicatrización de heridas, tales como la edad o los glucocorticoides (Beck et al., 1991; Beck et al., 1993). A pesar de estos efectos procicatrizantes, algunos autores relacionan el TGF- β con la patogénesis de la fibrosis excesiva de las heridas, resultando en una deposición excesiva y desordenada de colágeno (Border y Ruoslahti, 1992). En modelos experimentales de heridas cutáneas, se detectaron niveles elevados de TGF- β en los casos de formación de cicatriz patológica (Chang et al., 1995).

En el tejido óseo, el TGF- β fomenta la formación de hueso a través de un incremento en la proliferación de células precursoras de osteoblastos y, además ejerce un estímulo directo sobre la síntesis de colágeno en la matriz ósea (Grageda, 2004). El TGF- β es capaz de inhibir la formación de osteoclastos, y por consiguiente produce una inhibición de la resorción ósea (Mohan y Baylink, 1991; Anitua, 1999; Grageda, 2004). Estudios experimentales de defectos óseos *in vivo* han puesto de manifiesto las propiedades osteoinductoras del TGF- β aplicado sobre una matriz ósea desmineralizada (Kibblewhite et al., 1993). La aplicación exógena de TGF- β en un modelo experimental de fractura produjo un incremento en el tamaño del callo óseo y mejoras en varios parámetros biomecánicos (Lind et al. 1993). Igualmente, el uso de TGF- β ha demostrado mejorar la osteointegración y fijación mecánica de implantes insertados en el hueso trabecular de perros adultos (Lind et al., 1996; Sumner et al., 1995). Sin embargo, otros estudios experimentales muestran poco éxito en cuanto a la inducción y

formación de hueso tras la aplicación de este factor de crecimiento (Sampath et al., 1987; Ripamonti et al., 1996). La combinación de PDGF junto con TGF- β sobre una matriz ósea desmineralizada ha mostrado efectos positivos en cuanto a la neoformación ósea cuando se usa en pequeños animales (Grageda, 2004).

A nivel del cartílago articular, el TGF- β actúa como una sustancia reguladora del anabolismo de los condrocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, fomentando la proliferación celular y de la síntesis de algunos componentes de la matriz extracelular (Grimaud et al., 2002). Este factor de crecimiento actúa directamente sobre los condrocitos favoreciendo la síntesis de proteoglicanos (Nixon et al., 1998; van Osch et al., 1998). Muchas de sus acciones las lleva a cabo regulando los efectos de otros factores de crecimiento e interleuquinas. De esta manera el TGF- β contrarresta la mayoría de los efectos deletéreos que la IL-1 ejerce sobre el tejido articular, contribuyendo así al mantenimiento de una buena homeostasis del cartílago (Pujol et al., 2008). Estudios recientes han puesto de manifiesto el papel clave que juega el TGF- β en la patogénesis de la osteoartritis (Román-Blas et al., 2007).

4.3.3. Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)

La familia IGF está compuesta por dos miembros: el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II). El IGF-I, también conocido como somatomedina C, fue por primera vez aislado del suero humano como una cadena polipeptídica compuesta por 70 aminoácidos (7.7 kD), con una configuración espacial mantenida por tres puentes disulfuro (Mohan y Baylink, 1991). El IGF-II, que también fue conocido como factor de crecimiento esquelético, está compuesto por 67 aminoácidos (7.5 kD) y, al igual que el IGF-I, presenta una región con tres puentes disulfuro (Mohan y Baylink, 1991). Ambos IGFs son cadenas polipeptídicas únicas, que comparten un 47% de homología secuencial con la insulina, y un 62% entre ellas (Mohan y Baylink, 1991; Kiritsy y Lynch, 1993).

Tanto IGF-I como IGF-II son sintetizados por un gran número de tejidos en el individuo adulto, si bien IGF-II se sintetiza predominantemente durante el desarrollo fetal, mientras que la síntesis de IGF-I se mantiene a niveles altos en tejidos adultos tales como hígado, corazón, pulmón, riñón, páncreas, cartílago, cerebro y músculo

(Bennett y Schultz, 1993). Tras su síntesis, IGF-I puede actuar de manera local sobre los tejidos adyacentes (efecto autocrino/paracrino), o bien puede entrar en circulación y desempeñar su función sobre tejidos alejados (efecto endocrino) (Hsu y Chang, 2004). La síntesis de IGFs está regulada por influjos hormonales, sobre todo por parte de la hormona de crecimiento (GH) que estimula la síntesis de IGF-I, principalmente a nivel hepático (Canalis, 1992; Bennet y Schultz, 1993). Tras la síntesis de IGF, sobre todo en el hígado, es liberado al torrente sanguíneo, donde es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para posteriormente ser almacenado en el interior de los gránulos α (Duan, 2002).

Tanto IGF-I como IGF-II poseen receptores diferentes. El receptor de IGF-I (IGFR-I) posee una estructura similar al receptor de la insulina, y consiste en dos subunidades α y dos subunidades β , unidas por puentes disulfuro. IGFR-I se une con una afinidad alta a IGF-I, con baja afinidad a IGF-II, y débilmente a la insulina. El receptor de IGF-II (IGFR-II) se une con alta afinidad a IGF-II, con baja afinidad a IGF-I, y no se una a insulina (Bennett y Schultz, 1993).

Se conocen seis proteínas que se unen a IGF (IGFBPs) y de esta manera prolongan su vida media, presentan el IGF a sus receptores, o bien modulan su actividad biológica tras ligarse a las formas libres de IGFs (Canalis, 1992). El balance dinámico entre la forma libre y la forma unida a proteínas condiciona de manera importante los efectos biológicos de IGF (Bennett y Schultz, 1993).

a) Funciones biológicas de IGF

IGFs son proteínas anabólicas con una amplia variedad de funciones biológicas. Entre éstas cabe resaltar la replicación celular, la síntesis de glucógeno, proteínas y glicosaminoglicanos, y el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la membrana celular (Kiritsy y Lynch, 1993).

El sistema locomotor es una de las principales dianas de la acción de IGF. Entre sus funciones cabe destacar el incremento en la formación de cartílago y hueso, así como el descenso en la degradación de la matriz extracelular de estos tejidos. Por tanto, IGFs son considerados importantes estimulantes del crecimiento esquelético y juegan un papel muy relevante en el mantenimiento de la masa ósea (Canalis, 1992). Tanto

IGF-I como IGF-II poseen actividades similares a la hora de promover el crecimiento, pero parece ser que IGF-I tiende a ser hasta tres veces más potente que IGF-II (Canalis, 1992; Grageda, 2004).

IGF-I es un potente agente quimiotáctico para células del endotelio vascular. El IGF-I liberado por las plaquetas o producido por los fibroblastos puede promover la migración de células del endotelio vascular hacia las zonas de reparación-regeneración tisular, produciendo un incremento en el ritmo de neovascularización del área (Bennett y Schultz, 1993).

b) Importancia del IGF en la cicatrización tendinosa

IGF-I desempeña numerosas y variadas actividades durante la cicatrización tendinosa (Molloy et al., 2003). Su papel primario parece ser estimular la proliferación y migración de fibroblastos y otras células al lugar del daño, y de esta manera incrementar la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular durante las fases de remodelado (Molloy et al., 2003). Al igual que ocurre con otros factores de crecimiento, la actividad estimulante de IGF-I presenta sinergismo con otras moléculas, como por ejemplo PDGF-BB. Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que la división celular en fibroblastos de tendón y células de la superficie tendinosa es mayor cuando se aplican ambos factores de crecimiento juntos, comparado con sus efectos individuales (Tsuzaki et al., 2000).

Diversos investigadores han intentado desarrollar aplicaciones terapéuticas de IGF-I para fomentar la cicatrización tendinosa, aprovechando sobre todo su actividad mitogénica sobre los tenocitos (Hsu y Chang, 2004). La aplicación exógena de IGF-I produjo un estímulo en la síntesis de ADN, colágeno y proteoglicanos, así como en la proliferación celular sobre un modelo experimental de tendones flexores en conejo (Abrahamsson et al., 1991). En un modelo experimental de tendinitis inducida por colagenasa, la inyección de IGF-I produjo una mejoría en la cicatrización tendinosa, tanto desde el punto de vista histológico como biomecánico (Dahlgren et al., 2002). Otro estudio demostró que una aplicación única perilesional de IGF-I en un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles redujo el déficit funcional y aceleró la recuperación funcional del tendón dañado, sin disminuir las propiedades biomecánicas

del mismo. Los autores proponen que IGF-I posee un cierto efecto antiinflamatorio a nivel del foco de cicatrización tendinosa (Kurtz et al., 1999).

c) Importancia del IGF en la cicatrización de otros tejidos

IGF es un mediador importante en todas las fases de la cicatrización de las heridas, particularmente durante los estadios inflamatorio y proliferativo (Gartner et al., 1992; Sciore et al., 1998). Los fibroblastos existentes en la herida sintetizan IGF-I, que ejerce un efecto autocrino sobre ellos mismos, de modo que en el fluido de la herida existen altas concentraciones de IGF-I (Kiritsy y Lynch, 1993). La aplicación tópica de IGF-I sobre un modelo experimental porcino de herida cutánea de espesor parcial produjo efectos mínimos sobre la cicatrización de la herida. Sin embargo, la combinación de IGF-I junto con PDGF-BB produjo un incremento significativo en la cicatrización cutánea (Lynch et al., 1989). Tanto IGF-I como IGF-II actúan de manera sinérgica con PDGF incrementando los procesos de cicatrización cutánea (Kiritsy y Lynch, 1993).

El mayor efecto de IGF sobre el hueso se produce a nivel del cartílago de la placa de crecimiento. La hormona de crecimiento (GH) controla el crecimiento longitudinal del hueso mediante el estímulo de la producción de IGF por parte de las células de cartílago, y este IGF posteriormente regula el metabolismo y el crecimiento condroblástico (Lind, 1996). Varios estudios han investigado el uso de IGFs para la estimulación de la cicatrización ósea in vivo y la formación de hueso, pero el éxito es limitado. Un estudio usó un modelo experimental de crecimiento óseo en cámara con la aplicación de IGF-I a nivel local, pero no encontró incremento en la formación de hueso (Aspenberg et al., 1989). Otro estudio usó una aplicación local continua de IGF-I sobre un modelo experimental de osteotomía, pero no se detectaron efectos beneficiosos (Kirkeby y Ekeland, 1992). Sin embargo, otros estudios experimentales en ratas han encontrado un incremento en la formación de hueso tras la administración sistémica de IGF-I (Spencer et al., 1991).

IGF-I es sintetizado por los condrocitos y se almacena en la matriz extracelular del cartílago (Gaissmaier et al., 2008). Es el factor de crecimiento del que mejor se conocen los efectos sobre la proliferación y desarrollo de los condrocitos del cartílago

de crecimiento (Takigawa et al., 1997). IGF-I favorece la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II, a la vez que inhibe la destrucción de matriz extracelular (Verschure et al., 1996; van Osch et al., 1998). Estudios *in vitro* pusieron de manifiesto que la aplicación de IGF-I sobre cultivos celulares de condrocitos produjo un aumento en la síntesis de proteoglicanos, que coincide con un aumento en la expresión de su receptor (Verschure et al., 1996).

4.3.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)

La familia FGF, también conocida como “factores de crecimiento ligados por heparina” (HBGF), está compuesta por un gran número de proteínas que van desde FGF-1 a FGF-23 (Olsen et al., 2003). FGF-1 ó factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), y FGF-2 ó factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) son los dos miembros más estudiados, y sus nombres hacen referencia a sus diferentes puntos isoeléctricos, siendo pH 5.6 y pH 9.6 respectivamente (Canalis, 1992; Bennett y Schultz, 1993; Lind, 1996). Tanto aFGF como bFGF poseen un peso molecular de alrededor de 17kDa, y el análisis bioquímico revela que ambos polipéptidos comparten un 55% de homología secuencial (Canalis, 1992). FGFs han sido aislados en el suero sanguíneo y en un gran número de tejidos tales como hipófisis, cerebro, retina, corteza adrenal, ovario y hueso (Canalis, 1992). Las células del endotelio vascular, los macrófagos y las plaquetas son las principales fuentes de bFGF (Kiritsy y Lynch, 1993).

Una importante característica de los miembros de la familia FGF es su capacidad de ser ligados por la heparina y el heparán-sulfato, de modo que en muchas ocasiones el análisis inmunohistoquímico de los tejidos en busca de bFGF revela la asociación de este factor de crecimiento al heparán-sulfato de la matriz extracelular y de la membrana basal (Bennett y Schultz, 1993). De este modo, la unión a la heparina y al heparán-sulfato puede proteger a bFGF de la degradación proteolítica. Esto implica que los componentes de la matriz extracelular que contengan heparina pueden regular la actividad de FGF actuando así lugares de almacenamiento y liberación de este factor de crecimiento (Bennett y Schultz, 1993).

Se han identificado al menos cuatro receptores para FGF, conocidos como FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 (Bennett y Schultz, 1993).

a) Funciones biológicas de FGF

La familia FGF posee una importante actividad mitogénica, quimiotáctica y angiogénica sobre una amplia variedad de estirpes celulares (Kiritsy y Lynch, 1993). Tanto aFGF como bFGF poseen un marcado efecto mitogénico sobre células de origen mesodérmico y neuroectodérmico (Bennett y Schultz, 1993; Lind, 1996), siendo bFGF más potente que aFGF (Canalis et al., 1991). FGFs poseen propiedades angiogénicas, lo cual es de vital importancia para los procesos de neovascularización durante la reparación-regeneración tisular (Lind, 1996).

b) Importancia del FGF en la cicatrización tendinosa

Con respecto a la reparación tendinosa, bFGF produce una estimulación en la proliferación de los fibroblastos del tendón (Hsu y Chang, 2004). Los niveles de bFGF están incrementados hasta durante 8 semanas tras el daño tendinoso, encontrándose en mayor concentración en los tenocitos del epitenon, y en las células inflamatorias y fibroblastos de la vaina tendinosa (Hsu y Chang, 2004). Estudios *in vivo* en un modelo experimental de daño tendinoso en rata mostraron que la aplicación de bFGF conducía a un incremento en la proliferación celular y en la síntesis de colágeno tipo III (Chan et al., 2000). Un estudio experimental llevado a cabo sobre un modelo de defecto en la banda craneomedial del ligamento cruzado craneal canino (zona de conocida baja capacidad de cicatrización) aplicando transportadores impregnados en bFGF mostró una rápida cicatrización de los defectos, con aparición de nuevo tejido de granulación (Kobayashi et al., 1997).

El bFGF está implicado en la respuesta proliferativa y angiogénica del tendón tras sufrir un daño, pero también fomenta la síntesis de colágeno, lo cual puede contribuir a la creación de adherencias que limiten el deslizamiento del tendón a través de su vaina (Hsu y Chang, 2004).

c) Importancia del FGF en la cicatrización de otros tejidos

FGFs parecen jugar un papel determinante en la cicatrización de las heridas. Estos factores de crecimiento estimulan la proliferación de la mayoría de los principales tipos celulares implicados en la cicatrización de las heridas, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo células del endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos, y algunos tipos celulares más especializados tales como condrocitos, osteoblastos o mioblastos. Además de esto, bFGF fomenta la migración de células al lugar de la lesión, induce neovascularización, y estimula la formación del tejido de granulación (Bennett y Schultz, 1993; Kiritsy y Lynch, 1993; Hsu y Chang, 2004). En un modelo experimental porcino de herida cutánea de espesor parcial, la administración exógena de bFGF, ya sea en una única dosis o en aplicaciones múltiples, produjo una aceleración en el ritmo de reepitelización (Hebda et al., 1990). Otro grupo de investigación demostró que la aplicación de bFGF sobre ese mismo modelo experimental produjo un aumento en el espesor de la epidermis (Lynch et al., 1989).

A nivel del tejido óseo, FGFs poseen principalmente un efecto proliferativo sobre los osteoblastos, y no tanto un efecto de estímulo para la síntesis de proteínas. Por tanto, estos factores de crecimiento incrementan la formación de hueso a través de un incremento en el número de células con capacidad osteogénica (Lind, 1996). Varios estudios experimentales *in vivo* han usado bFGF para estimular la formación de hueso y la cicatrización ósea. En uno de ellos se incorporó bFGF a matriz ósea desmineralizada y el conjunto se implantó intramuscular en ratas, conduciendo a un incremento en la formación de hueso (Aspenberg y Lohmander, 1989). En un modelo experimental de fractura en ratas, la cicatrización ósea se aceleró tras la administración de bFGF, produciéndose un incremento en la formación de callo, y en el contenido mineral del hueso (Lind, 1996).

Con respecto al cartílago, bFGF es capaz de promover la proliferación y diferenciación de condrocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Gaissmaier et al., 2008). En varios modelos experimentales de defecto de cartílago, la aplicación de bFGF aceleró la formación de cartílago sobre la superficie articular, mejorando las propiedades biomecánicas así como la formación de hueso subcondral (Chuma et al., 2004; Fukuda et al., 2005).

El bFGF ha sido usado con éxito en varios modelos experimentales, tanto para acelerar la cicatrización de úlceras duodenales (Szabo et al., 1994), así como para mejorar la circulación colateral y la función miocárdica tras un infarto (Hughes et al., 2004).

4.3.5. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

EGF ha sido uno de los factores de crecimiento más amplia y minuciosamente estudiados desde que se descubrió en 1962 en extractos de saliva de ratón (Kiritsy y Lynch, 1993). Se trata de un polipéptido con un peso molecular de 6.2kDa, que posee una estructura espacial compuesta por tres bucles mantenidos por tres puentes disulfuro. Esta estructura con tres bucles es fundamental para su actividad biológica, y diferencia estructuralmente a EGF de otros factores de crecimiento (Bennett y Schultz, 1993). Los niveles plasmáticos de EGF son prácticamente indetectables, pero en el interior de las plaquetas se pueden encontrar cantidades significativas de este factor de crecimiento (Pesonen et al., 1989). Los receptores para EGF se han detectado en diferentes estirpes celulares, y poseen un dominio con actividad tirosín-kinasa (Bennett y Schultz, 1993).

Las principales células diana de EGF son las células epiteliales, pero también puede actuar sobre otras células, incluyendo queratinocitos, fibroblastos, células de la glía, condrocitos y células de músculo liso (Kiritsy y Lynch, 1993).

a) Funciones biológicas de EGF

EGF posee un efecto estimulante de la mitogénesis, produciendo un incremento en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, tanto en fibroblastos como en células endoteliales. Al mismo tiempo parece estimular los procesos de neovascularización, la migración de células epiteliales, así como promover el crecimiento y diferenciación de queratinocitos (Kiritsy y Lynch, 1993; Lind, 1996).

b) Importancia del EGF en la cicatrización tendinosa

Tras un daño tendinoso, EGF desempeña un papel importante durante la fase temprana de cicatrización. Si bien EGF no se expresa en los tenocitos de la zona de reparación, sí que está presente en las células inflamatorias de los alrededores (Tsubone et al., 2004).

c) Importancia del EGF en la cicatrización de otros tejidos

El EGF liberado por las plaquetas actúa localmente durante las fases tempranas de la cicatrización de las heridas (Bennett y Schultz, 1993). Experimentos en animales han mostrado que el tratamiento con EGF incrementa los procesos de cicatrización en varios tipos de heridas. Este factor de crecimiento promueve la cicatrización de estas heridas a través de un estímulo en la migración y división de las células epiteliales (Bennett y Schultz, 1993). La histología de estas heridas tratadas con EGF muestra un incremento en el número de fibroblastos. Aunque EGF no induce la síntesis de ARNm para proteínas de la matriz extracelular, como por ejemplo colágeno, este factor de crecimiento presumiblemente incrementa el número de fibroblastos en el foco de reparación tisular mediante un efecto mitógeno y quimiotáctico, produciendo de esta manera una mayor producción de colágeno en conjunto (Bennett y Schultz, 1993). Estudios clínicos usando EGF han mostrado una aceleración en el ritmo de epitelización en heridas de espesor parcial, así como un incremento en la cicatrización de heridas crónicas (Brown et al., 1989; Brown et al., 1991).

Otros autores han estudiado los efectos de la aplicación local de EGF sobre lesiones corneales, donde el tratamiento con este factor de crecimiento ha producido un incremento en la proliferación del epitelio corneal (Kiritsy y Lynch, 1993).

Los efectos de EGF sobre cultivo de osteoblastos son muy discretos (Lind, 1996). En un estudio experimental se aplicó EGF por vía sistémica a ratones, y se observó un incremento en la formación de hueso perióstico y endóstico, así como un aumento en la actividad osteoblástica (Marie et al., 1990).

A nivel de los condrocitos, la aplicación de EGF produce un incremento en la síntesis de ADN (Ribault et al., 1997).

4.3.6. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

VEGF fue descubierto por primera vez a principios de los años 80, y se le llamó “vascular permeability factor”. Se trataba de una sustancia secretada por las células tumorales que incrementaba la permeabilidad de los vasos sanguíneos, y que clínicamente producía el acumulo de líquido ascítico (Senger et al., 1983).

Actualmente se conocen cinco isoformas de VEGF que se diferencian entre sí por el tamaño. Las diferentes isoformas están formadas por 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos, y de derivan a partir de diferentes cortes del ARNm de VEGF. Las isoformas predominantes son VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅, pero todas presentan unas funciones biológicas similares (Hsu y Chang, 2004).

Aunque el VEGF ha ganado importancia a partir del papel que desempeña en las angiogénesis tumoral, este factor de crecimiento no sólo es producido por las células neoplásicas. Son numerosas las estirpes celulares que secretan VEGF, y entre ellas cabe destacar a plaquetas, neutrófilos, células del endotelio vascular, queratinocitos, tenocitos y astrocitos (Hsu y Chang, 2004).

La actividad biológica de VEGF está mediada por la unión y activación de sus receptores (VEGFR). Se conocen tres isoformas de estos receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Estos receptores se expresan predominantemente en células endoteliales (Hsu y Chang, 2004).

a) Funciones biológicas de VEGF

VEGF juega un papel preponderante en el desarrollo embriológico del sistema cardiovascular, en la angiogénesis de la retina y en otros procesos que requieren fases de neovascularización (Hsu y Chang, 2004). Además de participar en los procesos normales de angiogénesis, VEGF está implicado en los estados de angiogénesis patológicos, tales como el crecimiento tumoral (Kim et al., 1993).

Tras la unión a los receptores correspondientes, VEGF induce la síntesis de enzimas tales como colagenasa y gelatinasa, las cuales ayudan a romper la membrana basal vascular (uno de los primeros pasos en los procesos de angiogénesis). Además de esto, también induce la expresión de α -integrinas (fundamentales en los procesos de neovascularización), y acaba provocando una vasodilatación y un aumento en la permeabilidad vascular, así como en la migración de células endoteliales y monocitos (Hsu y Chang, 2004).

VEGF, al igual que el resto de factores de crecimiento, es fundamental en los procesos de reparación-regeneración tisular. Si bien VEGF desempeña un papel importante en las fases precoces de migración y proliferación celular, es un factor de crecimiento más activo tras el proceso inflamatorio, siendo más determinante en las fases proliferativas y de remodelado, donde se muestra como un potente agente estimulante de la angiogénesis (Molloy et al., 2003).

b) Importancia del VEGF en la cicatrización tendinosa

VEGF ha sido detectado en fibroblastos sinoviales y en tenocitos, y parece ser que juega un papel importante en la angiogénesis del tendón. Además, sus receptores (VEGFR-1) están presentes en la microvasculatura tendinosa (Hsu y Chang, 2004). Los niveles de VEGF son insignificantes en el tendón de Aquiles intacto, sin embargo sus niveles se incrementan tras la ruptura tendinosa (Pufe et al., 2001).

Un incremento en los niveles de VEGF dentro del lugar de la lesión se correlaciona con un patrón de crecimiento vascular bien definido desde los vasos sanguíneos de la periferia del tendón hacia el foco de lesión. Esta neovascularización proviene de la superficie del epitenon y proporciona células extrínsecas, nutrientes y factores de crecimiento en el área lesionada (Molloy et al., 2003).

Un estudio sobre un modelo experimental de ruptura del tendón de Aquiles en rata mostró un aumento en la fuerza tensil de los tendones que habían sido tratados con inyección perilesional de VEGF en comparación con los controles no inyectados (Zhang et al., 2003). El mecanismo terapéutico más plausible merced al cual el VEGF promueve la cicatrización tendinosa es mediante un aceleramiento en los procesos de angiogénesis (Hsu y Chang, 2004).

c) Importancia del VEGF en la cicatrización de otros tejidos

VEGF juega un importante papel en la cicatrización de las heridas, en las cuales inicia los procesos de angiogénesis en el tejido de granulación (Hsu y Chang, 2004). Administrado de manera tópica, VEGF ha mostrado mejorar la cicatrización en heridas isquémicas (Corral et al., 1999).

VEGF es de vital importancia para la formación del hueso endocondral, de modo que su ausencia se relaciona con defectos en el crecimiento esquelético (Nimni, 1997).

VEGF parece ser importante en el cartílago de la placa de crecimiento, donde mantiene la formación de hueso subcondral (Gaissmaier et al., 2008).

4.3.7. Factor de Crecimiento Neurotrófico (NGF)

NGF pertenece a la familia de las neurotrofinas, y desde su descubrimiento destacó por ser una sustancia capaz de regular el crecimiento y diferenciación del tejido nervioso durante el desarrollo embrionario (Nico et al., 2008). Además de ejercer sus efectos sobre las células nerviosas, NGF posee efectos sobre otras estirpes celulares, tales como células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, mastocitos), o como fibroblastos y células endoteliales, todas ellas partícipes importantes en los procesos de reparación-regeneración tisular (Kawamoto y Matsuda, 2004). Se trata de una molécula que posee tres subunidades (α , β , γ). Al parecer la bioactividad de NGF reside en la subunidad β , que posee un peso molecular de 26.5 KDa (Nimni, 1997).

NGF es capaz de estimular la migración y la proliferación de las células endoteliales, remodelar la matriz extracelular y promover la maduración de los vasos sanguíneos neoformados. Además juega un papel crucial en la angiogénesis de varios procesos patológicos tales como determinadas enfermedades cardiovasculares y neoplásicas (Nico et al., 2008).

En la piel, NGF es producido por varios tipos celulares residentes tales como fibroblastos, queratinocitos y mastocitos. Estudios experimentales sobre un modelo experimental de defecto cutáneo en ratón han demostrado que la aplicación tópica de

NGF acelera la cicatrización, tanto en animales normales como en aquellos en los que la cicatrización está comprometida (diabéticos) (Kawamoto y Matsuda, 2004). NGF tiene un amplio rango de actividades biológicas que contribuyen a la aceleración de los procesos de cicatrización mediante la modulación de las fases de inflamación, migración, reepitelización, granulación, angiogénesis y de remodelación tisular (Kawamoto y Matsuda, 2004).

El papel de NGF en la formación de hueso tras fractura ósea ha sido investigada en un modelo experimental sobre conejo, y se ha observado un incremento en la expresión de dicho factor de crecimiento durante el proceso de cicatrización ósea (Kawamoto y Matsuda, 2004). En el cartílago en desarrollo, NGF produce un aumento tanto de la síntesis de ADN como de glucosaminoglucanos (Kawamura y Urist, 1988).

En los tenocitos humanos se ha identificado la presencia de neurotrofinas tales como NGF (Bagge et al., 2009); pero no se dispone de información acerca de la actividad que este factor de crecimiento ejerce sobre los procesos de reparación tendinosa.

4.3.8. Factor de Crecimiento Hepatocítico (HGF)

HGF es un factor de crecimiento multifuncional secretado por determinadas células mesenquimales tras un daño tisular (Nayeri et al., 2005). Los gránulos alfa plaquetarios también contienen en su interior HGF (Anitua et al., 2005). Se trata de una proteína con propiedades mitogénicas para células endoteliales, además de estimular la migración celular. Este péptido posee un intenso efecto angiogénico debido a que incrementa la expresión de VEGF. Tanto HGF como VEGF muestran una acción sinérgica sobre las células endoteliales, respuesta más acentuada que con cualquiera de los dos factores de crecimiento por separado (Anitua et al., 2005).

Ciertos grupos de investigación han estudiado la aplicación de HGF para el tratamiento de úlceras crónicas en las extremidades (Nayeri et al., 2005). Al parecer, la neutralización de HGF en heridas cutáneas disminuye a neovascularización y la formación de tejido de granulación en el lecho de la herida (Yoshida et al., 2003). HGF no ha sido estudiado en los modelos experimentales de reparación tendinosa.

4.4. Metodología para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Es necesario remontarse hasta 1997 para encontrar la primera referencia bibliográfica que describe el empleo de un concentrado autólogo de plaquetas con la finalidad de promover los procesos de cicatrización tisular (Whitman et al., 1997). Previamente, en 1994, Tayapongsak y colaboradores habían publicado unos resultados muy esperanzadores tras el uso de un pegamento de fibrina autólogo en pacientes sometidos a reconstrucción ósea maxilofacial (Tayapongsak et al., 1994). Estudios posteriores evidenciaron que esa red de fibrina autóloga, además de poseer efectos osteoinductivos y servir para compactar y facilitar la manipulación del injerto de hueso, atesoraba una interesante fuente de factores de crecimiento que podrían suponer una interesante herramienta terapéutica para promover los procesos de cicatrización (Anitua, 1999).

Whitman y colaboradores (1997) encontraron en los que ellos denominaron “gel de plaquetas” una alternativa al pegamento de fibrina que hasta entonces se empleaba en determinados procedimientos quirúrgicos, sobre todo en el campo de la cirugía oral y maxilofacial. El pegamento de fibrina es un biomaterial que mimetiza la última fase de la coagulación sanguínea en el lugar sobre el cual se aplica, es decir, la conversión de fibrinógeno en fibrina; y por tanto permite la adhesión de superficies tisulares, hemostasis y fomento de los procesos de cicatrización (Matras, 1985). El pegamento de fibrina es una mezcla de dos componentes; por un lado un concentrado de fibrinógeno, factor XIII (factor estabilizante de la fibrina) y fibronectina; y por otro se añade trombina, cloruro de calcio y un inhibidor de la fibrinolisis, lo que acaba formando el tapón de fibrina (Matras, 1985). En Europa se han comercializado pegamentos de fibrina, pero éstos nunca han llegado a ser aprobados por la FDA debido a los riesgos que existían de transmisión de enfermedades virales (Whitman et al., 1997). El riesgo biológico reside fundamentalmente en la fuente de fibrinógeno, de modo que la investigación ha conducido al desarrollo de numerosas técnicas para el preparado de pegamento de fibrina a partir de una fuente de fibrinógeno autóloga (Tayapongsak et al.,

1994). Pero conseguir un pegamento de fibrina autólogo era un proceso caro y poco práctico, ya que requería una donación previa 3 semanas antes, y el crioprecipitado de fibrinógeno obtenido debía de ser descongelado el día de la cirugía (Whitman et al., 1997). Una de las principales ventajas que presenta el “gel de plaquetas” frente al pegamento de fibrina, además de la facilidad en el proceso de obtención, es que aporta una interesante fuente de factores de crecimiento que son liberados por las plaquetas tras su activación (Whitman et al., 1997). Es precisamente en este último concepto sobre el cual descansa toda la teoría de la aplicación del PRP.

4.4.1. Obtención de PRP mediante sistemas de aféresis

La metodología para conseguir el plasma rico en plaquetas (PRP) ha evolucionado desde que se publicaron los primeros trabajos de Whitman y colaboradores en 1997, y de Marx y colaboradores en 1998. Estos autores usaban un equipo de aféresis (ElectroMedic-500 Autotransfusion System, Medtronic, Parker, CO, USA) para separar el PRP del resto de componentes sanguíneos (Whitman et al., 1997; Marx et al., 1998). De esta manera consiguieron preparar el PRP autólogo a partir de 450 ml de sangre extraída del propio paciente en el área de quirófano, en una bolsa que contenía como anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa. La sangre era procesada en un aparato de aféresis en el propio quirófano. Este aparato separaba la sangre en sus tres componentes básicos según las diferentes densidades: por un lado plasma pobre en plaquetas (PPP), por otro lado capa leucocitaria (que contiene los leucocitos y parte de las plaquetas), y por otro eritrocitos. Para conseguir esto, la sangre se sometía a una primera centrifugación a 5600 rpm. Las diferentes densidades de los componentes sanguíneos hacen que los eritrocitos permanezcan en el nivel más bajo, la capa leucocitaria en un nivel intermedio, y el PPP en lo más alto. Una vez que se retiraba el PPP, los restantes componentes se sometían a una segunda centrifugación a menor velocidad (2400 rpm) para conseguir una separación más precisa entre capa leucocitaria y eritrocitos. Tras esta segunda centrifugación se obtenía un volumen de plasma en el cual estaba concentrada la capa leucocitaria y las plaquetas. A esta fracción se le consideró como PRP. Estos autores activaban las plaquetas mediante la adición de una mezcla de cloruro cálcico 10% y trombina bovina. El resto de los componentes sanguíneos se podían retornar al paciente si se estimaba oportuno. El recuento

plaquetario medio del PRP obtenido mediante este método era de 750.000/ μ L aproximadamente (Whitman et al., 1997; Marx et al., 1998). Otros autores, usando igualmente PRP obtenido mediante aféresis, obtuvieron unas concentraciones plaquetarias más elevadas (1.250.000 – 1.500.000/ μ L (Zimmermann et al., 2001; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003). El contenido leucocitario del PRP obtenido según esta metodología es muy bajo 160-180/ μ L (Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003). La concentración de factores de crecimiento en las muestras de PRP obtenido mediante aféresis ha sido estudiada. Los niveles de PDGF-AB rondan entre 125-190 ng/mL, los de TGF- β 1 entre 133-268 ng/mL, y los de IGF-I se mantienen en torno a 85 ng/mL (Zimmermann et al., 2001; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003).

El sistema de preparación de PRP mediante equipos de aféresis requiere alta tecnología y personal cualificado, lo que se traduce en mayores gastos de producción, si se compara con otros sistemas de obtención de PRP. Esta metodología no resulta práctica en pequeñas clínicas. Además, para la obtención del concentrado plaquetario se requiere la extracción de un gran volumen de sangre (> 450 mL), lo cual puede producir riesgos para la salud de determinados pacientes (Westphal, 1984). La principal ventaja que aportan los sistemas de aféresis a la hora de obtener PRP es que existe un riesgo muy bajo de contaminación bacteriana de la muestra durante todo el procesado (Vasconcelos et al., 2003).

4.4.2. Obtención de PRP mediante sistema de centrifugación simple en tubo: PRGF System[®] (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)

Anitua, en 1999, describió un método mucho más simple, rápido, económico y práctico para conseguir una preparación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). Tan sólo usaba de 10 a 20 ml de la propia sangre del paciente, que era extraída en el propio quirófano en tubos de 5 ml que contenían como anticoagulante citrato sódico al 3.8%. A continuación los tubos eran centrifugados a 460G durante 8 minutos. Tras la centrifugación, la sangre de los tubos quedaba separada en tres fases: los eritrocitos, que quedaban en el fondo del tubo; el PRGF, que quedaba en el medio del tubo; y plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF), que quedaba en la parte

superior del tubo. De cada uno de los tubos de 5 ml se descartaba el mililitro más superficial (que sólo contenía un 15% de la concentración de plaquetas de la sangre entera). El plasma restante, sin incluir ni el “buffy coat” ni eritrocitos, era aspirado. Esta fracción era el PRGF, y las plaquetas contenidas en este aspirado se activaban usando para ello cloruro de calcio al 10% (Anitua, 1999).

El propio Anitua diseñó un protocolo mucho más refinado para la obtención de PRGF, basándose en el método manual de aspiración en tubos que previamente describió él mismo (Anitua, 1999).

Se trata de una metodología diseñada por Dr. Anitua y su colaboradores en el instituto de biotecnología que él mismo dirige (<http://bti-biotechnologyinstitute.com/es>). Esta metodología permite la obtención de PRGF y fibrina autóloga, a partir de una pequeña muestra de sangre del paciente, y siguiendo un determinado protocolo de centrifugación y aspiración manual en tubos de ensayo, que previamente publicó el propio Dr. Anitua (Anitua, 1999).

Es un sistema que nos permite obtener PRGF, autólogo, con mínimos volúmenes de sangre (a partir de 5 ml de sangre). Se puede preparar ambulatoriamente de forma sencilla y reproducible. La obtención del preparado es rápida (20-25 minutos). Presenta un nulo efecto antigénico (es la única técnica descrita en la que no se precisa la utilización de trombina bovina), y además es la única técnica descrita que permite la obtención exclusiva de plaquetas, excluyendo los leucocitos.

El PRGF System[®] está compuesto por los siguientes componentes: una centrífuga de laboratorio modificada con un rotor oscilante; tubos de extracción de sangre de vidrio de 5.0 ml, con 0.5 ml de citrato sódico al 3.8% como anticoagulante y que se llenan con 4.5 ml de sangre; tubos de extracción de sangre de vidrio de 5.0 ml sin anticoagulante; pipetas de volumen variable de 100-1000 µl y de 20-200 µl; puntas de pipeta desechables de 100 µL y de 500 µL con filtro (Fig. 8).



Fig. 8. Material necesario para la preparación de PRGF, según la metodología BTI Biotechnology Institute: centrífuga modificada, tubos de extracción, micropipetas y puntas de aspiración.

Para aislar el PRGF, se llenan 4 tubos citratados de 5.0 ml con sangre del propio paciente, y se centrifugan a 460G durante 8 minutos. Tras la centrifugación se obtienen tres capas con los diferentes componentes sanguíneos (de superficie a profundidad): plasma (que contiene la mayor parte de sus plaquetas en la zona más cercana a la capa leucocitaria), capa leucocitaria (compuesto principalmente por leucocitos y un cuarto de las plaquetas aproximadamente), y eritrocitos (que contiene las plaquetas más inmaduras en la parte superior) (Weibrich et al., 2005).

A continuación se pasa a la fase de pipeteado, que debe de ser llevada a cabo en una cámara de flujo laminar, para así evitar la contaminación microbiológica del PRGF. Se destapa el tubo centrifugado con cuidado de no mezclar las diferentes fases, y se desecha 1 ml del plasma más superficial. Para ello se emplea un pipeteado cuidadoso y preciso, evitando en todo momento crear turbulencias, y aspirando siempre desde la superficie. Los 500 μ l de plasma situados inmediatamente por encima de la capa leucocitaria son el PRGF, y debe ser aspirado con un pipeteo cuidadoso y preciso, para

evitar tanto la creación de turbulencias como el aspirado inadvertido de la capa leucocitaria o de eritrocitos. El PRGF de cada uno de los tubos es transferido hasta el tubo sin anticoagulante (Fig. 9).



Fig. 9. Proceso de pipeteo fraccionado para el aislamiento del PRGF.

La técnica de obtención de PRGF descrita por Anitua es mucho más práctica y barata que las técnicas de aféresis, pero requiere unas estrictas medidas de asepsia durante todo el proceso de manipulación y aislamiento del PRGF para garantizar así la seguridad biológica del producto final y evitar la contaminación bacteriana (Vasconcelos et al., 2003).

Todos los componentes del sistema PRGF[®] Technology han obtenido la certificación CE de las autoridades sanitarias europeas, y por lo tanto PRGF System[®] es un sistema autorizado en Europa para la obtención de factores de crecimiento

plasmáticos y su aplicación en diversas especialidades médicas (<http://bti-biotechnologyinstitute.com/es>).

Esta técnica de obtención de PRP concentra un menor número de plaquetas (500.000/ μ L), y una cantidad de leucocitos prácticamente despreciable (65/ μ L), si se compara con el método de aféresis o con los dispositivos semiautomáticos (Weibrich et al., 2005). Igualmente también concentra menor número de factores de crecimiento: PDGF-AB = 47.0 ng/mL; TGF- β 1 = 73.3 ng/mL; IGF-I = 78 ng/mL (Weibrich et al., 2005). Algunos autores han propuesto que la capacidad para mejorar los procesos de cicatrización tisular del PRP es directamente proporcional a su concentración plaquetaria (Marx, 2004). Sin embargo, la aplicación de preparados plaquetarios obtenidos mediante distintas metodologías, y con diferentes concentraciones tanto plaquetarias como de factores de crecimiento han logrado resultados clínicos igualmente satisfactorios (Marx et al., 1998; Anitua, 1999; Carlson y Roach, 2002; Anitua et al., 2004).

4.4.3. Obtención de PRP mediante sistemas de doble centrifugación en tubo

4.4.3.1. Método de Landesberg

En el año 2000, Landesberg y colaboradores proponen un protocolo manual rápido y simple para la obtención de PRP, usando material básico de laboratorio y sometiendo la sangre a una doble centrifugación. La sangre se extrae del paciente en tubos de 5 mL con citrato sódico como anticoagulante. Estos autores estudiaron el efecto de la velocidad de la centrifugación y el tiempo de centrifugación con relación a la capacidad de extracción de plaquetas, y recomiendan que la primera centrifugación se lleve a cabo a 200G durante 10 minutos. Tras esta primera centrifugación, el plasma sobrenadante se recoge y se deposita en un tubo sin anticoagulante, y este segundo tubo se somete a otra centrifugación, también a 200G durante 10 minutos. Tras la segunda centrifugación, en el fondo del tubo quedará un sedimento plaquetario, que tras ser resuspendido en un volumen determinado de plasma residual, constituirá el PRP (Landesberg et al., 2000).

El PRP obtenido según este protocolo fue analizado, y se determinó que la concentración plaquetaria alcanzaba unos valores de entre 550.000 – 900.000/ μ L. La concentración de PDGF-AB resultó ser de 39.8 ng/mL, y la de TGF- β 1 de 42 ng/mL (Landesberg et al., 2000).

4.4.3.2. Curasan PRP[®] Kit (Fa.Curasan, Kleinostheim, Germany)

En el método Curasan PRP[®], la sangre es extraída directamente en unos tubos de ensayo con émbolo, comercializados con el nombre Monovette (Sarstedt[®]). Estos tubos permiten extraer la sangre haciendo succión con el émbolo, o bien usando el propio vacío del tubo. Además permiten la centrifugación sin necesidad de transferir la sangre a otro tubo de ensayo. Los tubos empleados para la extracción son de 8.5 mL y contienen citrato sódico como anticoagulante. Este método emplea una centrífuga estándar de laboratorio (Fig. 10) (Weibrich et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002).



Fig. 10. Curasan PRP[®] Kit para la preparación de PRP.

Una vez extraída la sangre, se somete a centrifugación durante 10 minutos a 2400 rpm. Esto producirá un fraccionamiento de la sangre en plasma, capa leucocitaria y eritrocitos. A continuación, el plasma sobrenadante (que contendrá las plaquetas) es transferido a otro Monovette, usando para ello una aguja larga y una conexión de entrada. Este plasma es centrifugado de nuevo a 3600 rpm durante 15 minutos, con la intención de crear un sedimento que contenga las plaquetas. Una vez finalizada esta segunda centrifugación, el plasma sobrenadante (PPP) es eliminado del tubo hasta dejar aproximadamente 0.5 mL. Este volumen de plasma se usará para resuspender el

sedimento de plaquetas. La suspensión resultante es el PRP (Weibrich et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002).

El PRP obtenido con el Curasan PRP[®] Kit consigue una elevada concentración plaquetaria (1.000.000 – 2.500.000/ μ L) y una concentración leucocitaria entre 14.800 - 33.100/ μ L. Los niveles de PDGF-AB en el PRP obtenido mediante Curasan PRP[®] Kit son de 233.7 - 314.1 ng/mL, la concentración de TGF- β 1 de 79.7 a 499.8 ng/mL, y la de IGF-I es de 69.5 a 101.7 ng/mL (Appel et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003).

La concentración de factores de crecimiento del PRP preparado según diferentes metodologías (PRGF[®] System - PCCS[®] Kit – Curasan PRP[®] Kit) ha sido determinada en varios estudios llevados a cabo por Weibrich y colaboradores (2002). Además de determinar la concentración de los principales factores de crecimiento (PDGF-AB; TGF- β 1; IGF-I), se intentó correlacionar el recuento plaquetario y/o leucocitario del PRP con la concentración de factores de crecimiento. El PRP elaborado según el método de Anitua (PRGF[®] System) presenta una moderada concentración plaquetaria y consigue excluir la presencia de leucocitos. De los tres métodos para obtener PRP analizados es el que consigue menores concentraciones tanto de PDGF-AB como de TGF- β 1. De los tres sistemas de obtención de PRP estudiados por Weibrich y colaboradores (2002), PCCS[®] Kit consiguió la mayor concentración plaquetaria, además de una concentración leucocitaria superior a la concentración leucocitaria de la sangre entera. Tanto los niveles de PDGF-AB como los de TGF- β 1 fueron significativamente superiores en el PRP obtenido con PCCS[®] Kit si se compara con el PRP obtenido con PRGF[®] System. El PRP obtenido con el Curasan PRP[®] Kit consigue una elevada concentración plaquetaria y la mayor concentración leucocitaria de los métodos estudiados. Los niveles de PDGF-AB en el PRP obtenido mediante Curasan PRP[®] Kit son los más elevados, y la concentración de TGF- β 1 es superior a la conseguida con el método de Anitua, pero inferior a la que proporciona PCCS[®] Kit. La concentración de IGF-I es muy similar en las tres metodologías de obtención de PRP estudiadas (Weibrich et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich et al., 2005). Los autores de esta serie de estudios proponen que las diferencias existentes en la concentración de PDGF-AB y TGF- β 1 entre los diferentes preparados plaquetarios pueden ser un reflejo del contenido celular del PRP. De esta manera, el PRP obtenido con PCCS[®] Kit, que contiene mayor concentración en plaquetas, resulta ser el que

mayor concentración en TGF- β 1 posee; mientras que el PRP obtenido con Curasan PRP[®] Kit, que posee los más altos niveles leucocitarios, también resulta ser el que contiene los niveles más elevados de PDGF-AB. Esto sugiere un origen fundamentalmente leucocitario de PDGF-AB, y un origen principalmente plaquetario de TGF- β 1. Los niveles similares de IGF-I en los tres preparados sugiere un origen común, como puede ser el propio plasma sanguíneo (Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2005). Si comparamos el estudio de Appel y colaboradores (2002) con los estudios de Weibrich y colaboradores (2002), a pesar de usar la misma metodología para la obtención de PRP (Curasan PRP[®] Kit), existen importantes diferencias en los resultados obtenidos en la determinación de la concentración plaquetaria y concentración de factores de crecimiento del PRP.

4.4.3.3. Friadent-Schütze PRP[®] Kit (Friadent-Schütze, Vienna, Austria)

Friadent-Schütze PRP[®] Kit es muy similar a Curasan PRP[®] Kit. Ambos sistemas usan los mismos elementos consumibles (jeringas, agujas) y emplean igualmente una centrífuga estándar de laboratorio. Incluso el protocolo de procesado de la sangre para la obtención del PRP es idéntico. La principal diferencia reside en que Friadent-Schütze PRP[®] Kit emplea tubos de ensayo de vidrio siliconados en su cara interna, mientras que Curasan PRP[®] Kit usa tubos Monovette (Sarstedt[®]). La eficiencia de extracción plaquetaria de Friadent-Schütze PRP[®] Kit es cercana al 50%, mientras que en el caso de Curasan PRP[®] Kit no alcanza el 18%. Esta diferencia se debe a que las plaquetas se adhieren a la cara interna de los tubos Monovette durante el procesado de la muestra, y por tanto no pueden ser aisladas en el PRP. Este fenómeno parece ser minimizado con el empleo de los tubos de ensayo de vidrio siliconados que emplea Friadent-Schütze PRP[®] Kit (Weibrich et al., 2003).

Friadent-Schütze PRP[®] Kit emplea 8.5 mL de sangre con anticoagulante (ACD) en tubos de ensayo de vidrio con la cara interna siliconada (8.5 mL ACD vacutainer, Becton-Dickinson). Estos tubos son centrifugados a 2400 rpm durante 10 minutos. El plasma sobrenadante se aspira usando para ello la cánula de un tubo Monovette (Sarstedt[®]). A continuación, el plasma aspirado se somete a una segunda centrifugación a 3600 rpm durante 15 minutos. Con esto se consigue concentrar la mayor parte de las plaquetas en el sedimento de estos segundos tubos. El PPP sobrenadante se aspira, hasta

dejar un volumen residual de aproximadamente 0.8 mL, que será empleado para resuspender el sedimento plaquetario, y así obtener el PRP (Weibrich et al., 2003) (Fig. 7).

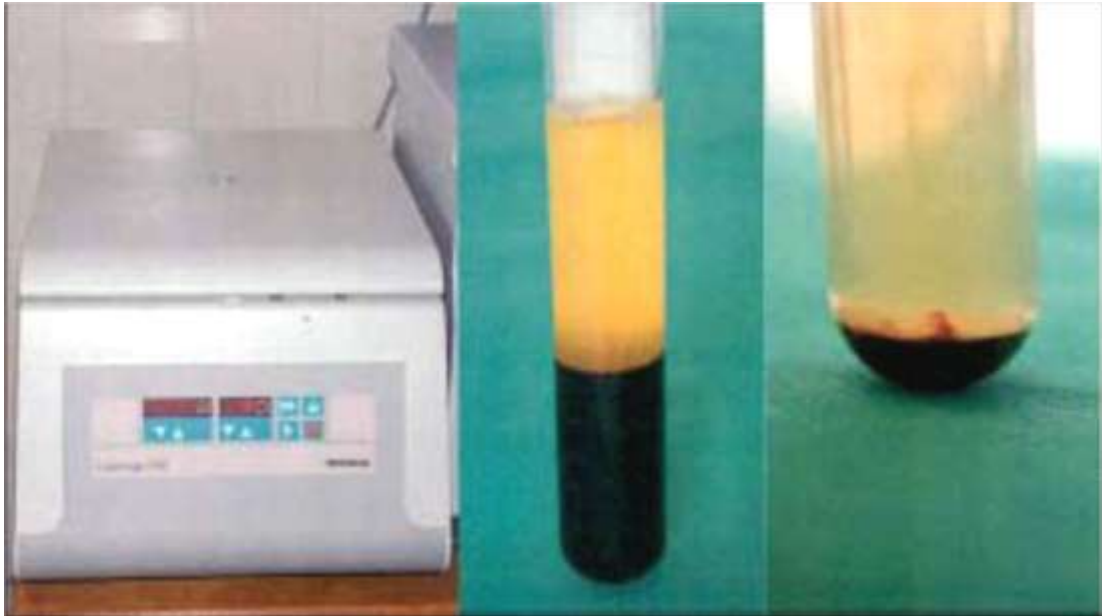


Fig. 11. Friadent-Schütze PRP Kit

El PRP obtenido mediante Friadent-Schütze PRP[®] Kit presenta una concentración plaquetaria de 1.440.000 plaquetas/ μ L, y una concentración leucocitaria de 21.700 leucocitos/ μ L. El tiempo requerido para el procesado de la sangre es de aproximadamente 40 minutos. Las concentraciones de los principales factores de crecimiento han sido determinadas en el PRP obtenido por esta metodología, y son las siguientes: PDGF-AB, 251.6 ng/mL; TGF- β 1, 196.8 ng/mL; y IGF-I, 72.8 ng/mL (Weibrich et al., 2003).

Weibrich y colaboradores (2003) compararon la preparación de PRP mediante Smart PRP[®] PRP System y mediante Friadent-Schütze PRP[®] Kit, y concluyeron que el primero de ellos era más adecuado desde el punto de vista clínico. Entre las principales ventajas que destacaron estos autores cabe resaltar su fácil manejo, rápido procesado de la sangre, se minimiza el riesgo de contaminación bacteriana del PRP y se consiguen unos mejores valores de eficiencia de extracción plaquetaria (Weibrich et al., 2003).

4.4.4. Obtención de PRP mediante sistemas semiautomáticos comerciales

Tras la aparición del método de obtención de PRGF descrito por Anitua, en el mercado han aparecido varios dispositivos comerciales semiautomáticos que permiten la obtención de un concentrado plaquetario de manera rápida y cómoda, que se puede llevar a cabo en el propio quirófano con un volumen de sangre relativamente pequeño. Estos sistemas se basan en el aislamiento de la capa leucocitaria y de las plaquetas existentes en torno a ella. Para ello, la mayoría de estos sistemas someten a la sangre a una doble centrifugación tras la cual se obtiene un volumen de plasma en el que se concentran la mayor parte de las plaquetas contenidas en la muestra de sangre procesada.

El riesgo de contaminación bacteriana del PRP con estos dispositivos es menor que con el método de obtención de PRP mediante centrifugación en tubo de ensayo (Vasconcelos et al., 2003). Estos sistemas permiten la obtención de un PRP que contiene unas elevadas concentraciones tanto plaquetarias como leucocitarias, así como de factores de crecimiento (Zimmermann et al., 2001; Appel et al., 2002; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003 (a); Weibrich et al., 2003 (b); Zimmermann et al., 2003; Eppley et al., 2004). Algunos autores sostienen que la presencia de leucocitos en el concentrado plaquetario puede ir en contra de los procesos de reparación-regeneración en ciertos tejidos (Anitua et al., 2004). El papel exacto que juegan los leucocitos contenidos en el PRP empleado en los tratamientos de reparación-regeneración tisular aún está por determinar.

A continuación pasaremos a comentar los principales dispositivos semi-automáticos comerciales para la obtención de PRP:

4.4.4.1. Platelet Concentrate Collection System (PCCS[®] Kit)

(3i – Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA)

El PCCS[®] Kit está compuesto por una centrífuga modificada que posee un rotor oscilante con cuatro pocillos especialmente diseñados para poder insertar en ellos los consumibles del PCCS[®] Set. Estos consumibles son unos dispositivos formados por dos

bolsas plásticas flexibles interconectadas por una línea con un clamp, y unidas a un soporte plástico rígido. Además, el PCCS[®] Set contiene una ampolla con 6 ml de anticoagulante (ACD-A), dos jeringas de 60 ml (una para la extracción de la sangre y otra para transferir el sobrenadante entre bolsas, una jeringa de 10 ml para extraer el PRP, y un equipo para la punción venosa y la extracción de sangre (Weibrich et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002) (Fig. 12).



Fig. 12. Platelet Concentrate Collection System (PCCS[®] Kit).

Para preparar el PRP según el método PCCS[®] es necesario extraer 60 ml de sangre entera con anticoagulante (ACD-A). Esta sangre se transfiere a la bolsa de plástico del dispositivo consumible a través de la válvula número 1, y se cierra el clamp de la línea de comunicación entre ambas bolsas. La centrífuga se equilibra, y la sangre se centrifuga durante 3 minutos y 45 segundos a 3000 rpm. Para transferir el plasma sobrenadante (que contiene las plaquetas) hacia la segunda bolsa del dispositivo consumible, se abre el clamp y se inyecta aire a través de la válvula número 2 hasta que 1 ml de eritrocitos han pasado a través de la línea de transferencia. Se cierra de nuevo el clamp, y el conjunto se somete a una segunda centrifugación durante 13 minutos a 3000 rpm, con la idea de sedimentar las plaquetas en la segunda bolsa. Mediante la inyección

de de aire a través de la válvula número 3, y tras abrir nuevamente el clamp, conseguimos pasar el plasma sobrenadante (PPP) hacia la primera bolsa. En la segunda bolsa dejamos el sedimento de plaquetas y aproximadamente 5 ml de plasma. Las plaquetas son resuspendidas en el plasma residual mediante un suave masaje del sedimento plaquetario entre los dedos pulgar e índice durante unos 3 minutos. A esta suspensión es a lo que se le denomina PRP, y es transferido a una jeringa a través de la válvula número 4 (Appel et al., 2002; Weibrich et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002) (Fig. 12).

El procesado de la sangre hasta la obtención del PRP empleando PCCS[®] Kit requiere aproximadamente 30 minutos, y permite una concentración plaquetaria de entre 1.100.000 – 2.200.000/ μ L, con una eficiencia de extracción plaquetaria aproximadamente el 50%. El producto final presenta una concentración leucocitaria entre 5.500- 14.800/ μ L. Con respecto a la concentración de los factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido con PCCS[®] Kit, los niveles de PDGF-AB se mantuvieron entre 156.7 – 251.8 ng/mL, los de TGF- β 1 entre 144.7 – 467.1 ng/mL, y los de IGF-I entre 78 y 91 ng/mL (Appel et al., 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2005).

4.4.4.2. Gravitational Platelet Separation (GPS[®] System)

(Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany)

El GPS[®] System consiste en una centrífuga de sobremesa y unos tubos de centrifugado especiales de un solo uso. La preparación del PRP por esta metodología puede ser llevada a cabo en el propio quirófano, y tarda aproximadamente 30 minutos. En primer lugar se aspiran 6 mL de anticoagulante (ACD-A) en una jeringa de 60 mL, y posteriormente se extraen 54 mL de sangre del paciente, hasta completar la jeringa. La sangre con el anticoagulante se vierte en los tubos GPS[®], y se centrifugan a 3200 rpm durante 12 minutos. Tras la centrifugación, la sangre queda separada en sus diferentes fracciones de modo que los eritrocitos quedarán en la parte inferior del tubo, y sobre ellos se situará una boya de separación. A continuación se dispondrá la capa leucocitaria (que contendrá leucocitos y la mayor parte de plaquetas), y más en superficie quedará el PPP (Fig. 13A). En un siguiente paso, un émbolo es empujado manualmente hacia abajo hasta que separe el PPP del PRP. Usando una jeringa, y a través de una conexión

existente en un lateral de la parte superior del tubo, se extrae el PPP (Fig. 13B). A continuación se agita el tubo, y se aspira el PRP a través de una conexión existente en el centro de la tapa del tubo (Marlovits et al., 2004; Saleh y Cox, 2004) (Fig. 13C).



Fig. 13. Gravitational Platelet Separation (GPS® System)

El GPS® System permite conseguir un PRP con una concentración plaquetaria de aproximadamente $1.600.00/\mu\text{L}$. Además, incrementa el recuento de células blancas en el PRP, hasta conseguir unos niveles leucocitarios en torno a $31.100/\mu\text{L}$. Las concentraciones de factores de crecimiento en el PRP obtenido mediante GPS® System son superiores a las presentes en el plasma sanguíneo para todos los factores estudiados excepto para IGF-I. En el caso de TGF- β 1 se obtienen valores de 120 ng/mL , 72 ng/mL para IGF-I, 955 pg/mL para VEGF, y 470 pg/mL para EGF (Eppley et al., 2004).

4.4.4.3. Smart PReP® System

(Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany)

La preparación del PRP según el Smart PReP® System es un procedimiento semiautomático en el que se lleva a cabo una doble centrifugación de la sangre. Se trata de un dispositivo fácil de manipular y que requiere poco entrenamiento del personal, lo que disminuye los posibles errores humanos. El procedimiento de aislamiento del PRP según este método requiere aproximadamente 20 minutos (Weibrich et al., 2003).

El Smart PReP® System está compuesto por una centrífuga especial (SMP-1000i – Harvest Technologies) con un rotor oscilante que contiene dos pocillos para centrifugar unos dispositivos especiales donde se coloca la sangre del paciente. La empresa proporciona unos sets estériles que incluyen todos los consumibles necesarios para la extracción de sangre (jeringas, agujas) y unos dispositivos plásticos especiales para el procesado de la muestra. Este dispositivo especial (Fig. 14) consiste en dos cámaras de plástico (“cámara de sangre” y “cámara de plasma”) unidas e interconectadas entre sí. En una de las cámaras se deposita la sangre, y en la otra cámara, tras el proceso de centrifugación, quedará el PRP (Weibrich et al., 2003).

Este sistema de obtención de PRP precisa de la extracción de 52 mL de sangre en mujeres, y 48 mL de sangre en hombres. La diferencia en el volumen de sangre requerido se debe a que se trata de un procesado hematocrito-dependiente, y el hematocrito de los varones suele ser más elevado que el de las mujeres (Weibrich et al., 2003). Este volumen de sangre es extraído mediante una jeringa de 60 mL, en la que previamente se han aspirado 7 mL de anticoagulante (ACD-A). A continuación, la sangre con el anticoagulante es transferida a la “cámara de sangre” del dispositivo plástico, y en la “cámara de plasma” se inyectan 2 mL de anticoagulante (ACD-A). La centrífuga se equilibra y se comienza con el procesado. Este procesado consiste en una doble centrifugación que dura un total de 12 minutos. Tras el procesado, en la cámara de sangre quedarán los eritrocitos, y en la cámara de plasma quedará un sedimento donde estarán plaquetas, leucocitos y algunos eritrocitos, y además el plasma sobrenadante (PPP). El PPP es aspirado hasta dejar 7 – 10 mL según el volumen de PRP que se desee obtener. En este plasma no aspirado se resuspende el sedimento

plaquetario, para así obtener el PRP. Por último, el PRP es aspirado del fondo de la cámara de plasma a través de una jeringa y una cánula (Weibrich et al., 2003) (Fig. 14).



Fig. 14. Smart PReP® System

El Smart PReP® System consigue una eficiencia del 63.4% en la extracción de plaquetas, obteniéndose un PRP con una concentración plaquetaria de aproximadamente 1.250.000/ μ L y una concentración leucocitaria de 19.261/ μ L. Las concentraciones de

factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido con el Smart PReP[®] System han sido determinadas. El PDGF-AB alcanza unas concentraciones de 208.3 ng/mL, TGF- β 1 presenta una concentración de 77.2 ng/mL, y IGF-I 91.4 ng/mL (Weibrich et al., 2003).

Recientemente, Harvest Technologies ha lanzado al mercado la evolución de Smart PReP[®] System, Smart PReP[®]2 APC⁺ System. Este último dispositivo es muy similar en funcionamiento a su predecesor, y las principales diferencias las encontramos a nivel de los dispositivos de plástico donde se deposita y procesa la sangre para la obtención del PRP. Los sistemas de preparación de PRP suministrados por Harvest Technologies han conseguido el registro como productos terapéuticos (www.harvesttech.com).

4.4.4.4. Plateltext[®] (Plateltext, Bratislava, Slovakia)

El método Plateltext[®] es un sistema simple para la obtención de PRP. Consiste en una doble centrifugación, empleando para ello una centrífuga de laboratorio con rotor oscilante 0-90°. La sangre es extraída en tubos de ensayo de 8.0 mL, que contiene ACD-A como anticoagulante. La muestra se somete a una primera centrifugación suave a 180G durante 10 minutos. A continuación, se aspira el plasma sobrenadante, y éste es nuevamente centrifugado a 1000G durante 10 minutos. Esta segunda centrifugación más fuerte permite la formación de un sedimento plaquetario, y la separación del plasma sobrenadante (PPP). El objetivo de este método es eliminar la cantidad de PPP suficiente para que al resuspender el sedimento plaquetario, se obtenga un PRP con una concentración plaquetaria de aproximadamente 2.000.0000 plaquetas/ μ L (Mazzucco et al., 2008).

La eficiencia en la extracción plaquetaria de este método es cercana al 80%, y se consigue un PRP que contiene una concentración plaquetaria en torno a 1.600.000 plaquetas/ μ L. La concentración de PDGF-AB de este PRP es de 60 ng/mL (Mazzucco et al., 2008).

4.4.4.5. Secquire PRP® System (PPAI Medical, Fort Myers, FL, USA)

Secquire PRP® System es otro método diseñado para la obtención de PRP de una manera segura y rápida. Una vez extraída la sangre del paciente, y convenientemente mezclada con el anticoagulante, se coloca en el dispositivo para el centrifugado. Este dispositivo de centrifugado es un contenedor de polipropileno transparente con una graduación para medir volumen. En la tapadera del contenedor existen tres puertos, uno de ellos para depositar la sangre en el interior del dispositivo, y otros dos que poseen un tubo fino que va hasta el fondo del contenedor; uno de ellos para aspirar el sedimento de eritrocitos, y el otro para posteriormente aspirar el PRP (Fig. 15). Tras la centrifugación, la sangre quedará dividida en tres fracciones: eritrocitos, en el fondo del contenedor; capa leucocitaria, aproximadamente en la mitad; y plasma, en la superficie. Se conecta una jeringa en el puerto central, y se aspiran los eritrocitos del fondo del contenedor, con cuidado de no crear turbulencias y respetar la capa leucocitaria. A continuación, con otra jeringa conectada al otro puerto de aspiración, se recoge el plasma existente justo por encima de la capa leucocitaria (PRP) (www.secquire.com).



Fig. 15. Secquire PRP® System

4.4.4.6. Arthrex ACP[®] System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)

Arthrex ACP[®] System es otro de los dispositivos comerciales disponibles para la obtención de un plasma autólogo rico en plaquetas, denominado “plasma autólogo acondicionado” (ACP). Este sistema posee una doble jeringa diseñada para la extracción de la sangre, centrifugación de la misma, y aspirado del ACP, todo ello tras una única centrifugación (Fig. 16). En primer lugar es necesario aspirar 1 mL de anticoagulante (ACD-A) con la jeringa grande. A continuación se extraen 9 mL de sangre del paciente con esta misma jeringa grande del dispositivo. El dispositivo en doble jeringa, tapado adecuadamente y con la sangre, se introduce en una centrífuga especialmente diseñada para estos dispositivos. Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras esta centrifugación, los eritrocitos quedan en el fondo de la jeringa, y a continuación quedaría el plasma. En el siguiente paso, con la jeringa pequeña que queda dentro de la grande, se aspiran 3 mL de ACP, con cuidado de no aspirar eritrocitos. Estos 3 mL de plasma son los que se aplican a la zona a tratar. (www.arthrex.com).



Fig. 16. Arthrex ACP[®] System

Según el folleto informativo de Arthrex ACP[®] System, el ACP obtenido mediante esta metodología consigue una concentración plaquetaria de aproximadamente 550.000/ μ L, sin la existencia de leucocitos. Además se multiplica por 25 la concentración de PDGF-AB (60 ng/mL) y se cuadruplica la concentración de TGF- β 1 (145 ng/mL), en comparación con los valores de sangre periférica, mientras que la concentración de IGF-I (125 ng/mL) permanece con pocos cambios con respecto a los

niveles existentes en sangre (www.arthrex.com). No existen publicaciones en la literatura científica en las que se reflejen estos datos.

Otros dispositivos comerciales semiautomáticos para la obtención de PRP autólogo son:

- Vivostat[®] PRF Preparation Kit (Vivolution A/S, Birkerød, Denmark) (Leisner et al., 2006).
- Fibrinet[®] Autologous Fibrin & Platelet System (Cascade Medical Enterprises Ltd, Plymouth, UK) (Leisner et al., 2006; Mazzucco et al., 2009).
- Regen PRP[®] Kit (RegenLab, Mollens-VD, CH) (Mazzucco et al., 2009).

Tabla 2. Tabla comparativa de los diferentes sistemas para la obtención de PRP, donde se muestran algunas características cualitativas y cuantitativas de los diferentes PRPs obtenidos (*)

Método	Plaquetas (x10³/μL)	Leucocitos (x10³/μL)	PDGF-AB (ng/mL)	TGF-β1 (ng/mL)	IGF-I (ng/mL)	Volumen sangre (mL)
Aféresis	750 - 1500	0.16 – 0.18	125 - 190	133 - 268	86	> 450
PRGF System [®]	500	≈ 0	47.0	73.3	78.0	10 – 20
Landesberg	550 - 900	N/D	39.8	42	N/D	5
PCSS [®] Kit	1100-2200	5.5 – 14.8	156.7-251	144-467	78 – 91	54
Curasan PRP [®] Kit	1000 -2500	14.8 – 33.1	233-314.1	79.7–499	69.5-101	8.5
GPS [®] System	1600	31.1	N/D	120	72	54
Smart PReP [®] System	1250	19.2	208.3	77.2	91.4	52
Friudent-Schütze PRP [®] Kit	1440	21.7	251.6	196.8	72.8	8.5
Plateltex [®]	1600	N/D	60	N/D	N/D	N/D
Secquire PRP [®] System	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Arthrex ACP [®] System	550	≈ 0	60	145	125	9
Vivostat [®]	N/D	N/D	130	N/D	N/D	120
Fibrinet [®]	346	N/D	105	N/D	N/D	8
Regen PRP [®] Kit	430	N/D	140	N/D	N/D	10

N/D = No determinado

(*) Referencias bibliográficas a lo largo del texto.

5. Empleo de PRP en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas

La aplicación terapéutica del PRP surgió a mediados de los años 90 con los trabajos de Tayapongsak y colaboradores, de Whitman y colaboradores, y de Marx y colaboradores. Estos autores emplearon este concentrado plaquetario autólogo en forma gelificada en procedimientos de cirugía reconstructiva oral y maxilofacial. La idea de estos pioneros era emplear una sustancia que compactase las partículas óseas de los injertos de esponjosa y facilitase así su manipulación a la hora de colocarlo sobre defectos mandibulares. El PRP conseguía este propósito, y al mismo tiempo observaron que mejoraba el proceso de curación debido a los factores de crecimiento que aportaba (Tayapongsak et al., 1994; Whitman et al., 1997; Marx et al., 1998).

Estos primeros resultados alentaron a otros autores a seguir empleando el PRP dentro del campo de la cirugía oral y maxilofacial. Poco tiempo después otras ramas de la Medicina y Cirugía se empezaron a interesar por el empleo terapéutico del PRP. De este modo, en los últimos 10 años se ha producido un crecimiento exponencial de las aplicaciones potenciales del PRP. Además de en cirugía oral y maxilofacial, el PRP se está empleando en cirugía plástica, en el tratamiento de heridas y úlceras cutáneas, en cirugía oftalmológica, en medicina estética, en cirugía cardiovascular, en cirugía espinal y en otros muchos campos. Pero sin lugar a dudas, es en el campo de la cirugía ortopédica y traumatológica donde el empleo del PRP ha experimentado un mayor desarrollo en los últimos años. En todos estos casos, la aplicación del PRP ha perseguido promover y mejorar el proceso de cicatrización en los diferentes tejidos, y para ello en muchas ocasiones se ha empleado en conjunción con otros tratamientos.

5.1. Empleo del PRP en lesiones óseas

Más de seis millones de fracturas se producen anualmente en los Estados Unidos, de las cuales entre un 10 – 15 % cursan con trastornos de la cicatrización ósea que causan dolor y molestias. Debido a ello, los científicos hacen grandes esfuerzos para crear sustitutos óseos y desarrollar alternativas para mejorar la cicatrización ósea. Un sustituto óseo debe de ser biológicamente compatible, no tóxico, proporcionar un soporte físico sobre el cual se produzca angiogénesis y crecimiento de nuevo hueso, debe ser reabsorbible, microporoso y fácil de manipular. Además de las propiedades osteogénicas, el sustituto óseo debe de tener propiedades osteoinductivas y osteoconductoras (Anitua et al., 2006a). El empleo del PRP ayuda a completar estas propiedades, y puede resultar particularmente útil en procedimientos donde se persigue una regeneración ósea.

Una vez que el PRP es activado, las plaquetas liberan una gran cantidad de sustancias que desempeñan funciones claves en el proceso de cicatrización ósea. Dentro de este cóctel de sustancias encontramos importantes factores de crecimiento como TGF- β 1, PDGF, IGF, o proteínas como la trombospondina y osteonectina (Anitua et al., 2006a). El comienzo de la regeneración ósea comienza con la liberación de PDGF y TGF- β 1 por parte de las plaquetas existentes en el hematoma de la fractura. El PDGF estimula la mitogénesis de los osteoblastos del endostio y periostio, y promueve la formación de yemas capilares hacia la zona lesionada en los capilares adyacentes. TGF- β 1 activa a los fibroblastos e induce la proliferación de los osteoblastos. Los fibroblastos producen la matriz extracelular de colágeno que sirve de armazón para el crecimiento capilar y posterior osteogénesis. Los factores de crecimiento inducen un aumento de la celularidad en la zona de reparación. A medida que las plaquetas llegan al final de su ciclo vital, los macrófagos, que han llegado a la zona de lesión merced al efecto quimiotáctico de determinados factores de crecimiento secretados por las plaquetas, toman las riendas del proceso de reparación y orquestan los procesos de comunicación intercelular gracias a la síntesis de nuevos factores de crecimiento (Mehta y Watson, 2008).

La cicatrización ósea es altamente dependiente del proceso de angiogénesis, y es necesario que exista un adecuado aporte sanguíneo local para que se produzca correctamente la regeneración del hueso (Carano y Filvaroff, 2003). Un desarrollo inadecuado o inapropiado de los vasos sanguíneos se asocia con una disminución en la formación de hueso (Glowacki, 1998). El PRP contiene sustancias angiogénicas como el VEGF, y a su vez también contiene proteínas anti-angiogénicas como el factor plaquetario-4 (PF-4) y las endostatinas. El equilibrio entre ambos tipos de sustancias es crucial para que se desarrolle correctamente el proceso de neovascularización del tejido reparado (Anitua et al., 2006a).

5.1.1. Estudios experimentales

Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que los factores de crecimiento contenidos en el PRP estimulan la proliferación tanto de células de hueso trabecular (Gruber et al., 2002b), como de células similares a osteoclastos (osteoclast-like cells) (Gruber et al. 2002a). Recientemente, Han y colaboradores (2009) estudiaron el efecto tanto *in vivo* como *in vitro* del PRP mezclado con injerto óseo. Este estudio giraba en torno a la idea de usar el PRP como una fuente autóloga de factores de crecimiento que podía incrementar tanto la calidad como la cantidad de hueso neoformado (Han et al., 2009).

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios experimentales *in vivo* para intentar dilucidar el efecto que el PRP ejerce en el proceso de cicatrización ósea. Estos experimentos se han realizado en diferentes modelos animales: rata, conejo, cabra, oveja, cerdo y perro. Buena parte de estos estudios muestran un efecto claramente positivo del PRP sobre la cicatrización ósea, mientras que en otros los resultados no son tan evidentes (Smith y Roukis, 2009).

Los primeros estudios *in vivo* del uso del PRP para incrementar el proceso de cicatrización ósea se realizaron dentro del campo de la cirugía oral y maxilofacial. Marx y colaboradores (1998) estudiaron el efecto del PRP junto con injerto de esponjosa en un modelo experimental de reconstrucción de defectos mandibulares. Estos autores concluyeron que la combinación de PRP junto con injerto de esponjosa inducía una cicatrización ósea más rápida y con formación de hueso más denso (Marx et al., 1998).

Existen numerosos estudios que evalúan el efecto terapéutico del PRP junto con sustitutos óseos, ya sea orgánicos o inorgánicos. Un beneficio potencial de esta asociación es que se consigue una notable mejoría en la manipulación y adaptación del injerto a la zona del defecto de hueso, debido a que la fibrina actúa como pegamento biológico y mantiene unidas las partículas de sustituto óseo (Anitua et al., 2006a). En un estudio se evaluó el efecto de un injerto óseo natural desproteínizado bovino con y sin PRP en un modelo experimental de defecto óseo en conejo. Los autores observaron que la adición de PRP al xenoinjerto producía una mejoría significativa en los parámetros histopatológicos del hueso neoformado (Aghaloo et al., 2004). En otro estudio se empleó un sustituto óseo inorgánico (fosfato β -tricálcico) con y sin PRP en un modelo experimental de defecto óseo mandibular canino. Los resultados confirmaron que en las fases más precoces de la cicatrización ósea, la formación de hueso era más intensa en aquellos defectos en los que se empleó PRP (Suba et al., 2004). Sin embargo, existen algunos estudios que evidencian que el PRP tiene una eficacia limitada o incluso negativa cuando se combina con ciertos transportadores. En un modelo experimental sobre ratón inmunocomprometido, el PRP mostró un efecto inhibitorio de la osteoinductividad de la matriz ósea desmineralizada (Ranly et al., 2007).

Simman y colaboradores (2008) aplicaron PRP en un modelo experimental de fractura de fémur en ratas, y observaron que la administración de PRP aceleró la cicatrización ósea. Estos autores explican que este efecto beneficioso del PRP se debe a una modulación de la expresión génica del TGF- β 1 y del BMP-2 (Simman et al., 2008). Gandhi y colaboradores (2006) estudiaron la influencia de la administración percutánea de PRP en el callo de fractura en una línea de ratas Wistar con diabetes mellitus. Este tipo de ratas manifestaba una reducción importante en la expresión de factores de crecimiento en el foco de fractura en comparación con ratas normales. En este último estudio se observó que la inyección de PRP conseguía que las ratas diabéticas mejoraran la cicatrización de la fractura y formaran un tejido óseo que histológicamente era muy similar al que formaban las ratas normales (Gandhi et al., 2006).

Weibrich y colaboradores (2004) evaluaron el efecto de la concentración de plaquetas en el PRP en la regeneración ósea en un modelo experimental en conejos. Este estudio demostró que se necesitaba una concentración plaquetaria en torno a 1.000.000/ μ l para conseguir un efecto biológico beneficioso. Menores concentraciones plaquetarias tan sólo conseguían un beneficio subóptimo mientras que, paradójicamente,

mayores concentraciones tenían un efecto inhibitorio sobre la regeneración ósea (Weibrich et al., 2004).

Varios estudios han demostrado el efecto positivo que tiene el PRP mezclado con injertos autólogos de hueso y en el tratamiento de defectos óseos en conejos. En uno de estos estudios se puso de manifiesto que la asociación de PRP junto con injerto óseo incrementaba la formación de hueso (Kim et al., 2001). Kasten y colaboradores (2008) investigaron la cicatrización ósea en un modelo experimental de defecto óseo de tamaño crítico en la diáfisis del radio de conejos. Estos autores evidenciaron que el PRP junto con un sustituto óseo inorgánico mejoraba la cicatrización ósea hasta niveles comparables a los que se conseguían con el empleo de un injerto de hueso esponjoso autólogo (Kasten et al., 2008).

Fennis y colaboradores (2002) mostraron un incremento significativo en la cicatrización ósea en un modelo experimental de defecto mandibular en cabras tras la aplicación de PRP junto con injerto óseo autólogo (Fennis et al., 2002). Sin embargo, Mooren y colaboradores (2007) no pudieron encontrar diferencias histológicas en el grado de osificación entre animales en los cuales se empleó PRP junto con injerto óseo autólogo y aquellos en los que se usó el injerto óseo sólo, en un modelo experimental de defecto óseo de tamaño crítico en el hueso frontal de cabras (Mooren et al., 2007).

Varios estudios en los que se ha usado el perro como animal de experimentación han cuestionado la eficacia del PRP en la cicatrización ósea. En dos estudios separados, Jensen y colaboradores no encontraron diferencias significativas en el grado de osificación cuando se empleaba PRP en un modelo experimental canino (Jensen et al., 2004; Jensen et al., 2005). En un estudio más reciente, Rabillard y colaboradores (2009) evaluaron el empleo de PRP junto con gránulos de fosfato cálcico en un modelo experimental de defecto óseo de tamaño crítico en el cúbito de perros. Estos autores no encontraron que el PRP produjese un incremento significativo del proceso de regeneración ósea (Rabillard et al., 2009).

Sarkar y colaboradores (2006) estudiaron el efecto del PRP en la regeneración ósea en un modelo experimental de defecto de tamaño crítico diafisario en ovejas, en el que se empleó PRP junto con un transportador de colágeno. El hueso neoformado en la zona del defecto no difirió significativamente ni en su densidad ósea, ni en sus

propiedades biomecánicas, ni en su histología entre el grupo tratado con PRP y el grupo control (Sarkar et al., 2006).

Otros estudios investigaron el efecto del PRP en un modelo de defecto óseo en la zona metafisaria de la tibia de mini-pigs. Uno de los estudios investigó la combinación de PRP con injerto óseo autólogo y se llegó a la conclusión que esta combinación condujo a una regeneración ósea significativamente mejor que la existente en el grupo donde se usó el injerto óseo sin PRP (Hakimi et al., 2010). Este mismo grupo de investigadores puso de manifiesto que la combinación de PRP con gránulos de fosfato de calcio promovía una mejor regeneración ósea desde el punto de vista histológico y radiológico que en los grupos donde no se aplicaba PRP (Jungbluth et al., 2010).

Como estamos viendo, encontramos estudios experimentales donde se muestra que el empleo de PRP puede resultar muy prometedor a la hora de promover el proceso de cicatrización ósea. Sin embargo, existen otros estudios en los que este efecto beneficioso no queda demostrado. Por todo ello, el papel que el PRP puede desarrollar en la cicatrización ósea continúa siendo en la actualidad un campo muy fértil desde el punto de vista de la investigación. Algunos autores han sugerido que estos resultados controvertidos pueden ser en parte explicados debido a la gran variabilidad existente entre los diferentes métodos de preparación del PRP usados en los diferentes estudios (Anitua et al., 2006a; Intini, 2009).

5.1.2. Estudios clínicos

Existen varios de estudios clínicos que examinan el efecto del PRP en la cicatrización ósea, sobre todo en casos de problemas ortopédicos, en cirugía espinal, y sobre todo en el campo de la en cirugía oral y maxilofacial. Actualmente, resulta una práctica clínica común el combinar PRP con injertos óseos autólogos, con aloinjertos, con sustitutos óseos inorgánicos, con matriz ósea desmineralizada, o con otros productos empleados para rellenar defectos de hueso (Alsousou et al., 2009).

Una de las principales patologías en las que se ha empleado de manera clínica el PRP son los procesos de no-uniión ósea. La no-uniión de una fractura ocurre cuando cesa el proceso cicatricial normal del hueso sin que se llegue a producir la uniión ósea, y constituye una complicaciión importante en el tratamiento de las fracturas (Sanchez et

al., 2009b). El primer estudio en el que se informó del empleo de PRP en el tratamiento de procesos de no-uni3n de fracturas fue descrito por Eppley y colaboradores en 2004 (Eppley et al., 2004). Estos investigadores determinaron los niveles de PDGF y TGF- β en el hematoma fracturario de 24 pacientes que tenían fracturas frescas y en 7 pacientes con procesos de no-uni3n. Los niveles de factores de crecimiento fueron inferiores en los pacientes con no-uni3n. Tras el procedimiento quirúrgico de revisi3n de los casos con no-uni3n se aplic3 PRP en el foco de lesi3n, y se observ3 una cicatrizaci3n 3sea a las 8,5 semanas del tratamiento. Aunque este estudio no fue ni aleatorio ni prospectivo, proporciona evidencias que apoyan el empleo de PRP en casos de no-uni3n en aquellos pacientes que tengan comprometida la cicatrizaci3n 3sea (Eppley et al., 2004). Gandhi y colaboradores (2005) tambi3n est3n entre los primeros que usaron PRP en individuos diagnosticados de no-uni3n. Estos autores aplicaron PRP con autoinjerto de esponjosa en el foco de lesi3n seguido de las t3cnicas rutinarias de osteosíntesis. El proceso de no-uni3n se resolvi3 en una media de 60 días (Gandhi et al., 2005). En un estudio de Bibbo y colaboradores (2005) se emple3 PRP en cirugía electiva de fusi3n 3sea a nivel de pie y tobillo en pacientes con alto riesgo de padecer no-uni3n. Estos investigadores concluyeron que el empleo de PRP en pacientes con riesgo de sufrir procesos de no-uni3n podía ayudar a conseguir unos tiempos de consolidaci3n 3sea aceptables (Bibbo et al., 2005). Un estudio clínicopropectivo se evalu3 el efecto de la inyecci3n de PRP en 20 pacientes que presentaban no-uni3n atr3fica. Las no-uniones fueron estabilizadas mediante el uso de un fijador externo unilateral y se aplic3 una inyecci3n percutánea de PRP en el foco de lesi3n. Estos autores no encontraron diferencias significativas en el tiempo medio de consolidaci3n radiogr3fico entre los individuos tratados con PRP y los controles (Mariconda et al., 2008). Por el contrario, en otros estudios clínicos se ponen de manifiesto que la aplicaci3n percutánea de PRP constituye una interesante opci3n terapéutica para conseguir la cicatrizaci3n 3sea en casos de no-uni3n (Bielecki et al., 2008). Sánchez y colaboradores (2009) aplicaron PRGF en 16 pacientes con no-uniones atr3ficas y observaron que era un tratamiento seguro y que podía incrementar la cicatrizaci3n de estos procesos de no-uni3n. Es necesario mencionar que este último estudio carecía de grupo control, y que en algunos pacientes se emple3 PRP combinado con injerto de esponjosa, mientras que en otros se emple3 únicamente el PRP (Sanchez et al. 2009b). Seijas y colaboradores (2010) han publicado recientemente un caso clínicopro en el que se emplearon inyecciones percutneas de PRGF para el tratamiento de una no-uni3n de clavícula con unos resultados muy satisfactorios (Seijas et al., 2010).

Existe una clara asociación entre diabetes mellitus y trastornos de la cicatrización ósea, como ha quedado demostrado tanto en estudios experimentales como clínicos (Alsousou et al., 2009). En un estudio clínico se aplicó de manera percutánea inyecciones de PRP en el foco de fractura de pacientes diabéticos y se consiguió normalizar el proceso de cicatrización ósea hasta niveles comparables a los de los individuos normales, aunque las propiedades biomecánicas a largo plazo del callo óseo sólo se consiguieron normalizar parcialmente (Grant et al., 2005).

Dallari y colaboradores (2006) diseñaron y realizaron un estudio clínico aleatorio y controlado en el que se evaluó la eficacia del PRP tras una osteotomía proximal de la tibia en pacientes con osteoartrosis de rodilla. El defecto óseo resultante tras la osteotomía se rellenó de sustituto óseo liofilizado en el grupo control, y se comparó con otros dos grupos que llevaban, además del sustituto óseo liofilizado, PRP y/o células estromales de médula ósea. Los estudios radiográficos para evaluar la osteointegración fueron mejores en los grupos en los que se aplicó PRP en todos los tiempos. A los pacientes también se les tomó una biopsia, y se demostró que existía un incremento significativo en la formación de hueso en los pacientes que recibieron PRP, aunque al año no se observaron diferencias ni clínicas ni funcionales entre los diferentes grupos de estudio (Dallari et al., 2006).

Kitoh y colaboradores (2007) investigaron la utilidad clínica de la combinación de PRP junto con células mesenquimales de médula ósea durante procedimientos de osteogénesis por distracción en casos clínicos en los que era necesaria la elongación de extremidades (Kitoh et al., 2007a; Kitoh et al., 2007b). La aplicación del PRP junto con las células mesenquimales derivadas de médula ósea se llevó a cabo durante la fase de alargamiento y consolidación ósea. Estos autores llegaron a la conclusión de que este tratamiento biológico produjo una aceleración en la formación de nuevo hueso durante la osteogénesis por distracción, un descenso en los tiempos de tratamiento y una reducción en la tasa de complicaciones (Kitoh et al., 2007a; Kitoh et al., 2007b).

El PRP también ha sido empleado en cirugía espinal, concretamente en casos de fusión espinal. Lowery y colaboradores (1999) han publicado una serie de casos clínicos retrospectiva en la que se usó PRP junto con autoinjerto de esponjosa e hidroxipatita coralina en casos de fusión espinal lumbar. Estos autores concluyeron que el PRP

promovía la fusión ósea cuando se usaba en combinación con el autoinjerto de esponjosa (Lowery et al., 1999). En una serie de casos clínicos, se comparó el uso de PRP junto con aloinjerto óseo y el empleo del tradicional autoinjerto de esponjosa en casos de fusión espinal lumbar. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, de modo que el PRP junto con aloinjerto óseo puede ser una alternativa viable a los autoinjertos de esponjosa (Jenis et al., 2006). Sin embargo, en otro estudio se observó que cuando se combinaba el PRP junto con injerto de esponjosa disminuía el grado de fusión ósea a nivel espinal (Weiner y Walker, 2003).

Sin embargo, a día de hoy no existen publicados estudios clínicos sólidos desde el punto de vista metodológico, aleatorios, multicéntricos, controlados y a doble ciego en los cuales se evalúe la utilidad clínica del PRP como tratamiento adyuvante para el manejo de fracturas o para fomentar los procesos de cicatrización ósea en un escenario clínico.

5.2. Empleo del PRP en lesiones de cartílago y lesiones articulares

La incidencia de lesiones condrales se ha incrementado de manera muy marcada en las últimas décadas debido a la creciente participación por parte de la población en actividades deportivas y actividad física (Kon et al., 2011a). La capacidad de regeneración del cartílago es limitada, y este tipo de lesiones constituyen un auténtico desafío para el cirujano. De hecho, la mayoría de los tratamientos disponibles son controvertidos o carecen de una evidencia científica sólida. A menudo estos tratamientos tan solo consiguen mejorías clínicas o funcionales temporales (Kon et al. 2011a). Debido al creciente interés en torno al empleo del PRP en el manejo de otras enfermedades ortopédicas, en los últimos años se ha propuesto el empleo del PRP como tratamiento adyuvante en las lesiones condrales. El concepto de aplicar PRP para mejorar la reparación del cartílago y los procesos patológicos que afectan a la articulación se basan en el importante papel fisiológico que juegan las plaquetas en los procesos de reparación tisular. Existen numerosos factores de crecimiento que actúan de manera coordinada para regular la homeostasis y el correcto funcionamiento del cartílago articular (Fortier et al., 2011). Por tanto, la aplicación terapéutica de estos

factores de crecimiento puede ofrecer una estrategia de tratamiento muy prometedora para incrementar la reparación de defectos cartilagosos focales o en situaciones donde el daño del cartílago sea mucho más extenso y difuso como es el caso de la osteoartritis (Fortier et al., 2011). Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han puesto de manifiesto que existe una larga lista de factores de crecimiento que desempeñan papeles cruciales en el proceso de reparación del cartílago, ya sea mediante el estímulo de la síntesis de proteoglicanos, agreganos o colágeno de tipo II por parte de los condrocitos, mediante la proliferación de sinoviocitos, mediante la diferenciación condrogénica de células mesenquimales, o bien mediante la disminución de los efectos catabólicos de citoquinas tales como la interleucina-1 (IL-1) o enzimas proteolíticas tales como la metaloproteasas de la matriz (Fortier et al., 2011). En la lista de factores de crecimiento con un papel más destacado en el proceso de cicatrización cartilaginosa podemos destacar TGF- β 1, BMP-2, BMP-7, IGF-I, FGF, y PDGF (Fortier et al., 2011). La mayor parte de estos factores de crecimiento se encuentra de manera fisiológica en el interior de los gránulos alfa de las plaquetas (Anitua et al., 2004). Muchos de estos factores de crecimiento han sido evaluados de manera independiente, en lugar de ser evaluados en combinación, para estudiar sus efectos sobre la homeostasis del cartílago. Debido a que el proceso de reparación del cartílago es un proceso muy complejo y que en muchas ocasiones los diferentes factores de crecimiento interactúan entre sí, parece poco probable que el estudio del efecto individual de un solo factor de crecimiento conduzca a la obtención de un efecto beneficioso global sobre la salud de la articulación (Fortier et al., 2011). El PRP contiene una mezcla compleja de factores de crecimiento autólogos en un equilibrio fisiológico, y por tanto puede resultar una opción terapéutica interesante para tratar procesos que afectan al cartílago articular y además, una vez que forma el coágulo, puede constituir un entramado tridimensional que rellena el defecto cartilaginoso y puede dar lugar al proceso de neocondrogénesis *in situ* (Fortier et al., 2011).

5.2.1. Estudios experimentales

El empleo de PRP con la finalidad de reparar el cartílago es un concepto relativamente nuevo y por tanto existen pocas publicaciones que investiguen este tema. Estudios experimentales han puesto de manifiesto los cultivos de condrocitos expuestos

a PRP incrementan la proliferación celular y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular del cartílago, como proteoglicanos o colágeno de tipo II (Akedo et al., 2006). Mishra y colaboradores (2009) encontraron que cuando exponían cultivos de células mesenquimales a PRP se producía una diferenciación condrogénica de éstas (Mishra et al. 2009a). En otro estudio experimental también se puso de manifiesto que el PRP ejerce un efecto proliferativo tanto sobre cultivo de condrocitos como de células mesenquimales (Drengk et al., 2009). Anitua y colaboradores (2007) llevaron a cabo un estudio experimental en el cual cultivaron sinoviocitos procedentes de individuos con osteoartrosis, y los expusieron a PRP. Estos autores observaron que los cultivos expuestos a PRP incrementaron la síntesis y excreción de ácido hialurónico en comparación con los controles, sugiriendo que el PRP podría ser usado potencialmente como una fuente de condroprotección y de lubricación articular (Anitua et al., 2007b). Gaissmaier y colaboradores (2005) estudiaron el efecto del sobrenadante de plaquetas humanas en cultivo de condrocitos articulares humanos, y observaron una aceleración en la proliferación de los condrocitos (Gaissmaier et al., 2005). En un interesante estudio, se evaluó el efecto del PRP sobre cultivo de condrocitos humanos procedentes de individuos con osteoartrosis. Los autores observaron que el PRP disminuyó la expresión génica de diversas sustancias proinflamatorias que favorecen la degradación de la matriz cartilaginosa y fomentan el progreso de la enfermedad articular (van Buul et al., 2011).

Además de estos estudios *in vitro*, también se han llevado a cabo algunos estudios *in vivo* sobre modelos animales en los cuales se inducía un defecto cartilaginoso, con la intención de estudiar el efecto del PRGF en el proceso de reparación del cartílago. Serra y Soler (2006) realizaron uno de los primeros trabajos experimentales en los cuales se evaluó experimentalmente el efecto del PRGF sobre el proceso de reparación del cartílago. Estos autores usaron un modelo experimental de defecto condral de espesor completo en el cóndilo femoral de conejos. Soler (2006) observó en su trabajo de Tesis Doctoral que la administración intraarticular de PRGF fue efectiva para la reparación de dichos defectos condrales, y redujo el tiempo de cicatrización en comparación con los tratamientos convencionales, tales como el condroitín sulfato o el ácido hialurónico. Además, esta misma autora encontró que existía un efecto sinérgico entre PRGF y ácido hialurónico, de modo que cuando ambos productos eran inyectados juntos, el efecto beneficioso era mucho más pronunciado

(Soler, 2006). Serra (2006) describió en su trabajo de Tesis Doctoral que el tejido de reparación creado tras la administración intraarticular de PRGF tenía unas características histológicas muy similares a las del cartílago hialino. Además, las propiedades biomecánicas de este tejido de reparación formado tras la aplicación de PRGF eran las típicas de un material viscoelástico y muy parecidas a las del cartílago articular sano (Serra, 2006).

Más recientemente, Sun y colaboradores (2010) crearon un defecto osteocondral sobre un modelo experimental en conejo, e hicieron tres grupos de estudio. En uno de los grupos dejaron el defecto sin tratar, en otro grupo colocaron en el defecto un transportador de ácido poli-lacto-glicólico, mientras que en el otro grupo colocaron ese mismo transportador junto con PRP. Estos autores observaron que el grupo en el cual se aplicó PRP presentó un mayor grado de regeneración cartilaginosa así como un incremento en la producción de glicosaminoglicanos en la matriz extracelular (Sun et al., 2010). En un estudio experimental llevado a cabo por Wu y colaboradores (2007), también sobre un modelo de defecto condral en conejo, se observó que las inyecciones intraarticulares de PRP eran eficaces para promover el crecimiento de los condrocitos y la posterior formación de nuevo tejido cartilaginoso (Wu et al., 2007).

Milano y colaboradores (2010) realizaron un estudio usando un modelo experimental de defecto condral de espesor completo en oveja. Estos autores observaron que el tratamiento con PRP hizo que mejorase significativamente tanto la apariencia macroscópica del cartílago reparado como sus propiedades biomecánicas. Además también concluyeron que la aplicación del PRP en forma de gel era mejor que en forma líquida para el tratamiento intraarticular de estas lesiones (Milano et al. 2010). Sin embargo, en un estudio reciente también sobre un modelo de defecto condral en oveja, Kon y colaboradores (2010) encontraron que al añadir PRP a una nueva matriz de nanopartículas de colágeno-hidroxiapatita que se colocaba sobre el defecto condral, el proceso regenerativo empeoraba (Kon et al. 2010b).

5.2.2. Estudios clínicos

El primer estudio clínico que describió el empleo para el tratamiento de problemas condrales fue llevado a cabo por Sánchez y colaboradores en 2003 (Sánchez

et al., 2003). Estos autores publicaron un caso clínico en el que se empleó PRGF para tratar una avulsión de cartílago en un futbolista, y se consiguió una cicatrización del cartílago completa y rápida, con una vuelta precoz a la actividad física (Sánchez et al., 2003). Posteriormente, estos mismos autores aplicaron tres inyecciones semanales de PRGF en 30 casos clínicos de osteoartrosis de rodilla, usando otros 30 casos clínicos de inyecciones de ácido hialurónico como controles. En los individuos tratados con PRGF se observó un mejor control del dolor y una mejora de la actividad física. No se registraron efectos adversos (Sánchez et al., 2008). De manera similar, Giannini y colaboradores (2008) publicaron 26 casos clínicos en los que observaron que la aplicación intraarticular de PRP era segura, ayudaba a reducir el dolor y mejoraba la funcionalidad articular en pacientes afectados de condropatías severas de rodilla (Giannini et al., 2008).

Kon y colaboradores (2010) publicaron un estudio con 100 pacientes (115 rodillas) tratados con cuatro inyecciones intraarticulares de PRP administradas cada 21 días. Dentro de los casos clínicos incluidos en este estudio se incluyeron pacientes con lesiones condrales degenerativas, procesos incipientes de osteoartrosis y procesos avanzados de osteoartrosis. Estos autores encontraron que el tratamiento con PRP era seguro, reducía el dolor y mejoraba la funcionalidad y calidad de vida de los pacientes con patología articular degenerativa. Tan solo de detectaron algunos efectos adversos menores, como un dolor moderado o efusión articular después de la inyección, pero estos efectos indeseables no se prolongaron más de dos días (Kon et al., 2010a). Tanto al año como a los dos años del tratamiento se observó una tendencia al empeoramiento, y se determinó que el la duración media del efecto era de en torno a nueve meses, aunque se encontró que el efecto se prolongaba durante más tiempo en pacientes jóvenes, en aquellos con menor índice de masa corporal y en aquellos en los que la enfermedad articular degenerativa era de menor grado (Filardo et al., 2011). En un estudio más reciente de este mismo grupo de investigadores se comparó la eficacia de las inyecciones intraarticulares de PRP y las de ácido hialurónico para el tratamiento de lesiones condrales degenerativas y osteoartrosis de rodilla. El estudio estuvo compuesto por 150 pacientes. Las inyecciones de PRP mostraron ser mejores y más duraderas a la hora de controlar el dolor y los signos clínicos. Además, los pacientes tratados con PRP evidenciaron una mejor función articular. Las diferencias más evidentes se observaron en pacientes jóvenes y activos con menor grado de lesión articular, mientras que en

aquellos pacientes de más edad y con una enfermedad articular más avanzada, los resultados entre los dos grupos fue similar (Kon et al., 2011b).

En un estudio reciente, Wang-Saegusa y colaboradores (2011) realizaron infiltraciones intraarticulares de PRGF en 261 pacientes con osteoartrosis de rodilla. Estos autores practicaron tres aplicaciones de PRGF separadas 2 semanas entre sí, y observaron que los pacientes presentaban una mejoría tanto en la funcionalidad de la articulación como en la calidad de vida a los 6 meses del tratamiento. En este estudio no se detectaron efectos adversos o repercusiones sistémicas asociadas a la aplicación del PRGF (Wang-Saegusa et al., 2011). En un estudio previo con un diseño similar, pero con menor número de pacientes (14 pacientes) también se observaron mejorías en los individuos que recibieron el tratamiento intraarticular de PRP, sin que se detectasen efectos adversos (Sampson et al., 2010). Recientemente, Spaková y colaboradores (2012) han publicado un estudio clínico con 120 pacientes que padecían osteoartrosis de rodilla. Un grupo de pacientes fue tratado con tres inyecciones intraarticulares de PRP, mientras que otro grupo fue tratado con tres inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico. Los pacientes que recibieron el tratamiento con PRP mostraron una mejor valoración en los índices de osteoartrosis de las universidades de Western Ontario y McMaster, así como en una escala de valoración numérica, lo que indicó una mejor salud articular que aquellos tratados con ácido hialurónico (Spaková et al., 2012).

Algunos autores han propuesto que el PRP se puede emplear como transportador de condrocitos, de modo que esta combinación pueda ser inyectada justo en la zona del defecto condral de manera mínimamente invasiva. El PRP, una vez gelificado, ayudaría a mantener las células justo en el lugar de la lesión, y al mismo tiempo aportaría una fuente autóloga de factores de crecimiento que podrían fomentar los procesos de reparación cartilaginosa (Wu et al., 2009).

Aunque el empleo de factores de crecimiento para el tratamiento de defectos de cartílago o problemas de osteoartritis parece prometedor, está claro que se necesitan más estudios de investigación que esclarezcan la utilidad clínica de estos productos para tratar problemas articulares. También sería necesario llevar a cabo verdaderos ensayos clínicos aleatorios, prospectivos, controlados, multicéntricos y a doble ciego para poder discernir si realmente las terapias biológicas con PRP son de utilidad en el tratamiento de trastornos articulares (Foster et al., 2009; Fortier et al., 2011; Kon et al., 2011a).

5.3. Empleo del PRP en lesiones de músculo

Las lesiones musculares, ya sean causadas por contusión o tirón muscular, son un problema ortopédico muy común y que impide a la persona afectada desarrollar una actividad física normal. Estas lesiones musculares ocurren con mayor frecuencia en practicantes de deportes que implican contacto, carreras explosivas, saltos y aceleraciones bruscas, y en muchos casos son responsables de la mayor parte de los días de inactividad deportiva en estos atletas (Kon et al., 2011a). A pesar de la importancia de este tipo de lesiones, el tratamiento sigue siendo conservador en la mayoría de los casos. Las recomendaciones más comunes son reposo, aplicación de hielo, vendajes compresivos y elevación de la zona lesionada (Mishra et al., 2009b; Sánchez et al., 2009c). El PRP contiene buena parte de las proteínas bioactivas que intervienen en los procesos de cicatrización tisular, y ha sido propuesto como un tratamiento potencial para acelerar el proceso cicatricial e incrementar la calidad del tejido reparado (Sánchez et al., 2009c; Kon et al., 2011a).

5.3.1. Estudios experimentales

Diversos estudios experimentales han puesto de manifiesto que determinados factores de crecimiento juegan un papel importante en la regulación de la regeneración muscular y en la miogénesis. El b-FGF, el IGF-I y el NGF son sustancias capaces de incrementar la regeneración muscular y mejorar la fuerza muscular en músculo lesionado (Kasemkijwattana et al., 2000). El b-FGF y el IGF-I también son potentes estimulantes de la proliferación de los mioblastos, y su aplicación *in vivo* ha mostrado mejorar la cicatrización e incrementar la fuerza muscular (Menetrey et al., 2000). El b-FGF, así como el VEGF, produjeron un incremento local de la angiogénesis tras su aplicación en un modelo experimental de daño muscular en el gastrocnemio de ratas (Efthimiadou et al., 2006). La neutralización de b-FGF, IGF-I y TGF- β 1 en el músculo de ratón lesionado produjo una atenuación de la respuesta cicatricial, lo que indicó el importante papel que estos factores de crecimiento desempeñan en el proceso de cicatrización muscular (Lefaucheur et al., 1996).

Desafortunadamente, existen muy pocos estudios experimentales *in vivo* en los que se evalúe el efecto del PRP sobre el proceso de cicatrización muscular. Uno de estos pocos estudios fue llevado a cabo por Hammond y colaboradores (2009). Estos autores inyectaron PRP en un modelo experimental de daño muscular en el músculo tibial craneal de ratas. Estos autores observaron que la aplicación local de PRP acortaba el periodo de recuperación tras el daño muscular, debido a que los factores de crecimiento contenidos en el PRP estimulaban la miogénesis (Hammond et al., 2009).

5.3.2. Estudios clínicos

La aplicación de PRP para el manejo de lesiones musculares ha sido propuesta recientemente, y existe una importante carencia de estudios clínicos al respecto. Cugat y colaboradores (2005) fueron de los primeros autores en presentar resultados clínicos del empleo de PRGF para el manejo de lesiones musculares. Estos autores presentaron una serie de casos clínicos de 14 atletas profesionales con daño muscular agudo en el congreso de la International Society of Arthroscopy, Knee Surgery, and Orthopaedic Sports Medicine celebrado en Florida (EEUU) en 2005. Este grupo de atletas incluyó 8 jugadores de fútbol y 6 jugadores de baloncesto, haciendo un total de 16 lesiones musculares. Todas las lesiones ocurrieron como consecuencia de un traumatismo mecánico directo. La zona de la lesión fue localizada ecográficamente y se evacuó el hematoma existente. El PRGF fue inyectado posteriormente de manera ecoguiada justo en la zona donde estaba el hematoma. La vuelta a la actividad deportiva fue más rápida en los pacientes tratados con PRGF en comparación con los tiempos esperados para lesiones similares tratadas de manera convencional, y los estudios ecográficos de seguimiento confirmaron una cicatrización progresiva de la lesión muscular (Foster et al., 2009). En el segundo World Congress of Regenerative Medicine celebrado en Leipzig (Alemania) en 2005, Sánchez y colaboradores presentaron una serie de 20 casos clínicos de deportistas profesionales que presentaban lesiones musculares de diferente gravedad y en diversas localizaciones anatómicas, todas ellas tratadas con inyecciones ecoguiadas de PRGF previa aspiración del hematoma. Los autores describieron que los deportistas retomaron su actividad física normal en la mitad de tiempo de lo esperado para el tipo de lesión muscular que padecían. Además, no apareció ningún caso de fibrosis cicatricial ni se detectaron recaídas una vez que los deportistas volvieron a su

actividad física normal (Sánchez et al., 2005). Más recientemente Loo y colaboradores (2009) han publicado un caso clínico de una ruptura del músculo aductor largo en un deportista, que fue tratado con inyecciones de PRP semanales durante 3 semanas. Estos autores también observaron que el paciente pudo volver al entrenamiento deportivo de una manera más rápida de lo esperado. Es necesario tener en cuenta que estos autores describen un único caso clínico (Loo et al., 2009).

A pesar de estos resultados clínicos preliminares tan prometedores, en los que se han observado importantes descensos en el tiempo de recuperación, es necesario esclarecer una serie de aspectos muy importantes con respecto a la pauta de tratamiento de estas aplicaciones de PRP. Parece que la aplicación intralesional es la vía más razonable para administrar el PRP, pero es importante clarificar en qué momento, qué volumen, qué dosis, y con qué frecuencia deben ser administradas estas inyecciones de PRP (Kon et al., 2011a). En cuanto a la dosis de PRP aplicada, se han despertado una serie de preocupaciones con respecto a la concentración de determinados factores de crecimiento contenidos en el PRP. Altas concentraciones de algunos factores de crecimiento como el TGF- β 1 se han relacionado con la formación de fibrosis cicatriciales extensas, de modo que un incremento exacerbado en los niveles de este factor de crecimiento tras la aplicación de PRP podrían ser perjudiciales, y teóricamente podría producir una contracción fibrótica de la cicatrización muscular (Chan et al., 2005). Estas cicatrices fibróticas tras la lesión muscular pueden incrementar la tasa de recidivas, y por ello algunos investigadores han recomendado precaución cuando se considere emplear estos tratamientos en deportistas con lesiones musculares (Foster et al., 2009).

El empleo del PRP para el tratamiento de lesiones musculares sufrió un duro revés cuando la World Anti-Doping Agency (WADA), en el año 2010, declaró ilegal el uso de “preparaciones ricas en plaquetas (por ejemplo, PRP) administradas por vía intramuscular” (The World Anti-Doping Code: The 2010 Prohibited List). Esta agencia consideró que la administración intramuscular de PRP podría suponer una fuente sistémica de factores de crecimiento que podría incrementar el rendimiento físico de los atletas de una manera fraudulenta (Borrione et al., 2010). Algunos autores incluso sugirieron que el tratamiento local con PRP podía tener efectos sistémicos, probablemente influenciando la homeostasis de determinados factores de crecimiento y citoquinas circulantes (Banfi et al., 2006). Por el contrario, otros autores han afirmado

que no es probable que la administración local de PRP proporcione un incremento en el rendimiento físico del atleta, ya que esos factores de crecimiento no unidos a proteínas tendrían una vida media demasiado corta como para producir ningún efecto anabolizante (Creaney y Hamilton, 2008). Finalmente, tras una discusión más intensa a lo largo del año 2010, la WADA ha clarificado que las formulaciones del PRP (tal y como se conocen hoy día) no incrementan de una manera significativa el crecimiento muscular más allá de la propia respuesta fisiológica del músculo. Por ello, y porque el uso terapéutico de inyecciones de PRP no viola el espíritu del deporte, la WADA retiró en el año 2011 de su lista de sustancias prohibidas la aplicación intramuscular de inyecciones de PRP (Mei-Dan et al., 2010b).

Harmon (2010) ha publicado recientemente una serie de consideraciones o recomendaciones que deberían de tenerse en cuenta si se decide administrar PRP para el tratamiento de lesiones musculares, y que tienen en cuenta aspectos importantes de la fisiopatología de la cicatrización muscular. Este autor recomienda que el PRP no debería de aplicarse en las primeras 24 horas tras el daño, que se debería de usar un producto pobre en leucocitos para así mitigar los posibles efectos proinflamatorios liberados por estas células, y que un PRP con una alta proporción de plasma tendría mayores niveles de IGF-I, y potencialmente incrementaría la cicatrización y disminuiría la fibrosis (Harmon, 2010).

Por desgracia, aún existen numerosas lagunas acerca de la respuesta fisiológica del tejido muscular dañado frente al PRP, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios experimentales básicos que ayudasen a comprender estos mecanismos de reparación tisular del músculo. Esta aplicación del PRP para el manejo de lesiones musculares es muy prometedora, pero está claramente poco investigada. Actualmente no existen estudios clínicos con una suficiente potencia estadística que evalúen de una manera seria y fiable el efecto de las inyecciones de PRP en el proceso de cicatrización muscular (Andía et al., 2011).

5.4. Empleo del PRP en lesiones de ligamentos

Cuando se habla de lesiones de ligamentos, buena parte de la atención recae sobre la articulación de la rodilla y los ligamentos que la componen. La rodilla está sometida a grandes fuerzas durante la actividad física, y es con diferencia la articulación que con más frecuencia sufre lesiones relacionadas con el deporte. Buena parte de estas lesiones de rodilla se relacionan con estructuras ligamentosas, como es el caso del ligamento cruzado anterior (Kon et al. 2011a). La lesión del ligamento cruzado anterior, ya sea por rotura total o parcial del mismo, constituye una entidad clínica de gran importancia en la traumatología y ortopedia, y suele requerir tratamiento quirúrgico en la mayor parte de las ocasiones, además de un largo periodo de rehabilitación. En muchas ocasiones, este tipo de lesión acaba produciendo una disminución permanente de la funcionalidad de la rodilla, ocasionando graves pérdidas de rendimiento o incluso comprometiendo seriamente la vida deportiva del atleta. Además, esta rodilla acabará desarrollando un proceso de osteoartritis en buena parte de los individuos que han sufrido este tipo de lesión (Kon et al. 2011a). Para ilustrar la importancia de la lesión del ligamento cruzado anterior, basta con mencionar que en EEUU se operan más de 100.000 ligamentos cruzados cada año, con un coste total anual que ronda los mil millones de dólares (Sánchez et al., 2009c).

En Medicina Humana, la cirugía para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior consiste en la sustitución de este ligamento roto por un autoinjerto de tendón. Uno de los principales objetivos que tienen las nuevas terapias biológicas en la cirugía del ligamento cruzado anterior es prevenir el deterioro del autoinjerto de tendón tras la reconstrucción del ligamento, así como acelerar el proceso de ligamentización (transformación del tendón en una estructura similar al ligamento) (Kon et al., 2011a). Otro de las dificultades que tiene la técnica quirúrgica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior es conseguir un anclaje seguro y fuerte del injerto, que permita una vuelta precoz a la actividad física (Kon et al., 2011a). Uno de los injertos tendinosos que más se emplea para reconstruir el ligamento cruzado anterior es el injerto de hueso-tendón rotuliano-hueso. Este tipo de injerto presenta la ventaja de proporcionar un muy buen anclaje del injerto, ya que se produce la osteointegración de los extremos del injerto sobre unos túneles previamente perforados en el fémur y tibia. Pero por el

contrario, este tipo de injerto se asocia con problemas de morbilidad de la zona donante, y por ello algunos autores prefieren usar un injerto tendinoso de los isquiotibiales. Cuando se emplea un injerto de isquiotibiales, el anclaje del injerto se debe de producir directamente entre tendón y hueso, y este proceso normalmente es más lento y tiene más posibilidades de fallar que cuando este anclaje se debe de producir entre hueso y hueso (Kon et al., 2011a). Actualmente, para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior roto, se pueden emplean injertos de hueso-tendón rotuliano-hueso, o bien injertos de tendón isquiotibial. En este tipo de cirugías, el PRP se emplea con el objetivo de intentar conseguir una cicatrización más rápida de los extremos del injerto con el hueso (hueso-hueso en el caso del injerto hueso-tendón-hueso, y tendón-hueso en el caso del injerto isquiotibial), y una ligamentización más rápida y eficaz del injerto empleado para sustituir al ligamento roto (Mei-Dan et al., 2010b).

Además de las lesiones del ligamento cruzado anterior, el ligamento colateral medial de la rodilla constituye otra estructura que se lesiona con relativa frecuencia. Las lesiones del ligamento colateral medial de la rodilla tienen gran importancia entre la población de atletas, y pueden provocar pérdidas de rendimiento deportivo. El PRP se puede emplear para acelerar y mejorar el proceso de cicatrización de este ligamento, y por tanto disminuir el tiempo de recuperación, incrementar el bienestar del paciente, acortar el periodo de rehabilitación, y mejorar la estabilidad de la rodilla (Kon et al., 2011a).

5.4.1. Estudios experimentales

Antes de que se plantease el empleo del PRP para el tratamiento de lesiones ligamentosas o se emplease en la técnica quirúrgica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior, diversos estudios experimentales evaluaron el efecto de diferentes factores de crecimiento exógenos sobre el proceso de cicatrización ligamentosa. De esta manera, una serie de estudios llevados a cabo por un mismo grupo de investigadores estudió el efecto de la aplicación conjunta de TGF- β 1 y EGF exógenos sobre un modelo experimental de reconstrucción del ligamento cruzado anterior en conejos mediante el empleo de un injerto autólogo de hueso-tendón-hueso congelado y descongelado. Estos autores observaron que en los injertos tratados con los factores de crecimiento se inhibía el proceso de deterioro de sus propiedades biomecánicas (Sakai et al., 2002; Azuma et

al., 2003). De manera similar, Yasuda y colaboradores (2004) observaron que, tras la aplicación de una combinación de TGF- β 1 y EGF exógenos sobre el injerto hueso-tendón rotuliano-hueso en un modelo de reconstrucción del ligamento cruzado anterior en perro, se producía una mejoría tanto las propiedades estructurales como el aspecto histológico del autoinjerto a los tres meses de la cirugía (Yasuda et al., 2004).

Probablemente uno de los investigadores pioneros en el uso del PRP durante la técnica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior en modelos experimentales es Murray y colaboradores. En un primer estudio, estos autores realizaron un defecto central en el ligamento cruzado anterior en un modelo animal y lo rellenaron usando una matriz de colágeno-PRP. Se observó que los animales tratados con esta matriz de colágeno-PRP presentaron un mayor porcentaje de relleno del defecto, y esos ligamentos tratados presentaron unas mejores propiedades biomecánicas que los controles. Este hallazgo sugería que esa matriz con PRP podría incrementar el proceso de cicatrización del ligamento (Murray et al., 2006). En un modelo experimental porcino de rotura del ligamento cruzado anterior, los ligamentos suturados y tratados con un hidrogel de colágeno-PRP aplicado en el lugar de la rotura quirúrgica mostraron mejoras significativas en sus propiedades biomecánicas a las cuatro semanas en comparación con los ligamentos control que fueron suturados sin más (Murray et al., 2007a). Estudios posteriores sobre un modelos experimentales porcinos de rotura y posterior sutura del ligamento cruzado anterior, o bien de reconstrucción del ligamento cruzado anterior con un autoinjerto de hueso-tendón rotuliano-hueso, han puesto de manifiesto que el empleo de matrices de colágeno-PRP mejora de manera significativa tanto las propiedades histológicas como biomecánicas de los ligamentos reparados (Fleming et al., 2009; Joshi et al., 2009). Este mismo grupo de investigación, sin embargo, ha observado que el empleo de PRP sin la combinación con una matriz de colágeno, resultaba insuficiente para mejorar las propiedades biomecánicas del ligamento reparado (Murray et al., 2009). Más recientemente, y usando un modelo porcino similar al descrito anteriormente, Mastrangelo y colaboradores (2011) encontraron que con concentraciones plaquetarias más bajas (3 veces en comparación con 5 veces los niveles basales) se seguían manteniendo los efectos beneficiosos que esta matriz colágeno-PRP tenía sobre las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados (Mastrangelo et al., 2011).

Sobre un modelo experimental caprino de reconstrucción del ligamento cruzado anterior, se observó que la aplicación de la matriz colágeno-PRP en torno al autoinjerto hueso-tendón rotuliano-hueso mejoró la funcionalidad de la rodilla operada en comparación con los autoinjertos tratados con la matriz de colágeno sin PRP. Sin embargo, las propiedades estructurales del injerto no mejoraban (Spindler et al., 2009).

En un estudio muy interesante, también llevado a cabo por Murray y colaboradores (2007), se realizó una comparativa entre la cicatrización de ligamentos extraarticulares (ligamento colateral medial de la rodilla) y ligamentos intraarticulares (ligamento cruzado anterior). Para ello se realizaron defectos quirúrgicos en dichos ligamentos sobre un modelo experimental canino, y se observó que los ligamentos extraarticulares tendían a cicatrizar de una manera más eficaz que los ligamentos intraarticulares. Este hecho se podía deber a la carencia que existe en los ligamentos intraarticulares de una matriz que mantenga unidos los bordes del ligamento lesionado, y a la existencia de fibrinolisinias intraarticulares que impedían la formación de un coágulo de fibrina que pudiese rellenar de manera eficaz el defecto (Murray et al., 2007b). En este mismo trabajo, también se empleó un hidrogel de colágeno-PRP en la zona de lesión de los ligamentos intraarticulares (ligamento cruzado anterior) y se pudo observar que en los ligamentos donde se colocaba este hidrogel se producía un incremento en el llenado del defecto ligamentoso, con un tejido de reparación muy similar al que se encontró en los defectos creados sobre ligamentos extraarticulares. Esto hacía pensar que el empleo de este hidrogel de colágeno-PRP en las lesiones ligamentosas intraarticulares mejoraba su proceso de cicatrización y lo hacía más similar al que ocurre en ligamentos extraarticulares (Murray et al., 2007b).

Con respecto al empleo de factores de crecimiento en la reparación de lesiones en el ligamento colateral medial de la rodilla, los resultados experimentales no son nada claros. Hildebrand y colaboradores (1998) observaron una mejoría en las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados con PDGF en un modelo de rotura del ligamento colateral medial de conejo (Hildebrand et al., 1998). Sin embargo, Spindler y colaboradores demostraron que una administración única de una combinación de PDGF y TGF- β 2 no produjo ningún cambio significativo en las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados, en un modelo de rotura de ligamento colateral medial de la rodilla en conejo; e incluso observaron que la administración continuada de TGF- β 2

producía un empeoramiento de los parámetros mecánicos de los ligamentos tratados (Spindler et al., 2002; Spindler et al., 2003).

5.4.2. Estudios clínicos

El Dr. Mikel Sánchez fue pionero en emplear el PRGF en procedimientos quirúrgicos de reconstrucción del ligamento cruzado anterior en casos clínicos. En el año 2003, este autor y su grupo de colaboradores ya describieron como el ligamento roto era eliminado mediante artroscopia, y se reconstruía el ligamento mediante el empleo de un autoinjerto de tendón que era inyectado previamente con PRGF. Usando esta metodología, Sánchez y colaboradores (2003) publicaron una serie de 50 casos retrospectivos donde los autores observaron que se incrementaba la cicatrización y aparecían menos complicaciones, y además se mejoraba la funcionalidad de los pacientes (Sánchez et al., 2003). Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas impregnaban el autoinjerto de tendón, y esto favorecía la neovascularización y la ligamentización, lo que resulta de vital importancia para que el autoinjerto reprodujese las funciones biomecánicas del ligamento sustituido (Anitua et al., 2006a). Recientemente, estos mismos autores han publicado un estudio de casos-control donde trataron los injertos tendinosos de isquiotibial con PRGF, y tomaron una biopsia durante una artroscopia de revisión transcurridos varios meses de la cirugía. Las artroscopias de revisión mostraron que los injertos tratados con PRGF presentaban un mejor aspecto artroscópico que aquellos injertos no tratados. Además de esto, los resultados de las biopsias evidenciaron que los injertos tratados con PRGF presentaron un mayor grado de ligamentización y un aspecto histológico más parecido al del ligamento normal (Sanchez et al., 2010).

Los hallazgos encontrados por Sánchez y colaboradores fueron confirmados mediante resonancia magnética por Radice y colaboradores (2010). Estos autores llevaron a cabo un estudio de casos-control con 50 pacientes sometidos a cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior. En un grupo se empleó PRP, mientras que en otro grupo no se aplicó este tratamiento. La resonancia magnética de las rodillas operadas mostró que los injertos tratados con PRP necesitaban un 48% menos de tiempo para alcanzar el mismo aspecto en resonancia magnética que los injertos sin tratar, lo que daba una idea del potencial de aceleración que proporcionaba el tratamiento con

PRP en el proceso de ligamentización del injerto (Radice et al., 2010). Orrego y colaboradores (2008) también evaluaron mediante resonancia magnética los injertos de tendón usados para la reconstrucción del ligamento, observaron que aquellos en los que se empleó PRP presentaban un mejor proceso de maduración a los seis meses de la cirugía (Orrego et al., 2008). Vogrin y colaboradores (2010) han publicado recientemente un estudio clínico, prospectivo, aleatorio, controlado y doble ciego con 50 pacientes sometidos a cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior: 25 tratados con PRP, y 25 sin tratar. Estos autores cuantificaron el grado de revascularización del injerto tendinoso en la zona osteoligamentosa a nivel del túnel óseo y en la zona ligamentosa a nivel intraarticular mediante el uso de resonancia magnética de contraste. Los autores encontraron que la zona ligamentosa intraarticular no se revascularizaba en ninguno de los dos grupos. Sin embargo, en la zona osteoligamentosa del injerto, los individuos tratados con PRP presentaban un grado de revascularización significativamente mayor que los no tratados (Vogrin et al., 2010).

Sin embargo, existen otros estudios clínicos que no observan tales efectos beneficiosos ni sobre el deterioro del autoinjerto de tendón ni sobre el anclaje en el hueso (Paoloni et al., 2011). En un estudio clínico prospectivo, aleatorio, controlado y con doble ciego, se evaluó el efecto de la aplicación de PRP en la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior mediante la técnica de hueso-tendón rotuliano-hueso. Para ello se aplicó PRP en la porción central del autoinjerto y en los túneles óseos de 50 pacientes sometidos a este tipo de cirugía, y los resultados se compararon con otros 50 pacientes en los que no se empleó PRP. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en un periodo de seguimiento de dos años, ni con respecto a parámetros inflamatorios, ni con respecto a la apariencia del injerto tras el estudio mediante resonancia magnética, ni con respecto a la evaluación clínica del paciente usando escalas de valoración validadas (Valenti Nin et al., 2009). En otro estudio clínico prospectivo, aleatorio y controlado, se evaluó el efecto de la aplicación de PRP en la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior, usando en este caso un autoinjerto de tendón isquiotibial. En este estudio se planteó si el PRP conseguía acelerar la cicatrización entre el tendón y el hueso en la zona de anclaje del injerto. Para ello, los autores emplearon 40 pacientes, y los dividieron aleatoriamente en 4 grupos de estudio de 10 individuos. En un grupo no se administró PRP, en otro grupo se colocó PRP en el túnel femoral, en otro de los grupos

se administró PRP en el túnel femoral e intraarticularmente a las 2 y 4 semanas de la cirugía, y en el último grupo se aplicó PRP activado con trombina en el túnel femoral. Todos los pacientes se sometieron a una resonancia magnética de rodilla a los 3 meses de la cirugía para valorar el grado de fusión en la interfase tendón-hueso del túnel femoral. Los autores observaron que no existían diferencias en la intensidad de la señal de resonancia magnética entre ninguno de los grupos (Silva y Sampaio, 2009). En un estudio preliminar, Ventura y colaboradores (2005) aplicaron PRP en los túneles del fémur y tibia durante un procedimiento de reconstrucción del ligamento cruzado anterior mediante un autoinjerto de tendón isquiotibial, y no observaron diferencias ni clínicas ni funcionales (Ventura et al., 2005). Figueroa y colaboradores (2010) tampoco encontraron diferencias significativas con el empleo de PRP en un estudio de casos-control de reconstrucción del ligamento cruzado anterior mediante injerto de isquiotibial. Estos autores estudiaron el injerto a los 6 meses de la cirugía mediante resonancia magnética, y no observaron diferencias ni en el grado de madurez (ligamentización) ni en el nivel de integración del injerto entre los individuos tratados con PRP y los no tratados (Figueroa et al., 2010).

Estas diferencias tan manifiestas que se observan entre los resultados clínicos de los diferentes estudios podrían ser atribuibles a las diferentes metodologías de obtención del PRP, que hacen que varíe su composición celular y plaquetaria, además de su concentración en factores de crecimiento. Otra causa que podría explicar estas diferencias podría ser las diferencias existentes con respecto a la pauta de administración del PRP (Figueroa et al., 2010). Por ello, resulta complicado hacerse una idea real de la eficacia de estos tratamientos sin que exista un protocolo definido aplicación y una metodología estandarizada de aplicación de este PRP en la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior.

Recientemente, el uso del PRP en el tratamiento de lesiones ligamentosas agudas ha ganado popularidad entre los especialistas en Medicina Deportiva. Tras una lesión de ligamentos, el cuidado médico del atleta de élite persigue una vuelta precoz, pero segura, al entrenamiento y a la competición. Dentro de las lesiones ligamentosas, además de la lesión en el ligamento cruzado anterior, cabe destacar las lesiones del ligamento colateral medial de la rodilla, que son un problema común en futbolistas y en jugadores de fútbol americano (Foster et al., 2009). Dos importantes especialistas en lesiones deportivas (Bert R. Mandelbaum y Michael B. Gerhardt) han llevado a cabo un

estudio no publicado en el cual se evaluó a un grupo de 22 futbolistas profesionales con lesiones agudas del ligamento colateral medial de la rodilla, tratados con una aplicación de PRP dentro de las 72 horas posteriores a la lesión. Estos individuos fueron comparados con un grupo control, en el que los pacientes fueron tratados de manera convencional con reposo y rehabilitación. Los autores observaron que los individuos tratados con PRP regresaron a la actividad deportiva un 27% antes que los individuos tratados de manera convencional (Foster et al., 2009).

Algunos autores también han evaluado el efecto del PRP en lesiones de otros ligamentos, como por ejemplo los desgarros en el ligamento tibioperoneo anterior. Existe un estudio clínico aleatorio y controlado en el que se empleó una inyección ecoguiada de PRP para lesiones de este ligamento en deportistas profesionales, y se observó que los pacientes tratados con PRP volvían antes a la actividad física (Mei-Dan et al., 2010b). Mei-Dan y colaboradores también han publicado el caso clínico de un judoca olímpico que ganó la medalla de oro del Campeonato del Mundo habiéndose lesionado gravemente los ligamentos colaterales mediales del codo tan sólo 6 meses antes, y que había sido tratado con dos aplicaciones de PRP (Mei-Dan et al., 2010b).

Los mecanismos de cicatrización del ligamento son extraordinariamente complejos, y aún se desconocen en buena parte. Determinados factores de crecimiento pueden resultar de utilidad en una determinada fase de la cicatrización, pero quizá no lo son en otros estadios de reparación (Paoloni et al., 2011). Cuando se aplica un tratamiento con PRP sobre un ligamento, se proporcionan un gran número de sustancias bioactivas de manera súbita y en concentración variable, y al igual que pasa en otros tejidos, se desconocen buena parte de los mecanismos biológicos que desencadena esa aplicación de PRP en el ligamento lesionado. Aunque existen diversos estudios de ciencia básica y ensayos experimentales sobre modelos animales que muestran un efecto beneficioso del empleo de PRP o matrices de colágeno-PRP en la cicatrización del ligamento o en las técnicas de reconstrucción del ligamento cruzado anterior, en la actualidad son pocos los estudios clínicos que evalúan de una manera fiable la eficacia del PRP en el tratamiento de problemas ligamentosos (Paoloni et al., 2011).

5.5. Empleo del PRP en lesiones de menisco

Los meniscos son dos estructuras anatómicas de forma semicircular y naturaleza fibrocartilaginosa que se interponen entre el fémur y la tibia. Estos meniscos resultan fundamentales para la buena biomecánica de la rodilla y resultan dañados con frecuencia durante la práctica deportiva (Scordino y DeBerardino, 2012). El menisco es una estructura relativamente avascular y con una cicatrización comprometida, por ello la comunidad científica hace grandes esfuerzos por intentar encontrar terapias que fomenten el proceso de reparación del menisco (Scordino y DeBerardino, 2012). Dentro de estas terapias emergentes que fomentan la cicatrización del menisco encontramos los tratamientos con PRP.

La idea de usar PRP para casos de lesión en el menisco ha aparecido recientemente, a raíz de los prometedores resultados que se están obteniendo con estas terapias en lesiones de ligamento y tendón. Al ser una idea tan novedosa, existen muy pocos estudios experimentales que evalúen el efecto del PRP en la reparación del menisco. De hecho, en la actualidad tan sólo existe un estudio experimental que evalúa el efecto del PRP específicamente en la reparación meniscal. Ishida y colaboradores (2007) sugirieron que el PRP incrementa la regeneración del menisco tanto *in vitro* como *in vivo* (Ishida et al. 2007). Estos autores estudiaron la expresión de ARN mensajero de proteínas de la matriz extracelular producidas por células meniscales cultivadas con PRP, en comparación con células meniscales cultivadas sin PRP. Se observó un incremento significativo de la cantidad de ARN mensajero cuando las células eran cultivadas con PRP. Además de estos hallazgos *in vitro*, estos mismos autores estudiaron el efecto del PRP sobre un modelo experimental en conejo, donde se practicaban desgarros en la región avascular del menisco y posteriormente se trataba con PRP vehiculado en un hidrogel. El estudio histológico de esos meniscos reparados mostró que en aquellos donde se aplicó PRP se había producido una mejor reparación del menisco, en comparación con aquellos que habían sido tratados con plasma pobre en plaquetas o con hidrogel sólo (Ishida et al., 2007).

Por desgracia, en la actualidad no existen estudios clínicos que investiguen el efecto del PRP durante procedimientos de reparación de menisco. Sin lugar a dudas, esta cuestión deberá de ser investigada en un futuro, y los resultados que de ella se

desprendan ayudarán a entender mejor el papel que las terapias con PRP pueden desempeñar en el manejo terapéutico de lesiones meniscales (Scordino y DeBerardino, 2012).

5.6. Empleo del PRP en lesiones de tendón

Esta Tesis Doctoral estudia el efecto del PRGF en un modelo experimental de rotura de tendón, y por ello consideramos fundamental esta sección de la Revisión Bibliográfica. En ella se revisarán las aportaciones científicas que evalúen el efecto del PRP en el proceso de cicatrización tendinosa, tanto a nivel experimental como clínico.

Los problemas de tendón son una de las principales causas de morbilidad de carácter musculoesquelético. Se estima que entre del 30 al 50 % de las lesiones deportivas tienen relación directa con un patología de tipo tendinosa (Andía et al., 2010a). De ahí que en los últimos años la comunidad científica esté haciendo grandes esfuerzos para intentar encontrar terapias eficaces que ayuden a optimizar el tratamiento de este tipo de lesiones. Los prometedores resultados que se han ido obteniendo con la aplicación de PRP para fomentar los procesos de cicatrización tisular no han pasado desapercibidos para los profesionales sanitarios que se ocupan de las lesiones deportivas, y rápidamente han incorporado estos nuevos tratamientos a su arsenal terapéutico. Y probablemente sea en las lesiones del tendón donde más rápidamente se ha extendido su uso clínico, a pesar que cuando se empezaron a emplear por primera vez apenas existían estudios experimentales al respecto (Engebretsen et al., 2010).

El tendón es un tejido pobremente vascularizado, y ésta en una de las causas que hacen que el proceso de cicatrización en este tejido se pueda ver comprometido (Fenwick et al., 2002). Además de esto, los tendones son un tipo de tejido que consume relativamente poca energía y tienen una baja tasa metabólica. Este hecho hace que el tejido tendinoso soporte perfectamente condiciones de tensión durante largo periodo de tiempo, pero por el contrario hace que los procesos que requieren gran actividad metabólica, como el proceso de cicatrización, ocurran más lentamente (Sánchez et al., 2009c).

Teóricamente, el efecto que el PRP ejerce sobre el proceso de cicatrización tendinosa es similar al que ocurre en la cicatrización de cualquier otro tejido. Las plaquetas contenidas en el PRP, una vez activadas, liberan el contenido de sus gránulos plaquetarios. Estos gránulos plaquetarios contienen importantes factores de crecimiento como PDGF, TGF- β , b-FGF, EGF, VEGF, HGF, IGF-I, entre otros, que desempeñan un papel destacado en el proceso de cicatrización del tendón (Molloy et al., 2003). Algunos de estos factores de crecimiento como PDGF y TGF- β tienen potentes efectos quimiotácticos y proliferativos sobre fibroblastos, y a la vez estimulan la síntesis de matriz extracelular por parte de estas células (Woo et al., 1999). Además de estos factores de crecimiento, las terapias con PRP proporcionan otras muchas proteínas bioactivas y estructurales, como por ejemplo fibrina, fibronectina o vitronectina, que facilitan la adhesión intercelular y forman una matriz tridimensional en el lugar de la lesión, que resulta fundamental para una correcta cicatrización del tendón (Andía et al., 2010a).

5.6.1. Estudios experimentales

En la actualidad, los estudios experimentales que evalúan el efecto del PRP en el proceso de cicatrización tendinosa continúan siendo escasos. A pesar de su escasez, estos estudios laboratoriales están demostrando que el tratamiento con PRP mejora de una manera muy prometedora los procesos de cicatrización del tendón.

La migración de células mesenquimales y fibroblastos periféricos hacia la zona de reparación tendinosa resulta fundamental para la correcta cicatrización del tendón, y está influenciada por determinados factores de crecimiento y otras sustancias quimiotácticas (Andía et al., 2010a). Kajikawa y colaboradores (2008) llevaron a cabo un estudio experimental muy interesante en el cual pusieron de manifiesto que el PRP puede estimular la migración de células hacia el tendón que está en fase de reparación. Para ello usaron un modelo experimental de defecto del tendón rotuliano en ratas. En un grupo de animales colocaron una aplicación local de PRP, y utilizaron un marcador fluorescente que identificaba a las células circulantes que habían acudido hasta la zona de reparación. El estudio histológico de los tendones mostró que tanto a los 3 como a los 7 días, la afluencia de células era significativamente mayor en los animales tratados con PRP en comparación con los animales control (Kajikawa et al., 2008). Estos

mismos autores también evaluaron mediante técnicas inmunohistoquímicas la producción de colágeno tipo I y tipo III, y observaron que en los tendones tratados con PRP la inmunorreactividad para estos tipos de colágeno era mayor que en los tendones control, lo que indicaba un incremento en el proceso de cicatrización precoz del tendón (Kajikawa et al., 2008).

Al igual que en otros tejidos, durante las primeras fases del proceso de cicatrización resulta fundamental que se produzca una buena neovascularización en la zona de reparación para que se produzca una cicatrización satisfactoria. Estudios experimentales *in vitro* han puesto de manifiesto que el PRGF estimula la proliferación celular en cultivos de tenocitos y la síntesis de sustancias angiogénicas, como el VEGF y HGF, que actúan de una manera paracrina sobre las células endoteliales promoviendo la angiogénesis (Anitua et al., 2005; Anitua et al., 2006b; Anitua et al., 2007a). En un estudio experimental *in vivo*, Lyras y colaboradores (2009) aplicaron una inyección de PRP sobre un modelo de rotura de tendón de Aquiles en conejo, y estudiaron histológicamente la neovascularización que se producía en la zona de reparación. Estos autores observaron que durante las dos primeras semanas de cicatrización, la angiogénesis era muy superior en los tendones tratados con PRP en comparación con los que habían sido infiltrados con solución salina. Este incremento en la neovascularización durante esas primeras fases de la cicatrización hizo que los tendones tratados con PRP presentasen un mejor tejido de reparación desde el punto de vista histológico a las 4 semanas (Lyras et al., 2009b).

La proliferación celular en la zona de reparación durante los primeros estadios del proceso de curación es crucial para una buena cicatrización tendinosa. Conseguir de manera rápida un gran número de fibroblastos hace que se incremente de manera proporcional la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Andía et al., 2010b). Anitua y colaboradores llevaron a cabo estudios *in vitro* en los que cultivaron tenocitos humanos en presencia de PRGF, y observaron un incremento significativo de la proliferación celular en comparación con los cultivos no expuestos a PRGF (Anitua et al., 2005; Anitua et al., 2006b; Anitua et al., 2007a). Además de este incremento en la proliferación de los fibroblastos, en los cultivos de fibroblastos expuestos a PRGF se indujo la síntesis de importantes proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno o el ácido hialurónico (Anitua et al., 2009b). Estos mismos autores también estudiaron el efecto que tenía el PRGF sobre la proliferación celular *in vivo*. Para ello practicaron

inyecciones semanales de PRGF en el tendón de Aquiles de ovejas sin ningún tipo de patología tendinosa. En otro grupo experimental inyectaron solución salina. A las cuatro semanas se eutanasiaron los animales y se estudiaron histológicamente los tendones. Los tendones inyectados con PRGF presentaron un incremento significativo en la densidad celular y una mayor neovascularización que los tendones infiltrados con solución salina (Anitua et al., 2006b).

Existen una serie de estudios *in vitro* que han puesto de manifiesto el efecto positivo que ejerce el PRP sobre los procesos anabólicos de los tenocitos. Schnabel y colaboradores (2007) publicaron un trabajo donde se demostró que los cultivos de tenocitos procedente del tendón flexor digital superficial de caballo expuestos a PRP expresaban en mayor proporción genes responsables de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno tipo I, colágeno tipo III) sin que existiese una sobreexpresión de genes catabólicos, como los de las metaloproteasas de la matriz (MMP-3 y MMP-13) (Schnabel et al., 2007). Este mismo grupo de investigadores, en un estudio posterior, determinó que el PRP liberó factores de crecimiento de una manera sostenida durante al menos 4 días (McCarrel y Fortier, 2009). Además, también se informó que los cultivos celulares de tendón expuestos a PRP presentaron un patrón de expresión de genes más favorable para los procesos de reparación tendinosa que los cultivos expuestos a aspirados de médula ósea (McCarrel y Fortier, 2009).

Otro grupo de investigadores llevó a cabo un estudio *in vitro* empleando cultivos de tenocitos humanos. Estos autores encontraron que los cultivos expuestos a PRP presentaron una mayor proliferación celular, una mayor síntesis de colágeno, y una mayor expresión de genes relacionados con la síntesis de factores de crecimiento y de enzimas relacionadas con los procesos de remodelación tisular (de Mos et al., 2008). Visser y colaboradores (2010) encontraron unos resultados tras estudiar el comportamiento de los tenocitos cultivados sobre unas matrices sintéticas en las que se añadía PRP. Estos autores observaron que sobre estas matrices con PRP se producía una mayor proliferación celular y se incrementaba la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Visser et al., 2010). Pero el PRP no solo parece fomentar la proliferación celular y la síntesis proteica de los tenocitos. Sorprendentemente, un estudio publicado en 2011 informó que los cultivos de tenocitos expuestos a PRP no experimentaban los efectos adversos que fármacos como el ciprofloxacino o la dexametasona ejercen sobre esta estirpe celular (Baboldashti et al., 2011).

Morizaki y colaboradores (2010) llevaron a cabo un interesante estudio *in vitro* de reparación de tendones flexores caninos. Un grupo de tendones fue reparado usando simplemente una sutura (grupo control), mientras que en los grupos tratamiento se compararon los siguientes protocolos: reparación usando parche de colágeno, parche de colágeno junto con PRP, parche de colágeno junto con células mesenquimales de médula ósea, y por último parche de colágeno junto con PRP y células mesenquimales de médula ósea. El grupo de tendones donde se combinó el parche de colágeno con PRP y células mesenquimales de médula ósea fue el que obtuvo los mejores resultados de resistencia biomecánica (Morizaki et al., 2010). Estos resultados hacen pensar que la combinación PRP/células mesenquimales de médula ósea puede constituir una poderosa asociación con la que poder tratar los problemas tendinosos en un futuro.

Uno de los primeros estudios *in vivo* que evaluó el efecto del PRP en las lesiones de tendón fue llevado a cabo por Aspenberg y Virchenko (2004). Estos autores crearon un modelo experimental de defecto en el tendón de Aquiles de ratas, e inyectaron percutáneamente un concentrado plaquetario en dicho defecto. Las propiedades biomecánicas del callo tendinoso de los animales tratados se incrementó en torno a un 30% en la primera semana, y esta mejoría se mantuvo hasta la tercera semana. En vista a estos primeros resultados experimentales, los autores sugirieron que el PRP podría resultar de utilidad en el tratamiento de lesiones tendinosas (Aspenberg y Virchenko, 2004). Posteriormente, Virchenko y colaboradores volvieron a estudiar el efecto de la aplicación local de PRP en un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en rata. Estos trabajos mostraron que los tendones tratados con PRP presentaban un mejor proceso de cicatrización y unas mejores propiedades biomecánicas que los tendones no tratados (Virchenko y Aspenberg, 2006, Virchenko et al., 2006). Estos autores también destacaron en uno de sus estudios que para que el proceso de cicatrización tendinosa se llevase a cabo de una manera eficaz resultaba imprescindible que esos tendones tratados con PRP fueran sometidos a estímulo mecánico adecuado (Virchenko y Aspenberg, 2006).

Lyras y colaboradores son otro de los grupos de investigadores que han estudiado el efecto del PRP en la cicatrización del tendón. Estos autores emplearon en sus estudios modelos experimentales de defectos quirúrgicos creados en el tendón

rotuliano de conejos (Lyras et al., 2009a; Lyras et al., 2010a; Lyras et al., 2010c) , o bien modelos de rotura del tendón de Aquiles en esta misma especie (Lyras et al., 2009b; Lyras et al., 2010c; Lyras et al., 2011). En un primer estudio, estos autores aplicaron PRP sobre un defecto central en el tendón rotuliano de conejos. Los tendones tratados con PRP mostraron un incremento significativo de sus propiedades biomecánicas en las primeras semanas tras la cirugía. Esta mejoría en la biomecánica de los tendones tratados con PRP también se acompañó de un mejor aspecto histológico de estos tendones (Lyras et al., 2009a). Estos primeros hallazgos pusieron de manifiesto el importante papel que puede desempeñar el tratamiento con PRP en las primeras fases de la cicatrización tendinosa, y animaron a este grupo de investigadores a seguir trabajando en esta línea. Un estudio publicado al año siguiente sobre este mismo modelo experimental puso de manifiesto que los tendones tratados con PRP presentaron un incremento significativo de la angiogénesis durante las primeras dos semanas tras la cirugía, y posteriormente disminuía la densidad de vasos sanguíneos más rápidamente que en los tendones control. Estos hallazgos histológicos indicaban que la aplicación de PRP produjo una aceleración en proceso de cicatrización tendinoso. Además, también se observó que los tendones tratados con PRP mostraron una mayor expresión del IGF-I que los tendones control, sobre todo en las primeras fases de la cicatrización (Lyras et al., 2010b).

En el año 2009, Lyras y colaboradores publicaron un trabajo, en este caso sobre un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles de conejos, donde se informó que la aplicación de PRP podía fomentar los procesos de angiogénesis en los primeros estadios de la cicatrización tendinosa. Esta mejor vascularización al principio de la reparación podía resultar clave para que los tendones tratados con PRP presentasen una aceleración en el proceso de cicatrización y una mejoría histológica en la calidad de la cicatriz resultante (Lyras et al., 2009b). Sobre este mismo modelo experimental, se estudió la expresión de TGF- β 1 en el tejido cicatricial tras la aplicación de PRP. Estos autores informaron que la administración de PRP produjo, tanto en la primera como en la segunda semana tras la cirugía, un incremento significativo en la expresión de TGF- β 1, mientras que en la tercera y cuarta semana, la expresión de este factor de crecimiento fue menor que la detectada en los tendones control. Este cambio temporal en la expresión de TGF- β 1 se vio acompañado de una mejoría en la calidad histológica de los tendones tratados con PRP a lo largo del periodo de estudio. Estos resultados

sugieren que la administración de PRP en el tendón podría alterar el patrón de expresión de TGF- β 1, y es esta manera mejorar el proceso de cicatrización tendinosa (Lyras et al., 2010c). Más recientemente, y de nuevo sobre un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles, Lyras y colaboradores han encontrado que la aplicación de PRP produjo una mayor expresión de IGF-I en el tendón reparado durante las primeras fases de la cicatrización. Este hallazgo inmunohistoquímico se acompañó de una mejoría histológica en el proceso de cicatrización en los tendones tratados con PRP en comparación con los tendones control (Lyras et al., 2011).

Recientemente, Bosch y colaboradores (2010) evaluaron el efecto del PRP sobre la cicatrización del tendón, usando para ello un modelo experimental equino donde se creaba quirúrgicamente un daño en el tendón flexor digital superficial de ambas extremidades anteriores. A los siete días de la creación del defecto se aplicó una inyección ecoguiada de PRP justo en la zona del daño tendinoso en una extremidad, mientras que en la otra se inyectó solución salina. Veinticuatro semanas tras la cirugía, se extrajeron los tendones, y se estudió el proceso de cicatrización tendinosa desde el punto de vista bioquímico, biomecánico, e histológico. Estos autores informaron que la aplicación de PRP en el tendón lesionado hizo que se produjese un incremento en la actividad metabólica del tejido reparado, que mejorasen sus propiedades biomecánicas, y que se presentase un mejor aspecto histológico que los tendones inyectados con placebo (Bosch et al., 2010). En otra publicación sobre este mismo modelo experimental, estos autores informaron que los tendones tratados con PRP presentaron un mayor grado de neovascularización que los tendones tratados con placebo. El nivel de vascularización fue determinado por medio de ecografía Doppler color a lo largo del periodo de estudio, y mediante técnicas inmunohistoquímicas tras la eutanasia de los animales. Los autores señalan que este incremento en la neovascularización producido por la administración de PRP podría explicar cómo una única administración de PRP hizo que los tendones presentasen un mejor proceso de cicatrización incluso 23 semanas tras el tratamiento (Bosch et al., 2011a). Estos mismos autores también emplearon un análisis computerizado de las imágenes ecográficas del tendón a lo largo del periodo de estudio para monitorizar el proceso de cicatrización. Empleando esta metodología, se observó que los tendones tratados con PRP presentaron un aspecto ecográfico de cicatrización más avanzado que los tendones tratados con solución salina (Bosch et al., 2011b).

Sarrafian y colaboradores (2011) publicaron un trabajo en el cual se evaluó el efecto del PRP sobre la cicatrización tendinosa, usando para ello un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en oveja. En este estudio, los investigadores no solo evaluaron el PRP, sino que también usaron una matriz dérmica porcina acelular, y la combinación de ambos productos. A las 24 semanas de la cirugía se extrajeron los tendones, y se estudiaron tanto histológica como biomecánicamente. Los tendones donde se empleó la matriz dérmica porcina acelular para incrementar la reparación, tanto sola como en combinación con PRP, presentaron un mejor proceso de cicatrización que los tendones no tratados (Sarrafian et al., 2010).

Recientemente, un grupo de investigadores ha publicado un trabajo donde evaluaron el efecto del PRP en un modelo experimental de rotura completa del tendón rotuliano en ratas. Tras la estabilización del tendón seccionado por medio de una sutura, unos tendones fueron tratados con PRP y otros fueron tratados con solución salina. A las dos semanas los tendones fueron estudiados histológica y biomecánicamente. Los autores observaron que los tendones tratados con PRP presentaron unas ligeras mejoras en las propiedades mecánicas y la calidad histológica del tejido de reparación. Es necesario mencionar que en este último estudio hubo un subgrupo de tendones tratados con PRP en los que no se observaron diferencias con respecto a los tendones tratados con solución salina. Los autores argumentaron que durante el procedimiento de obtención del PRP en esos animales no se consiguió un enriquecimiento plaquetario adecuado (Spang et al., 2011).

Kim y colaboradores (2011) evaluaron el efecto de una mezcla de PRP y BMP-2 sobre el proceso de cicatrización en la unión tendón-hueso. Los autores emplearon un modelo experimental sobre conejo, donde cortaban el tendón de Aquiles justo a nivel de su inserción en el hueso calcáneo. A continuación reparaban esta rotura mediante una sutura y aplicaban la mezcla PRP/BMP-2. Estos investigadores informaron que esta combinación aceleró el proceso de cicatrización entre tendón y hueso, y además, a las ocho semanas de la cirugía, se observó un incremento de la fuerza biomecánica de la reparación (Kim et al., 2011).

Uno de los posibles mecanismos que podrían explicar cómo la aplicación de PRP fomenta los procesos de cicatrización tendinosa has ido publicado recientemente.

Un estudio *in vitro* ha puesto de manifiesto que el PRP hace que las “células madre de tendón” (*tendon stem cells*), una nueva estirpe celular recientemente descubierta, se diferencien hacia tenocitos activos, con una gran capacidad proliferativa y de síntesis de proteínas estructurales (Zhang y Wang, 2010).

5.6.2. Estudios clínicos

La aplicación de preparaciones ricas en plaquetas para el tratamiento de lesiones tendinosas en estudios clínicos tan solo ha sido formalmente evaluada en los últimos 4-5 años. Según hemos visto, los resultados de los estudios experimentales con respecto al empleo del PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas son muy prometedores. Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos no son tan concluyentes. Mientras que en unos trabajos se recomienda el empleo de PRP para tratar estas patologías tendinosas, en otros sin embargo no se detecta ningún efecto beneficioso tras la aplicación de PRP (Taylor et al., 2011). Esta gran variabilidad de resultados probablemente sea debida a la gran heterogeneidad existente entre los diferentes trabajos con respecto a la metodología de preparación del PRP (diferente volumen de sangre extraído, diferente volumen de PRP obtenido, diferente composición celular, diferente concentración en factores de crecimiento, diferentes sistemas comerciales para la separación del PRP, diferentes activadores plaquetarios) y los métodos de aplicación de este PRP (inyección, en forma de gel, combinado con una matriz sintética, en forma de membrana de fibrina) (Taylor et al., 2011). Por todo ello, es razonable el pensar que esta falta de homogeneidad haga de los diferentes productos aplicados sobre una determinada lesión tendinosa puedan producir efectos biológicos muy diferentes (Anitua et al., 2009a).

En esta sección de la revisión bibliográfica estudiaremos las diferentes patologías tendinosas que han sido tratadas con aplicaciones de PRP en estudios clínicos. Básicamente estas patologías se podrían englobar en los siguientes subapartados: rotura del tendón de Aquiles, tendinopatía del tendón de Aquiles, tendinopatía del codo, tendinopatía del tendón rotuliano, y reparación del manguito rotador. Por último, comentaremos su uso en lesiones tendinosas de caballos de deporte.

5.6.2.1. Rotura del tendón de Aquiles

El primer autor que informó del empleo de PRGF durante el procedimiento de reparación de roturas del tendón de Aquiles en casos clínicos fue el Dr. Mikel Sánchez y colaboradores en el año 2007 (Sánchez et al., 2007). Estos autores encontraron muy buenos resultados tras el empleo de PRGF como tratamiento adyuvante de la cirugía de reparación de rotura del tendón de Aquiles. El PRGF fue inyectado en los bordes del tendón roto durante la cirugía, y además se colocó una matriz de fibrina preparada a partir de PRGF recubriendo la zona de la reparación. Se trataba de un estudio de casos control retrospectivo donde se incluyeron 12 deportistas con rotura del tendón de Aquiles; 6 de ellos donde se empleo PRGF y otros 6 donde no se usó este producto. El grupo de pacientes tratados con PRGF recuperaron antes el rango de movilidad total del tobillo (7 semanas frente a 11 semanas), comenzaron a trotar en menos tiempo (11 semanas frente a 18 semanas) y se incorporaron a los entrenamientos de manera más precoz (14 semanas frente a 22 semanas). Además de estas claras mejorías funcionales, los tendones tratados con PRGF presentaron una menor área de corte transversal medida desde el punto de vista ecográfico, indicando un proceso de reparación más fisiológico. Ninguno de los pacientes del grupo PRGF presentó complicaciones asociadas con este tratamiento (Sánchez et al., 2007). Estos mismos autores describieron en otro estudio el empleo simultáneo de matrices construidas a partir de PRGF junto con inyecciones de PRGF para el tratamiento de dos casos clínicos de complicaciones tras la rotura del tendón de Aquiles (infección profunda el tejido tendinoso junto con importante pérdida de sustancia). En uno de los casos clínicos el atleta pudo volver a la actividad a las 14 semanas, mientras que en el otro caso fueron necesarias 28 semanas para retomar el entrenamiento. Los estudios ecográficos de seguimiento y la resonancia magnética pusieron de manifiesto que la zona de la lesión se fue rellenando progresivamente de tejido de reparación (Sánchez et al., 2009a).

Más recientemente, Filardo y colaboradores (2010) han publicado un caso clínico de un deportista profesional que sufrió una rotura parcial de su tendón de Aquiles y fue tratado de manera conservadora mediante la aplicación de inyecciones de PRP, hielo y posteriormente un programa de rehabilitación. Se usaron un total de tres inyecciones de PRP, una por semana. El paciente volvió a la actividad deportiva de

competición a los 64 días de la lesión, y en los siguientes 18 meses ha seguido compitiendo sin tener que recibir tratamiento extra en su tendón (Filardo et al., 2010b).

Por el contrario, un artículo reciente publicado por Schepull y colaboradores (2010) ha sugerido que la aplicación de PRP no es útil como tratamiento adyuvante en el manejo de individuos con rotura del tendón de Aquiles (Schepull et al., 2011). Este trabajo se trata de un estudio clínico aleatorio y controlado, que incluyó 30 pacientes en los que se practicó cirugía para la reparación del tendón de Aquiles. En 16 pacientes se empleó PRP, y en 14 pacientes no se empleó este tratamiento. No se detectaron diferencias significativas entre las propiedades elásticas de los tendones tratados con PRP y los tendones control. Tampoco se encontraron diferencias con respecto al índice de elevación del talón, e incluso los individuos tratados con PRP presentaron una peor funcionalidad al año (según el índice Achilles Tendon Total Rupture Score). Los autores comentaron que encontraron un alto grado de variabilidad en las propiedades mecánicas de los tendones, que no podía ser explicado únicamente como consecuencia de errores en las medidas (Schepull et al., 2011). Consideramos que es importante aclarar que la metodología de preparación del PRP en este trabajo dista mucho de la metodología usada en el estudio de Sánchez y colaboradores (2007).

5.6.2.2. Tendinopatía crónica del tendón de Aquiles

Los procesos degenerativos crónicos del tendón de Aquiles son un problema relativamente frecuente, relacionado en muchas ocasiones con roturas posteriores del tendón de Aquiles (de Vos et al., 2010). El empleo de PRP ha sido propuesto como un tratamiento conservador para intentar mejorar la funcionalidad y signos clínicos de los pacientes con esta tendinopatía. En un estudio clínico, prospectivo, aleatorio, controlado y doble ciego, de Vos y colaboradores (2010) incluyeron un total de 54 pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles. Veintisiete pacientes recibieron una inyección de PRP bajo guía ecográfica en la zona de la lesión, junto con un programa de ejercicios excéntricos. Otros veintisiete pacientes recibieron una inyección de solución salina y un programa de ejercicios excéntricos. Estos pacientes fueron seguidos y evaluados a las 6, 12 y 24 semanas tras el tratamiento. Los autores no observaron que el tratamiento con PRP produjese diferencias significativas en comparación con el grupo control, ni con respecto a la disminución del dolor en la zona de la lesión ni con

respecto a mejorías en la actividad física de los pacientes en ninguno de los tiempos de seguimiento (de Vos et al., 2010). Posteriormente, estos mismos autores estudiaron, en este mismo grupo de pacientes, si las inyecciones de PRP mejoraban la estructura ecográfica y la neovascularización del tendón de Aquiles. Se observó que la aplicación de PRP junto con un programa de ejercicios excéntricos no produjo ninguna mejoría ni en la estructura ecográfica ni en la neovascularización de los tendones de Aquiles con tendinopatía crónica, en comparación con el grupo de pacientes infiltrados con solución salina y sometidos a un programa de ejercicios excéntricos (de Vos et al., 2011). Estos mismos 54 pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles fueron evaluados de nuevo al año de la aplicación de las inyecciones de PRP o solución salina. Los resultados a largo plazo continuaron en la misma línea que los resultados a más corto plazo, y no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (de Jonge et al., 2011). Los resultados de este estudio clínico, prospectivo, aleatorio, controlado y doble ciego no evidenciaron ninguna mejoría tras el empleo de una inyección de PRP para el tratamiento de tendinopatías crónicas del tendón de Aquiles, ni a corto ni a largo plazo.

Por el contrario, existen otros estudios donde se informa que el empleo de inyecciones de PRP en pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles produce mejorías. En una serie de casos clínicos prospectiva con 14 pacientes que sufrían tendinopatía crónica del tendón de Aquiles se inyectó PRP intratendinoso. El tendón de Aquiles fue evaluado clínicamente mediante el uso de escalas de valoración previamente validadas. También se evaluó la estructura ecográfica del tendón, así como su grado de neovascularización mediante Doppler. El seguimiento se hizo a las 6 semanas, 3, 6 y 18 meses. Durante el proceso de seguimiento se observó una mejoría en la valoración clínica del tendón de Aquiles con respecto al estado previo al tratamiento. Desde el punto de vista ecográfico se produjo una normalización del peritendon, del grosor del tendón, y desaparecieron las lesiones hipoecoicas. Con respecto a la neovascularización, se observó un incremento en la respuesta vascular en el peritendon y en las áreas adyacentes en los primeros controles de seguimiento, pero a partir de los 6 meses la actividad vascular fue disminuyendo progresivamente (Gaweda et al., 2010). En un estudio más reciente, Owens y colaboradores (2011) publicaron una serie de casos clínicos retrospectiva de 10 pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles que fueron tratados con inyecciones intratendinosas de PRP. Todos los

pacientes tenían una valoración funcional y una resonancia magnética del tendón de Aquiles antes del tratamiento. Estos autores informaron que el tratamiento con PRP produjo unas mejorías discretas en la valoración funcional de los tendones, pero sin embargo el aspecto en resonancia magnética de esos tendones apenas se modificó tras el tratamiento (Owens et al., 2011).

5.6.2.3. Tendinopatía del codo

Peerbooms y colaboradores (2010) compararon la aplicación de PRP con la inyección de corticoides para el tratamiento de procesos de epicondilitis lateral en un estudio clínico aleatorio que incluyó un total de 100 pacientes. Estos autores encontraron en el grupo tratado con PRP una mejoría significativa con respecto a la reducción del dolor y la funcionalidad. Además, se observó que las mejorías obtenidas inicialmente con la administración de corticoides desaparecían gradualmente, mientras que en los pacientes tratados con PRP se produjo una mejoría progresiva de la sintomatología (Peerbooms et al., 2010).

Este estudio confirmó los resultados que habían observado previamente Mishra y Pavelko en 2006, que fueron de los primeros en evaluar el efecto de las inyecciones de PRP en el tratamiento de problemas tendinosos. Estos autores llevaron a cabo un estudio clínico con 20 pacientes que sufrían tendinopatía de codo que no respondía a tratamiento convencional. Un grupo de 15 pacientes fueron tratados mediante una inyección intratendinosa única de PRP, mientras que los otros 5 fueron infiltrados con bupivacaína/epinefrina. Los pacientes fueron evaluados durante el postoperatorio usando una escala de valoración visual del dolor y de los signos clínicos. Estos autores encontraron que los pacientes tratados con PRP presentaron una mejoría del 60% en los signos clínicos a las 8 semanas, mientras que en el grupo de pacientes infiltrados con anestésico local tan sólo se observó mejoría del 16%. A los 6 meses, se observó una reducción del 93% de los signos de dolor en los pacientes tratados con PRP. Es importante remarcar que este estudio posee limitaciones, entre las que podemos destacar que los pacientes no eran ciegos al tratamiento, o que son pocos individuos incluidos en este estudio (Mishra y Pavelko, 2006).

5.6.2.4. Tendinopatía del tendón rotuliano

Kon y colaboradores publicaron en 2009 una serie de casos clínicos con 20 deportistas que padecían problemas de tendinopatía del tendón rotuliano con una media de 20 meses de antigüedad. Estos pacientes fueron tratados con inyecciones locales de PRP cada 15 días, haciendo un total de 3 aplicaciones. El seguimiento de los pacientes se hizo tanto al final del tratamiento como a los 6 meses, y los pacientes fueron evaluados mediante escalas de valoración clínica. Los autores comentan que no se observaron efectos adversos tras la aplicación de inyecciones de PRP, y que se produjo una mejoría significativa de los signos clínicos al final del periodo de estudio. Es necesario mencionar que este estudio no tiene grupo control (Kon et al., 2009). Posteriormente, este mismo grupo de investigadores comparó el resultado clínico obtenido en 15 pacientes afectados de tendinopatía crónica del tendón rotuliano tratados con inyecciones múltiples de PRP, con un grupo de 16 pacientes tratados exclusivamente con fisioterapia. Los autores reevaluaron los pacientes a los 6 meses y observaron que los individuos tratados con PRP presentaron unos resultados clínicos mejores que los pacientes tratados exclusivamente con fisioterapia (Filardo et al., 2010a). De manera similar, Brown y Sivan (2010) también describieron que el tratamiento ecoguiado con inyecciones de PRP mejoraba los signos clínicos en el caso de un deportista que padecía un proceso crónico de tendinopatía del tendón rotuliano (Brown y Sivan, 2010).

Recientemente, Cervellin y colaboradores (2012) han propuesto el empleo de PRP para reducir la morbilidad de la zona donante (tendón rotuliano) tras la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior mediante la técnica hueso-tendón rotuliano-hueso (Cervellin et al., 2012). Estos autores llevaron a cabo un estudio clínico prospectivo, aleatorio y controlado que incluyó 40 pacientes jóvenes sometidos a cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior. En 20 pacientes se colocó un gel de PRP sobre la zona donante del tendón rotuliano, mientras que los otros 20 fueron el grupo control. A los 12 meses de la cirugía todos los pacientes fueron sometidos a un examen clínico, se les realizó una resonancia magnética de la rodilla, y se les sometió un cuestionario para evaluar el dolor en la rodilla durante la actividad normal del paciente y otro cuestionario para determinar la funcionalidad de esa rodilla. Este estudio

demonstró que la aplicación de PRP redujo subjetivamente el dolor a nivel de la zona donante del tendón rotuliano tras la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior. Sin embargo, la resonancia magnética de la rodilla de los pacientes tratados con PRP no mostró diferencias significativas con la de los pacientes control (Cervellin et al., 2012).

5.6.2.5. Reparación del manguito rotador

Actualmente existen varios estudios clínicos que evalúan el empleo del PRP en las cirugías de reparación de los tendones del manguito rotador del hombro. En el año 2008, Maniscalco y colaboradores describieron un caso clínico de rotura del tendón supraespinoso donde se aplicó una membrana de PRP para reforzar la sutura del tendón. El paciente mostró una recuperación satisfactoria del rango de movilidad del hombro, con una disminución del dolor. A los 6 meses de la cirugía se realizó una resonancia magnética de revisión, y se observó una recuperación favorable de la zona del tendón lesionado (Maniscalco et al., 2008). Randelli y colaboradores (2008) llevaron a cabo un estudio prospectivo de casos clínicos en el que se incluyeron 14 pacientes que fueron sometidos a cirugía artroscópica para la reparación de lesiones en el manguito rotador. Estos pacientes recibieron una aplicación intraoperatoria de PRP en combinación con trombina autóloga tras la reparación del tendón. Tras la cirugía, los pacientes recibieron un protocolo estandarizado de rehabilitación y fueron reevaluados al mes y a los 6, 12 y 24 meses. La aplicación de PRP no produjo ningún efecto adverso. A partir de los 6 meses se observó una mejoría en la escala de valoración del dolor, y un aumento en la escala que valoraba la funcionalidad de la articulación, comparado con los niveles previos a la cirugía. Es necesario comentar en este estudio no existía grupo control (Randelli et al., 2008). Posteriormente estos mismos autores han llevado a cabo un estudio clínico prospectivo, aleatorio, controlado y a doble ciego con 53 pacientes que fueron operados mediante artroscopia para la reparación de desgarros totales del manguito rotador. En un grupo de 26 pacientes se empleó PRP durante el proceso de reparación quirúrgica, mientras que en el resto de pacientes no se empleó PRP, y se usó como control. Todos los pacientes fueron sometidos al mismo protocolo de rehabilitación. Los pacientes del grupo tratado con PRP presentaron un menor grado de dolor durante los primeros días tras la cirugía. A los 3 meses de la cirugía, los pacientes

tratados con PRP presentaron una mejor funcionalidad del hombro, sin embargo no se observaron diferencias entre los dos grupos ni a los 6, ni a los 12, ni a los 24 meses. Las resonancias magnéticas de seguimiento tampoco evidenciaron diferencias entre los dos grupos con respecto a la cicatrización del manguito rotador. A pesar de ello, los autores concluyeron que el tratamiento con PRP afectaba positivamente la cicatrización del manguito rotador, y aceleraba la recuperación funcional de este tipo de lesiones (Randelli et al., 2011). Barber y colaboradores (2011) encontraron en un estudio de casos-control, que incluyó 20 pacientes tratados artroscópicamente para la reparación del manguito rotador, que la aplicación de matrices de PRP disminuyó la tasa de desgarros de estos tendones en el periodo postoperatorio (Barber et al., 2011).

En otro estudio clínico prospectivo, aleatorio y controlado publicado por Castricini y colaboradores en el 2011, los autores no pudieron evidenciar que el tratamiento con PRP aportase beneficios en el tratamiento quirúrgico de los desgarros en el manguito rotador. Este estudio incluyó 88 pacientes que se siguieron durante 16 meses. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratamiento y control ni mediante la evaluación con resonancia magnética del hombro ni mediante el empleo de una escala de valoración que evaluaba grado de dolor, actividad diaria, rango de movilidad y fuerza del hombro. Estos autores comentaron que sus conclusiones eran válidas para desgarros de pequeño y mediano tamaño, pero que en desgarros masivos o de gran tamaño, la terapia con PRP podría resultar beneficiosa (Castricini et al., 2011). De manera similar a los resultados obtenidos por Castracini y colaboradores, Jo y colaboradores (2011), en un estudio de casos-control que incluyó 42 pacientes, tampoco encontraron diferencias significativas en la recuperación clínica entre los pacientes en los que se empleó PRP y entre aquellos en los que no se usó esta terapia (Jo et al., 2011). Recientemente, algunas comunicaciones en el congreso de la American Academy of Orthopaedic Surgeons de 2010 tampoco encontraron beneficios tras el empleo de matrices de PRP durante la reparación quirúrgica de lesiones del manguito rotador (Mei-Dan et al., 2010b).

Everts y colaboradores (2008) publicaron un estudio clínico prospectivo, aleatorio y doble ciego en el que emplearon inyecciones de PRP en pacientes sometidos a una descompresión subacromial mediante cirugía abierta. Estos autores encontraron que los pacientes tratados con PRP presentaron una mejor recuperación funcional y menos dolor. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre el grupo de pacientes

tratados con PRP y el grupo control a los 2 años del tratamiento, lo que hace pensar que la respuesta clínica se hace menos pronunciada a medida que pasa el tiempo (Everts et al., 2008).

5.6.2.6. Lesiones tendinosas en caballos de deporte

Al igual que ha ocurrido en Medicina del Deporte, el tratamiento de determinadas lesiones tendinosas con el empleo de inyecciones de PRP ha experimentado una gran difusión en el ámbito de la Medicina Veterinaria Equina, sobre todo entre los especialistas en caballos de deporte (Textor, 2011). En los primeros estudios clínicos que se llevaron a cabo se obtuvieron unos resultados muy prometedores. Argüelles y colaboradores en 2008 publicaron un trabajo en el que incluyeron 5 casos clínicos de caballos de deporte con lesiones tendinosas o ligamentosas que fueron tratados con inyecciones intralesionales de PRP. Estos autores observaron que los animales que sufrían tendinopatía del tendón flexor digital superficial mostraron mejorías tanto ecográficas como clínicas. En los animales con desmitis crónica del ligamento suspensorio se observó una mejoría clínica (los caballos estaban menos cojos), pero no se observaron mejorías ecográficas. A los 6 meses del tratamiento, todos los animales volvieron a un nivel de rendimiento deportivo similar al que tenían antes de la lesión (Argüelles et al., 2008). Waselau y colaboradores también encontraron unos resultados satisfactorios tras el empleo de inyecciones de PRP en el tratamiento de desmitis del ligamento suspensorio en caballos de deporte (Waselau et al., 2008).

Más recientemente, Torricelli y colaboradores (2011) evaluaron la eficacia de una combinación compuesta de células mesenquimales derivadas de médula ósea junto con PRP en 13 caballos de competición que padecían lesiones musculoesqueléticas por sobreesfuerzo que no respondían a otras terapias. En los animales tratados con esta combinación se observó una marcada mejoría en el grado de cojera a los doce meses del tratamiento, y 11 de los 13 animales pudieron volver a competir (Torricelli et al., 2011).

5.6.3. Conclusiones sobre el empleo de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas

Según hemos podido ir viendo a lo largo de esta sección de la revisión bibliográfica, las aplicaciones de PRP pueden resultar de utilidad para el manejo de lesiones tendinosas. Dentro de las ventajas que potencialmente pueden proporcionar a los pacientes afectados de problemas tendinosos cabría destacar que proporcionan una recuperación más rápida y una mejor funcionalidad del tendón tras el tratamiento (Taylor et al., 2011). Para los deportistas, estos beneficios pueden permitirles una vuelta más rápida al entrenamiento y a la competición, una mejoría inmediata del rendimiento tras la lesión y la posibilidad de reducir el tiempo de baja.

Sin embargo, a pesar de estos beneficios potenciales que han puesto de manifiesto algunos estudios clínicos, las aplicaciones del PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas aun se encuentra en pleno proceso de estudio, y buena parte de los efectos positivos sobre la cicatrización del tendón están débilmente apoyados por los estudios existentes. Resulta imprescindible que se lleven a cabo estudios clínicos con un diseño experimental sólido que evalúen de una manera concluyente el efecto que estas terapias tan prometedoras tienen sobre los procesos de curación de las diferentes patologías del tendón, tanto agudas como crónicas o degenerativas.

5.7. Riesgos potenciales del empleo de clínico de PRP

En los últimos años ha surgido una creciente preocupación ligada a la posible existencia de riesgos potenciales asociados con las aplicaciones de PRP (Landesberg et al., 1998). Una de las primeras preocupaciones que se planteó estaba asociada al empleo de ciertas sustancias empleadas para la activación de las plaquetas contenidas en el PRP. Concretamente nos referimos al empleo de trombina bovina como agente activador del PRP. Algunos autores han alertado que el empleo de esta trombina bovina estar asociada al desarrollo de anticuerpos frente a los factores de coagulación V y XI, y frente a la trombina humana. Esto podría desencadenar importantes coagulopatías que pudiesen en riesgo la vida del paciente (Landesberg et al., 1998). Actualmente, la

mayoría de las metodologías de obtención del PRP recomiendan el empleo de cloruro cálcico exclusivamente, o bien el uso de trombina humana, como agentes activadores del PRP (Anitua et al., 2004).

Algunos autores también se han preocupado acerca de la bioseguridad del PRP. En primer lugar cabe mencionar que al tratarse de un producto autólogo, se excluye todo riesgo asociado a reacciones de carácter inmunomediado, así como la transmisión de enfermedades víricas como la inmunodeficiencia humana, la hepatitis, y otras como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Mei-Dan et al., 2010b). Por otro lado, a algunos autores les han surgido preocupaciones acerca de la estabilidad genética tras la aplicación de PRP y se han planteado si podría existir un posible efecto carcinogénico. Los factores de crecimiento autólogos existentes en el PRP, al igual que los factores de crecimiento circulantes en el organismo, actúan a nivel de los receptores de la membrana celular y no a nivel del núcleo celular. Esta unión a determinados receptores de membrana acaba produciendo una serie de respuestas en la célula diana, y como consecuencia se estimula la expresión génica normal, y no anormal, de determinadas proteínas (Mei-Dan et al., 2010b). Actualmente, no existe en la bibliografía ninguna referencia que aporte evidencias científicas que asocien la aplicación de PRP con la aparición de procesos de transformación neoplásica. Incluso el único artículo publicado hasta la fecha que examina los efectos sistémicos de la aplicación local de PRP no encontró ninguna variación significativa en los niveles séricos ni de citoquinas ni de factores de crecimiento (Banfi et al., 2006).

Otro aspecto que puede producir preocupación a la hora de la aplicación clínica del PRP es el riesgo potencial que existe de contaminación bacteriana del PRP, y los problemas que de ello pueden derivar tras su aplicación en la zona lesionada (Vasconcelos et al., 2003). Los métodos abiertos tales como los de centrifugación en tubo, que conllevan varios pasos para el aislamiento del PRP, deben de realizarse siempre bajo las más rigurosas medidas de asepsia, limitando su uso a unas pocas horas (4-6 horas) tras su extracción (Weibrich et al., 2005; Argüelles et al., 2006). Estos sistemas abiertos han mostrado tener un mayor riesgo de contaminación bacteriana durante el proceso de preparación, pero este hecho no se asoció con el desarrollo de infección en un estudio clínico con un gran número de pacientes (Vasconcelos et al., 2003). Algunos autores incluso han encontrado que el PRP presenta un cierto efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* tanto *in vitro* como *in*

vivo (Bielecki et al., 2007; Moojen et al., 2008), si bien esta actividad bacteriostática no es comparable con la administración sistémica de antibióticos (Jia et al., 2010). A pesar de ello, en un caso clínico se ha apuntado que el tratamiento con PRP podría resultar de utilidad para el manejo de pacientes con osteomielitis (Yuan et al., 2008).

En los estudios clínicos publicados hasta este momento no se han detectado efectos secundarios importantes asociados a la aplicación local de PRP en el tratamiento de lesiones musculotendinosas (Taylor et al., 2011). Tan solo se ha informado que en algunas ocasiones puntuales puede aparecer dolor asociado a la inyección de PRP y algo de inflamación local, que normalmente se controla con la aplicación de hielo en la zona (Paoloni et al., 2011). Algunos autores plantearon la hipótesis que la aplicación de PRP podría inducir una fibrosis excesiva debido a que se incrementaba la concentración de TGF- β 1 en la zona de la lesión, y este factor de crecimiento se ha asociado a la formación excesiva de tejido fibroso (Anitua et al., 2007a). Sin embargo, el empleo de PRP sobre modelos experimentales *in vivo* ha puesto de manifiesto que esto no es así, probablemente porque dentro de la compleja formulación de sustancias bioactivas existente en el PRP puedan existir otras moléculas que modulen el efecto fibrótico del TGF- β 1 (Anitua et al., 2006b).

5.8. Controversias acerca del empleo de clínico de PRP

Actualmente, existe una profunda controversia en la comunidad científica acerca de la utilidad clínica de las aplicaciones del PRP para el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas (Engebretsen et al., 2010; Kon et al., 2011a; Paoloni et al., 2011). Como hemos visto, a pesar que la mayoría de los estudios experimentales demuestran que el PRP fomenta los procesos de cicatrización tisular en lesiones del sistema locomotor, los estudios clínicos que se han publicado hasta la fecha presentan resultados muy variables. Probablemente, esta variabilidad en los resultados clínicos sea achacable a la clamorosa falta de homogeneidad a la hora de procesar la sangre autóloga para obtener el PRP. Como ya hemos estudiado en la sección de “Metodología para la obtención de PRP”, existe una gran cantidad de protocolos para el aislamiento del PRP, que varían en cuestiones tan importantes como son el volumen de sangre necesario para el aislamiento, el protocolo de centrifugado, el número de centrifugaciones, el volumen

de PRP aislado o la metodología de fraccionamiento. Estas cuestiones puramente técnicas hacen que el producto final aislado difiera considerablemente entre los distintos métodos de obtención. De ese modo, con mismo término de PRP se catalogan productos sanguíneos autólogos que difieren enormemente en su concentración plaquetaria. Incluso existen sistemas de aislamiento que incluyen importantes concentraciones de leucocitos e incluso eritrocitos, mientras que otras metodologías de aislamiento por el contrario evitan concienzudamente la inclusión tanto de leucocitos como de eritrocitos, como es el caso de la metodología PRGF. Pero los diferentes sistemas de aislamiento no solo darán lugar a un producto con diferencias en su contenido plaquetario y celular, también producirán un PRP con marcadas diferencias en las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento y citoquinas. Estas importantes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de los diferentes PRP, podrían estar asociadas a respuestas biológicas diferentes, y por tanto influenciar de manera muy diferente el proceso de cicatrización tisular.

Además de esta importante preocupación con respecto a la homogeneidad de la metodología de aislamiento del PRP, existe otro problema importante asociado a la metodología de aplicación de este PRP en la zona lesionada. Existen estudios clínicos en los que la aplicación del PRP se realiza mediante inyecciones en el lugar de la lesión, mientras que en otros estudios se aplica el PRP en forma gelificada. Incluso en otros muchos estudios clínicos se plantea el empleo del PRP en forma de matrices de fibrina. Además de esto, tampoco existe homogeneidad a la hora de elegir los agentes empleados para la activación plaquetaria, o incluso existen estudios clínicos en los cuales se inyecta el PRP en forma líquida sin activar.

Otro aspecto importante que debe de ser abordado en futuras investigaciones es la pauta de aplicación de estos tratamientos con PRP. Existen estudios clínicos en los que se hace una aplicación única de PRP, mientras que otros hacen varias aplicaciones para tratar la lesión. Incluso será necesario clarificar cada cuanto tiempo deben de espaciarse las aplicaciones (días, semanas, meses), así como el volumen a administrar según la localización anatómica de la lesión. Estas cuestiones probablemente vayan ligadas a la patología que se pretenda tratar. Muy probablemente las lesiones de carácter agudo o traumático responderán de una manera muy diferente a los tratamientos con PRP de cómo lo harán las lesiones de tipo crónico o degenerativo. Determinar el tipo de lesiones que mejor responden al tratamiento con estas terapias, así como descubrir cuál

es el estadio clínico dónde se consiguen unos mejores resultados tras su aplicación supone una importante tarea de investigación, y a la vez abre un campo de estudio fascinante en el cual la mayor parte de las cuestiones permanecen a día de hoy sin contestar.

6. Evaluación ecográfica del tendón

La ecografía diagnóstica se basa en la obtención de imágenes del cuerpo humano a partir de los ultrasonidos (sonidos a frecuencias superiores a las audibles, >20 kHz) que se reflejan en los tejidos, tras incidir sobre éstos un haz de ondas de sonido, normalmente entre 2 y 12 MHz. La ecografía permite el estudio de los tejidos del cuerpo humano de forma inocua y no invasiva (Balius et al., 2007).

El sonido se transmite a través de la materia, a diferentes velocidades en función del tipo de estructura con que interacciona. Cuando el sonido cambia de velocidad sufre fenómenos de refracción y reflexión, como cualquier onda. El sonido reflejado por una interfase tisular indica su posición; el análisis mediante hardware de estas ondas de reflexión permite crear una imagen (Balius et al., 2007).

Durante las dos últimas décadas hemos asistido al desarrollo de la ecografía en el estudio de la patología del aparato locomotor, especialmente en las estructuras denominadas partes blandas, frecuente asiento de patología, y para cuyo estudio se disponía de menos arsenal diagnóstico. Desde la segunda mitad de los 80, con el desarrollo tecnológico de los nuevos equipos de ultrasonidos, y sobre todo con el advenimiento de las sondas de alta frecuencia, la ecografía del aparato locomotor experimenta un verdadero despegue. La vasta mayoría de artículos científicos sobre la utilidad de la ecografía en el estudio de las alteraciones músculo-esqueléticas han sido escritos en la última década (Kaplan, 1990).

La nueva tecnología permite la utilización de la ecografía en terrenos donde era poco habitual, como la reumatología, medicina deportiva, ortopedia o traumatología, siendo quizá la falta de conocimiento de sus posibilidades, la razón de su lento desarrollo en algunas especialidades, teniendo también mucha influencia la contemporaneidad con una técnica espectacular como la MRI (Lemos Zunzunegui et al., 2001).

6.1. Historia

Las aplicaciones médicas de los ultrasonidos se desarrollaron a partir de la Segunda Guerra Mundial. Dussik (1942) fue el primero que propuso usar los ultrasonidos como método diagnóstico. Howry (1952) grabó su primer corte ultrasonográfico con una cámara de 35 mm y publicó los primeros estudios de tejido humano mediante ecografía, estudios en blanco y negro puros. La aplicación de la tecnología informática permitió la obtención de la imagen en una escala de grises (Kossof, 1974) y en tiempo real (1980); ello hizo el aprendizaje de la técnica más asequible. A finales de la década de 1980, el desarrollo de transductores y maquinaria incrementa de manera notable la resolución espacial, permitiendo el estudio de los tejidos musculares y tendinosos. El desarrollo de los cristales piezoeléctricos (capaces de convertir una señal eléctrica en una vibración, y viceversa) y el aumento de capacidad de los ordenadores han hecho de los equipos de ultrasonidos una tecnología eficaz para obtener y almacenar imágenes.

6.2. Conceptos ecográficos

A continuación enumeramos algunos conceptos básicos para comprender la técnica ecográfica no sólo la aplicada al aparato locomotor sino también para la ecografía en general.

Imagen

El comportamiento de las distintas estructuras ante un haz de sonido dará una imagen rica en ecos (hiperecogénica) si se trata de una interfase muy reflectante, o muy pobre en ecos (hipoecogénica) cuando se trate de una interfase tisular poco reflectante. Entre ambos extremos hallaremos diferentes tonalidades de la escala de grises relativos que permitirán discriminar entre estructuras.

Frecuencia

En ecografía musculoesquelética se trabaja entre 5 y 15 MHz. La resolución mejora al realizar el estudio con altas frecuencias, aunque con el curso de éstas disminuye la penetrabilidad. Para estudiar estructuras superficiales se usan frecuencias elevadas (12 a 15 MHz) y para estudiar estructuras profundas trabajamos con frecuencias intermedias-bajas (Balius et al., 2007).

Transductores

Consisten en carcasas herméticas que contienen los cristales piezoeléctricos (capaces de emitir el haz sónico y recoger el haz reflejado transformándolo en señal eléctrica para generar una imagen). Existen dos tipos de transductores: sectoriales y lineales. En los sectoriales, el haz ultrasónico se emite de forma radial, mientras que en los lineales la emisión es en paralelo. En ecografía musculoesquelética se trabaja con transductores lineales. Estos transductores permiten alinear los haces sónicos con estructuras alargadas, frecuentes en el sistema musculoesquelético (tendones, nervios,...), haciendo que los sonidos incidan de manera perpendicular a la estructura que hay que estudiar. En la actualidad, la mayoría de transductores utilizados son multifrecuencia, es decir, capaces de generar distintas frecuencias desde una misma sonda emisora (Balius et al., 2007).

Foco

Debe enfocarse a la profundidad de la estructura que vayamos a estudiar. Puede usarse la opción multifoco, que permite el enfoque a varios niveles a expensas de la superposición automática de varias imágenes adquiridas, una a cada distancia focal.

Ganancia

La intensidad de los sonidos reflejados disminuye con la distancia. Para compensar este déficit, los ecos que provienen de los tejidos más profundos se amplifican automáticamente de manera exponencial. Este aumento de la intensidad de señal puede modificarse manualmente (Balius et al., 2007).

Persistencia

La imagen que visualizamos puede ser un promedio de varias imágenes sucesivas. Esto las hace menos precisas, más dulces y menos susceptibles de ser afectadas por artefactos de movimiento.

Contraste

Todas las imágenes pueden tratarse manualmente, contrastándolas más o menos, adaptándolas a criterio del explorador.

Ecografía Doppler (desarrollada por Reid en 1972)

Se basa en que un haz de sonido altera su frecuencia cuando se refleja en una estructura en movimiento (normalmente, el flujo sanguíneo). El cambio es más notable cuando la estructura se desplaza con una trayectoria similar al haz sónico. El Power Dopple es mucho más sensible a los flujos lentos, por lo que es muy interesante para estudiar la hiperemia relativa de algunos tejidos en determinadas situaciones patológicas. El Doppler hace posible el estudio de la onda de flujo y nos permite valorar si nos hallamos ante un flujo arterial o venoso.

Campo de visión ampliado

El pequeño campo de visión que permite el transductor es útil en el estudio de pequeñas estructuras (en carpo, dedo, tobillo o codo). De hecho, para estudiar estas estructuras se usan transductores más pequeños, que se adaptan mejor a superficies irregulares no siempre convexas. Ello es un hándicap para estudiar grandes estructuras en toda su longitud, pero puede reconstruirse una imagen por superposición manual de cortes sucesivos. Algunos equipos han diseñado sofisticados hardwares que permiten un campo de visión ampliado mediante la superposición sucesiva de las imágenes obtenidas (Balius et al., 2007).

Las aplicaciones de la ecografía en el estudio del aparato locomotor todavía están desarrollándose y es muy probable que se amplíen en el futuro. La mejora de la

definición de la técnica y la aparición de complementos hacen pensar que el futuro de la ecografía musculoesquelética todavía no está escrito.

6.3. Técnica y aparataje

Se emplean equipos de tiempo real, con transductores lineales casi exclusivamente salvo para partes muy puntuales, que se prefieren convex, como estudios de rodete posterior glenohumeral, o meniscopatías. La introducción de sondas de alta frecuencia ha sido definitiva en el estudio del aparato locomotor. Se utilizan frecuencias desde 7.5 MHz hasta 15-20 MHz siendo inversamente proporcional a la profundidad deseada en el estudio. Dependerá de las preferencias y de la zona a estudiar se elige una sonda lineal de mayor o menor longitud (Lemos Zunzunegui et al., 2001).

El estudio ecográfico se realiza simplemente interponiendo gel entre la sonda y la piel, aunque se considera opcional el uso de packs de gel, para situar en la zona de foco adecuado el objeto de estudio, pero esto se elimina al ir apareciendo sondas multifrecuenciales. En la actualidad se añaden los estudios con Doppler color y Power doppler así como la introducción de los estudios con contrastes ecográficos.

Básicamente, la ecografía se utilizará para el estudio de las partes blandas del aparato locomotor, especialmente todas las de situación extraarticular, siendo especialmente indicada en el estudio de traumatismo de partes blandas, roturas parciales o completas de músculos y tendones, y sus complicaciones, estudio de cuerpos extraños, sobre todo de gran utilidad en los radiotransparentes, lesiones de ligamentos, bolsas, nervio periférico, cartílago, etc.

6.4. Realización del examen ecográfico

El examen ecográfico debe realizarse en un ambiente propicio, cómodo para el paciente y para el explorador. Se debe de disponer de una camilla, accesible por los dos lados, sobre la cual se coloca el paciente a quien se va a realizar la exploración. El ecógrafo se sitúa a la izquierda de la camilla cuando el explorador habitualmente

conduce el transductor con su mano derecha. También es recomendable un taburete sin brazos para las exploraciones que se realizan con el paciente sentado. La atenuación de la luz ambiental mejora la visualización de algunos detalles (Balius et al., 2007).

Los resultados de la técnica dependen mucho del explorador por lo que el examen debe realizarse en condiciones óptimas, sin prisas y de forma exhaustiva. La inocuidad de la exploración facilita su repetición en un segundo tiempo por el mismo explorador o por otro.

La ecografía en tiempo real facilita la realización de infinitos cortes de cualquier estructura que se tenga que estudiar. La sistematización del estudio se realiza con dos cortes, uno en sentido transversal y otro en sentido longitudinal al eje de la estructura que vamos a estudiar, aunque a su vez estos cortes pueden ser múltiples para completar el conocimiento de la estructura en todo su volumen (Balius et al., 2007).

También podemos estudiar de manera dinámica activa y pasiva cómo se movilizan las estructuras y cómo se desplazan respecto a los tejidos adyacentes. Se valora si la contracción muscular es armónica y uniforme, debiéndose localizar zonas del músculo donde no sea así. Las adherencias que comprometen la libertad de la movilidad son fácilmente detectables (Balius et al., 2007).

6.5. Artefactos de la imagen ecográfica

El ecografista debe conocer los artefactos para que no interfieran en el diagnóstico y para usarlos en beneficio propio en determinados casos. Entre otros se reconocen los siguientes artefactos:

Sombra acústica

La producen las estructuras muy reflectantes que, a modo de espejo, no permiten ver a su través. El aire, el hueso y las calcificaciones son muy reflectantes y son los que producen más sombra tras ellos. Si la calcificación es pequeña, inferior a un milímetro, es posible que no exista fenómeno de sombra acústica (Balius et al., 2007).

Sombra por refracción (o sombra de ángulo crítico)

La produce la incidencia tangencial del haz sónico sobre superficies curvas, en sus zonas más laterales. Ejemplos de este tipo de artefacto serían la sombra por refracción que se produce en un tendón de Aquiles normal, en su corte transversal. En el estudio de roturas tendinosas, la aparición de esta sombra se debe a la incurvación que sufren los muñones en las roturas completas (Balius et al., 2007).

Cola de cometa

El metal y el vidrio producen bandas hiperecogénicas posteriores periódicas que disminuyen de intensidad con la distancia.

Refuerzo posterior

Cuando el sonido atraviesa tejidos que lo atenúan poco, como es el caso del líquido, la corrección automática de la ganancia hace que parezca que los tejidos más profundos reciben más sonido, haciéndose más visibles (Balius et al., 2007).

Refracción

Cuando, al atravesar una interfase tisular de manera no perpendicular, el haz de sonido se desvía, podemos imaginar que una estructura se halla en un lugar incorrecto. Para obviarlo deben evitarse las exploraciones oblicuas (Balius et al., 2007).

Anisotropía

Es característica de la ecografía musculoesquelética, dado que los tendones y los músculos son tejidos altamente ordenados en una de las direcciones del espacio y tienen distinto comportamiento reflectante en función de cómo incida el haz de ultrasonidos sobre ellos. Cuando la incidencia es perpendicular a la dirección principal de la estructura, ésta se muestra hiperecogénica. Cuando el haz incide de manera más oblicua, tendiendo a ser paralela a dicha dirección, la misma estructura se vuelve hipocogénica (Balius et al., 2007).

6.6. Ventajas del examen ecográfico

El examen ecográfico es una técnica inocua, no invasiva y que no emite radiaciones ionizantes. Además, es económica atendiendo a su bajo coste en comparación con el de otras técnicas diagnósticas. Por tanto, la técnica ecográfica no tiene contraindicaciones ni efectos secundarios conocidos (Balius et al., 2007).

La ecografía es una prueba diagnóstica muy versátil, ya que permite estudiar la vascularización mediante técnicas tipo Doppler (Color Doppler), y es importante para el diagnóstico diferencial de las lesiones vasculares y para la valoración de los fenómenos inflamatorios a nivel lesional y su evolución. Se considera versátil también porque permite estudios dinámicos y comparativos. En el aparato locomotor, el estudio dinámico facilita la visualización de los músculos en relajación y en contracción, en diferentes grados de estiramiento, y se puede hacer compresión con el transductor.

La ecografía permite realizar estudios reiterados, de suma importancia en el seguimiento de las lesiones deportivas, del control evolutivo, valoración de los tratamientos realizados día a día, y prevención de la posible aparición de complicaciones y su diagnóstico precoz si éstas se producen; asimismo permite establecer con mayor exactitud los tiempos de recuperación y asegurar la vuelta al deporte con un menor riesgo de recaídas. Por tanto, es una prueba que permite fácilmente su repetibilidad (Balius et al., 2007).

Se puede realizar el diagnóstico a “pie de campo”, es decir, podemos tener un diagnóstico inmediato de la lesión sufrida por el deportista.

6.7. Inconvenientes del examen ecográfico

Uno de los mayores problemas de la ecografía es que es una técnica que depende del operador y con una curva de aprendizaje muy larga, sobre todo en el caso de la ecografía del aparato locomotor (Balius et al., 2007).

Los ya mencionados artefactos pueden considerarse un inconveniente, si bien su conocimiento puede aprovecharse para confirmar diagnósticos, como en el caso de objetivar la “cola de cometa” en el lugar estudiado, que confirmaría el diagnóstico de cuerpo extraño (vidrio, metal). Asimismo, la “sombra acústica” nos ayuda en el diagnóstico de la calcificación, especialmente en patologías tendinosas, y el “refuerzo posterior” nos es útil para mostrar la presencia de colección de líquido previa al artefacto. Como vemos, los artefactos correctamente utilizados pueden pasar de ser un inconveniente a ser una ventaja. No ocurre así en el caso de la “anisotropía”, si bien hoy en día, con los equipos que tienen campo de visión ampliado, aquélla no debe ser un gran inconveniente y es fácilmente identificable (Balius et al., 2007).

En el caso de las lesiones musculares por mecanismo indirecto, la ecografía no es una técnica inmediata para el diagnóstico. Clásicamente se decía que la rotura fibrilar no se podía diagnosticar hasta pasadas 24-48 horas, pero en la actualidad creemos que un buen estudio en el momento de producirse la lesión nos puede indicar si ha habido daño en la estructura muscular o no lo ha habido, aunque el diagnóstico preciso del tamaño y grado de la rotura será más exacto pasadas 48 horas. Cuanto más pequeña sea la afectación fibrilar, más difícil será el diagnóstico inicial.

6.8. Ecografía normal de los tendones

La característica ecográfica fundamental que nos vamos a encontrar en la exploración de un tendón es su fibrilaridad. Los tendones están compuestos por haces de fibras de colágeno y elementos celulares, que se encuentran empaquetados sucesivamente y envueltos por tejido conectivo elástico cuya función es la de permitir el deslizamiento de las fibras además de llevar la irrigación e inervación a dichas estructuras. De esta manera, envolviendo los haces de colágeno nos encontramos el endotendón y de forma más externa el epitendón. Algunos tendones están rodeando por una vaina sinovial, recibiendo el conjunto de su cubierta externa el nombre de paratendón (tendón del bíceps, tibiales), y otros tendones están cubiertos tan sólo por el epitendón, en cuyo caso éste también recibe el nombre de peritendón (tendón de Aquiles, flexor del pulgar),

La imagen ecográfica de los tendones es bastante regular independientemente del tamaño de dicho tendón, encontrándonos en el corte longitudinal unas imágenes lineales hiperecoicas de 0.3 a 0.4 mm de grosos, alternadas por encima y por debajo con otras imágenes hipoecoicas de unos 0.2 mm. Esta imagen ecográfica de tipo fibrilar responde a la estructura intrínseca de los tendones; aunque no se sabe con certeza cómo se forma, se cree que es producto de la interfase de las zonas fibrilares con los tabiques internos ya que la separación microscópica de éstos es de aproximadamente unas 200 μm .

En los tendones de músculos largos, estas imágenes lineales son de disposición paralela, con cierta tendencia a curvarse o enroscarse sobre su eje de forma espiroidea para presentar mayor resistencia. Esta disposición fibrilar puede observarse en la imagen ecográfica longitudinal, como es el caso de la Figura 17, en donde se muestra el tendón de Aquiles de la oveja. Este tipo de disposición ecográfica tiene su correspondencia con las imágenes obtenidas por microscopía.

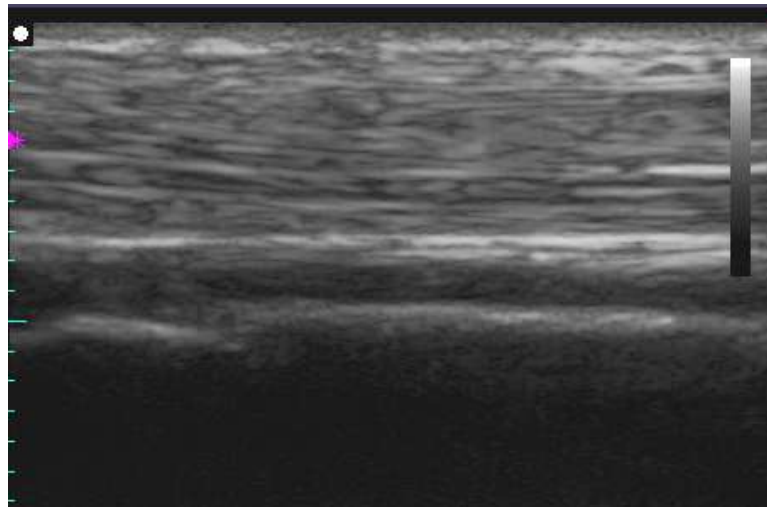


Fig. 17. Imagen ecográfica longitudinal del tendón de Aquiles de una oveja, donde se observa la disposición fibrilar característica de la arquitectura del tendón.

En el corte ecográfico transversal del tendón observamos una imagen de tipo similar, en la que se alternan haces hiperecoicos cortados de través con otros hipoecoicos, y en la que se aprecia bien la envoltura externa también de características hiperecoicas. A la imagen ecográfica del tendón en este corte transversal se le llama habitualmente imagen en sal y pimienta y se muestra en la Figura 18.



Fig. 18. Imagen ecográfica transversal del tendón de Aquiles de una oveja, donde se observa el típico punteado hiperecoico característico del tendón.

Algunos tendones están envueltos en su recorrido, al transcurrir por zonas donde existen dificultades de deslizamiento, por una vaina sinovial, formada por dos capas, parietal y visceral unidas por un mesotendón. En este tipo de tendones con vaina tendinosa se puede observar un poco de líquido fisiológico entre el tendón y la vaina. Esta vaina tendinosa aparece en ecografía como una fina capa hipo o anecoica, en corte longitudinal, y como un halo anecoico en corte transversal. Otros tendones, sobre todo de cierto grosor, se encuentran envueltos en una capa de tejido conjuntivo areolar laxo, y tejido adiposo, que denominamos epitendón, parte fundamental para su irrigación, y que aparece en ecografía como una capa hiperecogénica en la parte periférica del tendón (Kainberger et al., 1997).

En la exploración ecográfica del tendón hay que tener en cuenta el artefacto de la anisotropía ya descrito en los años 50 por Dussik (Dussik, 1995), y posteriormente por Fornage (Fornage, 1987), por el cual al bascular la sonda en el corte transversal se nos muestra cómo el tendón pasa de unas características hiperecoicas brillantes a otras más hipoecoicas. Por tanto es muy importante la orientación de la sonda, que debe permanecer siempre ortogonal al eje del tendón, para evitar falsos positivos, que se provocan por producirse este artefacto ecográfico que mostrará falsas zonas hipoecoicas en el tendón (Crass, 1988). Si bien es cierto que la anisotropía nos puede resultar útil a

la hora de localizar estas estructuras. Con los aparatos más modernos dicho artefacto ha sido minimizado (Balius et al., 2007).

De manera general, podemos decir que el corte longitudinal de los tendones en ecografía se muestra como un patrón de finas líneas paralelas hipoeoicas, que representan los haces de colágeno, con un diámetro casi constante de 0,1 mm. Los haces están separados por espacios hiperecoicos, que se entremezclan de forma sinusoidal, y representan las interdigitaciones de tejido conectivo (endotendón), por donde transcurren vasos, y linfáticos. Esta disposición de finas líneas paralelas constituye el patrón fibrilar, típico del aspecto del tendón al corte longitudinal. Al corte transversal el tendón aparece como una estructura, de moteado fino hipo-hiperecogénico, puntiforme, de predominio fuertemente ecogénico (Bouffard et al., 1993).

6.9. Aspecto ecográfico del tendón patológico

La inflamación de los tendones se expresa en ecografía, como un aumento de tamaño, pérdida de su estructura fibrilar, y disminución de la ecogenicidad, todo ello expresión del edema, aumento de líquido intersticial, y alteración de su estructura normal (Lemos Zunzunegui et al., 2001).

Cuando un tendón se rompe, parece aceptado, que se trata de un estadio final de alteración de su estructura fibrilar, siendo tendones "enfermos", la mayoría de los casos, que antes se suponían "roturas espontáneas", y se apreciará en el estudio ecográfico, una solución de continuidad, total o parcial, del patrón fibrilar entre los dos cabos, proximal y distal, siendo importante la medida de la diástasis para la decisión terapéutica (Lemos Zunzunegui et al., 2001).

Más difícil es para la ecografía diferenciar entre las roturas parciales y las tendinitis focales, puesto que ambas situaciones, tanto inflamación o edema focal, como hematoma por rotura pequeña, pueden aparecer como áreas hipoeecogénicas intratendinosas (Paavola et al., 1998).

6.10. Estudio ecográfico del tendón de Aquiles

La ecografía es hoy día la técnica de elección en el estudio del tendón de Aquiles (Paavola et al., 1998; Rockett et al., 1998). La estructura interna del tendón de Aquiles se define con gran nitidez en toda su longitud y grosor, desde su origen hasta su inserción en el calcáneo (Maffulli et al., 1989). Permite ver engrosamientos hipoeoicos difusos o focales en casos de inflamación y alteraciones de la estructura fibrilar en casos de tendinitis-tendinosis (Blei et al., 1986). Cuando se rompe se ve la separación de los cabos distal y proximal, la integridad o no del tendón del músculo delgado plantar, pegado al borde medial del tendón y la posible herniación de la grasa de Kagger a través del epitendón (Kainberger et al., 1990). También se ponen de manifiesto mediante ecografía alteraciones inflamatorias del peritendón que se acompañan o no de afectación inflamatoria del tendón y que son más difíciles de evidenciar mediante otras técnicas más costosas. Finalmente, el examen ecográfico del tendón de Aquiles permite definir la morfología en la patología de la inserción tendinosa poniendo de manifiesto las entesopatías a nivel del calcáneo y las bursitis retrocalcánea profunda por inflamación de la bolsa entre el tendón y el calcáneo (Bertolotto et al., 1995).

6.11. Sistemas de evaluación de la imagen ecográfica

Un tejido que es examinado ecográficamente se evalúa fundamentalmente en base a su ecogenicidad, es decir su capacidad de generar ecos (van Schie et al., 2000). El tejido tendinoso sano y normal es altamente ecogénico debido a su particular organización en forma de fibras de colágeno densamente empaquetadas y alineadas a lo largo del eje longitudinal del tendón. En la imagen ecográfica, esta ecogenicidad se manifiesta en función de la intensidad (o brillo) y la homogeneidad (homogeneidad espacial a lo largo de diferentes imágenes consecutivas). Esta ecogenicidad se puede evaluar tanto en el corte transversal del tejido como en el corte longitudinal. Además de la ecogenicidad, también es importante evaluar la arquitectura ecográfica del tendón, y con esto no referimos a la evaluación del patrón fibrilar característico del tejido tendinoso, cuando se evalúa en cortes ecográficos longitudinales. De ahí que para llevar a cabo un buen examen ecográfico sea necesario realizar cortes transversales y

longitudinales del tendón (Balius et al., 2007). Cuando se produce una lesión tendinosa, parte de la estructura original del tendón se pierde, y esto se traduce ecográficamente en una disminución en la ecogenicidad y una pérdida del patrón fibrilar que caracteriza al tendón sano (van Schie et al., 2000).

La ecografía es una técnica que se realiza a tiempo real, y como ya se ha mencionado es altamente dependiente del operador que la realiza. Inicialmente, para evaluar la imagen ecográfica del tendón sólo se emplearon escalas de valoración semicuantitativa (Genovese et al., 1990; Palmer et al., 1994; Reef, 2001). Posteriormente fueron apareciendo metodologías de evaluación que se basan en la cuantificación de determinados parámetros que proporciona la imagen ecográfica, y que podían ser analizados con ayuda de programas informáticos. Dentro de estos nuevos sistemas se encontraba la cuantificación de la intensidad de la ecogenicidad, expresada en términos de valor medio en la escala de grises del corte transversal de la imagen ecográfica o brillo de la imagen ecográfica (Wood et al., 1993; van Schie et al., 2000; Micklethwaite et al., 2001). Este sistema de evaluación ha sido empleado para cuantificar el grado de lesión tendinosa en caballos de carreras, observándose que la técnica fue lo suficientemente precisa como para permitir detectar cambios en el tejido en base a los cambios observados en el análisis del histograma de la imagen ecográfica (Tsukiyama et al., 1996). Sin embargo, el empleo de este único parámetro para evaluar la integridad del tendón es cuestionable, y un estudio cuantificó el efecto que ejercen sobre este parámetro variables instrumentales tales como la configuración del equipo (ganancia, contraste, brillo), la inclinación del transductor, y el desplazamiento del transductor (van Schie et al., 1999). Estos mismos autores observaron que este tipo de medida ecográfica no era suficientemente sensible como para evaluar objetivamente el estado general del proceso cicatricial del tendón (van Schie et al., 2000). Esto se debe a que el análisis cuantitativo del nivel de grises de la imagen ecográfica solo evalúa un aspecto de la ecogenicidad (intensidad), y obvia otros aspectos muy importantes como son la homogeneidad y la arquitectura del tejido tendinoso (van Schie et al., 2000).

Más recientemente se han incorporado otros sistemas más sofisticados de análisis de la imagen ecográfica, en un intento de hacer del examen ecográfico un sistema de evaluación más objetivo y menos dependiente de la interpretación y experiencia del ecografista. Recientemente se ha desarrollado el análisis computerizado de la imagen ecográfica. Esta técnica almacena imágenes ecográficas transversales a

intervalos regulares de distancia a lo largo de todo el eje longitudinal del tendón. Una combinación de todas estas imágenes crea un bloque tridimensional con la información ecográfica de las diferentes imágenes. Cada imagen ecográfica es la mezcla resultante de la interacción de los ultrasonidos con estructuras relacionadas con los haces de colágeno, y estructuras no relacionadas con los haces de colágeno (interferencias), que dan lugar a una gran número de ecos producidos por estructuras más pequeñas que los haces de colágeno, como por ejemplo las fibrillas de colágeno (van Schie y Bakker, 2000). Los ecos generados por un haz de colágeno determinado se caracterizan por poseer una ecogenicidad homogénea con respecto a su intensidad y distribución a lo largo de las diferentes imágenes transversales consecutivas (van Schie y Bakker, 2000). Sin embargo, los ecos producidos por las interferencias de estructuras no relacionadas con los haces de colágeno muestran cambios bruscos y rápidos en la escala de grises a lo largo de la serie de imágenes ecográficas transversales (van Schie et al., 2001). Correlacionando el nivel de grises de los píxeles contiguos de las imágenes ecográficas transversales consecutivas se obtiene una discriminación entre ecos producidos por estructuras relacionadas con los haces de colágeno, y ecos producidos por estructuras no relacionadas con estos haces de colágeno. Al mismo tiempo también es posible realizar una reconstrucción tridimensional de la información procedente de las imágenes ecográficas transversales (van Schie y Bakker, 2000; van Schie et al., 2001). Esta metodología de análisis computerizado de la imagen ecográfica diferencia cuatro tipos diferentes de ecos: 1) ecos generados en estructuras perfectamente alineadas y con un tamaño por encima de los límites de resolución, como es el caso de los haces de colágeno normales; 2) ecos generados por estructuras por encima del límite de resolución pero con menos alineación, como es el caso del tejido tendinoso en fase de reparación; 3) ecos generados por estructuras por debajo del límite de resolución, tales como acúmulos de fibrillas de colágeno que aún no se han organizado en haces; y 4) falta de ecos, como podría ser el caso de acúmulos homogéneos de células o fluidos sin organización (van Schie et al., 2001). El análisis computerizado de la imagen ecográfica proporciona información precisa acerca de la organización tridimensional de la matriz de colágeno y la integridad del tendón, permitiendo la identificación y monitorización del proceso de cicatrización tendinosa (van Schie et al., 2009).

Material y Método

La experiencia llevada a cabo en esta Tesis Doctoral fue un estudio experimental *in vivo*, aleatorio y controlado con placebo (solución salina) en el que se evaluó el efecto que tiene la aplicación de PRGF sobre el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles, tras inducir quirúrgicamente una sección completa del mismo. El proceso de cicatrización fue monitorizado desde el punto de vista ecográfico a lo largo del experimento, y los tendones fueron evaluados histológicamente al final del periodo de estudio.

En la sección de “Material y Método” se detallarán los siguientes aspectos:

1. Creación de un modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.
2. Protocolo de aislamiento y aplicación de PRGF en el tendón de Aquiles en la especie ovina.
3. Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología del estudio.
4. Exámenes físicos durante el periodo de estudio.
5. Metodología para la valoración anatomopatológica del proceso de cicatrización en el tendón de Aquiles.
6. Metodología para la valoración ecográfica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles a largo del periodo de estudio.
7. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

1. Modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina

1.1. Animales

Este estudio se llevó a cabo con la autorización de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Conserjería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, previa aprobación por parte del Comité Andaluz de Experimentación Animal, que es la autoridad local competente en materia de protección de los animales de investigación. Según lo dispuesto en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; la especie ovina no se encuentra recogida dentro de los animales de experimentación, y por lo tanto fue necesaria la autorización previa y expresa de la autoridad competente antes de iniciar cualquier estudio experimental. Previamente, este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (España). Durante la realización de la fase experimental se respetaron estrictamente las directrices que propone el National Institute of Health (NIH) con respecto a la utilización y manejo de animales de experimentación.

Para nuestro estudio, el animal elegido fue la oveja (*Ovis orientalis aries*). Todos los animales utilizados en esta experiencia procedían de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba (España). El grupo experimental estuvo compuesto por 20 ovejas adultas cruce de raza Merino, con una edad comprendida entre 24 – 30 meses, nulíparas, no gestantes (confirmado mediante ecografía), y con un peso entre 50 – 55 kg (Fig. 19). El hecho de ser hembras nos facilitaba el manejo y evitaba un excesivo sobrepeso. La ausencia de machos también nos permitía un mejor control del ciclo estral, y por lo tanto una menor influencia de las variaciones hormonales.

Todos los animales fueron inspeccionados previamente por un veterinario. Esta inspección consistió en un examen general del animal y un examen ortopédico, con el objetivo de garantizar que todas las ovejas estaban libres de enfermedad y no presentaban ningún problema ortopédico o de cojera. Además, en todos los animales se

realizó una analítica sanguínea basal, donde se comprobó que tanto los valores del recuento hematológico como la bioquímica sérica se encontraban dentro de los parámetros normales en esta especie. Todo animal que no superaba el examen físico, ortopédico o laboratorial era excluido del estudio. Tras este periodo previo de examen y selección se consiguió un grupo experimental homogéneo (Fig. 20).



Fig.19. La oveja (*Ovis orientalis aries*) fue el animal de experimentación empleado en esta Tesis Doctoral.



Fig. 20. Para la realización del estudio experimental se seleccionó un lote homogéneo de 20 animales, con un peso y una edad similar.

1.2. Condiciones de estabulación

Las ovejas fueron alojadas en las instalaciones de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba (España) en un establo grande con una parte exterior y otra interior (Fig. 21). La alimentación consistió en agua (disponible *ad libitum*), heno, paja y concentrado. Los animales fueron transportados al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba (España) durante un periodo de aclimatación de tres días antes de la intervención quirúrgica. Una vez operadas, las ovejas permanecieron en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba durante una semana, para recibir cuidados en el periodo postoperatorio más temprano. Después de esta primera semana, las ovejas regresaron a la Granja Experimental, y permanecieron allí hasta el final de estudio. Los animales eran alimentados y cuidados de manera rutinaria, siempre por el mismo personal, con el fin de que se acostumbrasen al manejo y manipulaciones durante el periodo postoperatorio.



Fig. 21. Los animales fueron estabulados en las instalaciones de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba. Dichas instalaciones poseían un patio interior y un patio exterior. El suelo del establo estaba en todo momento cubierto por una capa de paja, para que los animales tuviesen una superficie mullida donde apoyar la extremidad.

1.3. Procedimiento anestésico y manejo preoperatorio

Los animales se mantuvieron en ayunas de alimento sólido durante 36 horas antes de comenzar con el manejo preoperatorio, y el agua se mantuvo hasta las 6 horas previas a la cirugía. En la especie ovina es importante mantener un buen periodo de ayuno para intentar minimizar los problemas de regurgitación y timpanismo durante la cirugía y durante el periodo postoperatorio. Antes de empezar con la preparación preanestésica, los animales fueron pesados e identificados.

Una vez en la sala de preanestesia, y tras inmovilizar de manera adecuada al animal, se rasuró el cuello y se cateterizó la vena yugular externa usando un catéter de 14G (Vasocan[®] 14G 50 x 2,2mm; BBraun, Melsungen, Alemania) (Fig. 22). El catéter se fijó a la piel con un dos puntos de sutura (Seda, Silkam[®] 2-0; BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania). Como fluidoterapia durante la anestesia se empleó Ringer Lactato a un ritmo de infusión de 10 ml/kg/hora (LR[®]; BBraun VetCare, Barcelona, España). Los animales fueron premedicados con dexmedetomidina 4 µg/kg IV (Dexdomitor[®] 0,5 mg/ml; Orion Pharma, Espoo, Finlandia) y butorfanol 0,3 mg/kg IV (Torbugesic[®] 1%, Fort Dodge, Girona, España). Se administró una dosis única de cefazolina 20 mg/kg IV (Kurgan[®] 1gr; Laboratorios Normon, Madrid, España) como antibiótico preoperatorio.



Fig. 22. La vena yugular externa fue cateterizada con el animal inmobilizado, y los agentes preanestésicos se administraron por vía intravenosa.

A los 15 minutos de la administración de los fármacos preanestésicos, se procedió a la inducción anestésica usando propofol 3 mg/kg IV (Propofol-Lipuro[®] 1%; BBraun VetCare, Barcelona, España). El animal se posicionó sobre la mesa de cirugía en decúbito esternal con el cuello estirado. Para llevar a cabo la intubación endotraqueal fue necesario contar con un laringoscopio especial de pala larga y recta, una sonda endotraqueal del número 12 con neumotaponamiento y un fiador metálico, que proporcionó rigidez a la sonda y facilitó su manipulación (Fig. 23). Una vez intubado el animal, la anestesia se mantuvo empleando isoflurano a una concentración inspirada de 1,4% - 1,5% (Isoflo[®]; Esteve, Barcelona, España). El animal fue ventilado mecánicamente en un modo controlado por volumen. La frecuencia respiratoria y el volumen tidal fueron ajustados para mantener la normocapnia a lo largo de toda la anestesia. La monitorización anestésica incluyó electrocardiografía, pulsioximetría, capnografía / capnometría, presión arterial invasiva (usando la arteria femoral de la extremidad izquierda), temperatura corporal, y análisis de los gases anestésicos. Todos estos parámetros fueron registrados con un monitor multiparamétrico acoplado al equipo de anestesia (S/5 Advance[®]; Datex-Ohmeda, GE Healthcare, Helsinki, Finlandia) (Fig. 24).



Fig 23. La oveja posee una abertura bucal muy pequeña, y la glotis se encuentra relativamente alejada de la entrada de la boca. Por ello, la intubación endotraqueal es particularmente difícil en esta especie. Para llevar a cabo esta maniobra fue necesario contar con un laringoscopio de pala larga y un fiador metálico que se introdujo por la luz del tubo endotraqueal y nos ayudó a dirigirlo hacia el interior de la tráquea.



Fig. 24. En los animales anestesiados se llevó a cabo una monitorización anestésica avanzada de los parámetros cardiovasculares y respiratorios. Los valores de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, presiones arteriales invasivas, saturación arterial de O₂, capnometría, fracción inspirada/espirda de gases anestésicos, temperatura corporal, entre otros, se registraron periódicamente durante todo el procedimiento anestésico.

La extremidad posterior derecha fue preparada asépticamente para la cirugía. Se rasuró desde proximal a la rodilla hasta la articulación metatarsofalangiana. La zona distal a la articulación metatarsofalangiana se cubrió con un guante, y posteriormente con una venda cohesiva. El animal fue posicionado y fijado sobre la mesa de cirugía en decúbito dorsal. La extremidad se colgó del techo, y el resto de la preparación prequirúrgica continuó con el miembro en suspensión (Fig. 25). En primer lugar se realizó un desengrasado de la piel con alcohol, y a continuación se limpió el campo quirúrgico con povidona yodada (Braunol®; BBraun VetCare, Barcelona, España). La extremidad fue aislada con paños de campo estériles. Tanto la preparación del campo operatorio, como el procedimiento quirúrgico fueron realizados respetando de manera estricta los principios de la técnica aséptica (Fig. 26).



Fig. 25. La extremidad posterior derecha se rasuró desde proximal a la rodilla hasta la articulación metatarsofalangiana proximal. La zona distal de la extremidad fue cubierta. La piel se desengrasó y se limpió con povidona yodada.



Fig. 26. La extremidad se colgó del techo, y se delimitó el campo quirúrgico mediante paños de campo estériles. La zona distal de la extremidad se cubrió con vendas cohesivas estériles. Todo el procedimiento quirúrgico se llevó a cabo respetando estrictamente las normas de asepsia.

1.4. Procedimiento quirúrgico

Todas las cirugías fueron realizadas por los mismos tres cirujanos, con la idea de conseguir un procedimiento quirúrgico lo más homogéneo posible. El abordaje quirúrgico al tendón de Aquiles se realizó a través de una incisión sobre la piel que lo recubre en su zona lateral. La incisión comenzó dos centímetros proximal a la tuberosidad del calcáneo y se extendió ocho centímetros proximalmente (Fig. 27). El tendón se liberó de la fascia que lo rodea, y el peritendón se incidió longitudinalmente (Fig. 28). Esto permitió una perfecta exposición del tendón de Aquiles (Fig. 29). Con ayuda de una regla quirúrgica, se marcó un punto situado cinco centímetros proximalmente a la inserción del tendón de Aquiles en la tuberosidad del calcáneo. En este punto fue donde se llevó a cabo la tenotomía (Fig. 30).



Fig. 27. Se realizó una incisión cutánea de 8 cm en la zona lateral de la piel que recubre el tendón de Aquiles.



Fig. 28. La fascia que recubre el tendón de Aquiles fue disecada, y el peritendón se incidió longitudinalmente.



Fig. 29. Este abordaje quirúrgico permitió una buena exposición del tendón de Aquiles.



Fig. 30. La tenotomía se realizó en un punto situado a 5 cm de la inserción del tendón de Aquiles en el hueso calcáneo.

Antes de crear el defecto quirúrgico se realizó la pre-sutura del tendón, usando un patrón en triple polea (Fig. 31). Este patrón consistió en tres lazadas orientadas 120° entre sí, y colocadas a diferente altura. La lazada inicial se colocó en forma cerca (1 cm desde el punto de tenotomía) – lejos (3 cm desde el punto de tenotomía). La segunda lazada fue colocada en un plano de 120° con respecto a la primera, en un punto a mitad de camino entre las posiciones cerca y lejos (2 cm desde el punto de tenotomía). La lazada final fue colocada en un patrón lejos-cerca, a 120° de las primeras dos lazadas (Fig. 32). El material de sutura empleado fue un monofilamento sintético no reabsorbible (polipropileno, Premilene[®] 1; BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania). El objetivo de realizar la pre-sutura del tendón antes de realizar la tenotomía fue facilitar la reconstrucción del defecto tendinoso una vez realizada la tenotomía, y conseguir una correcta aposición de los bordes tendinosos.

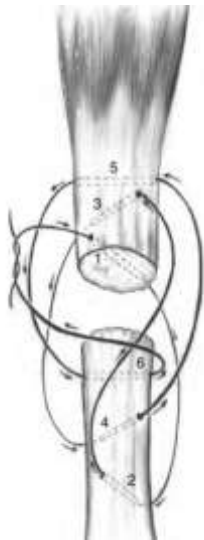


Fig. 31. Esquema de la sutura del tendón mediante un patrón en triple polea.

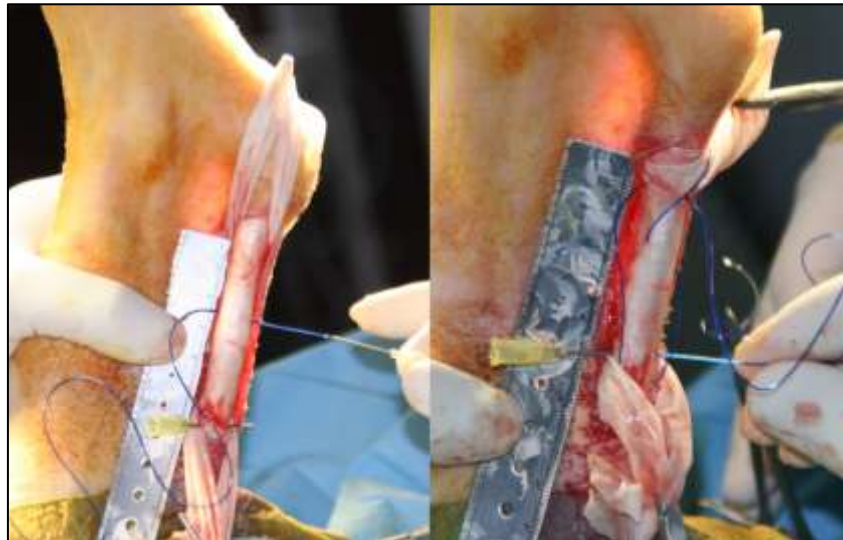


Fig. 32. Antes de realizar la tenotomía, se llevó a cabo la pre-sutura del tendón. Para ello se realizaron las diferentes lazadas que conforman el patrón en triple polea. La primera lazada se hizo pasando la sutura en forma cerca-lejos del punto de referencia donde se haría la tenotomía. La segunda lazada se hace entrando con la aguja en un punto intermedio entre la posición cerca y lejos. La última lazada se hace en forma lejos-cerca. Cada una de las lazadas se coloca en un plano de 120° con respecto a la lazada previa, de modo que estas nunca queden en el mismo plano.

La tenotomía se realizó de forma completa, interesando todos los componentes tendinosos que constituyen el tendón de Aquiles de la oveja (tendón accesorio, tendón gastrocnemio y tendón flexor digital superficial). Para ello se empleó una hoja de bisturí del número 22 (Scalpel Blade No. 22, BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania). Fue necesario retirar hacia un lado las diferentes lazadas del patrón en triple polea para no

cortar el material de sutura (Fig. 33). Una vez realizada la tenotomía, se procedió al anudado del patrón en triple polea, vigilando que los dos bordes tendinosos quedasen correctamente posicionados, y sin hueco entre ellos (Fig. 34 y Fig. 35).



Fig. 33. Tras retirar hacia un lado las lazadas de la triple polea, se realizó una tenotomía completa del tendón de Aquiles, justo 5 cm distal a la inserción del tendón en el calcáneo.

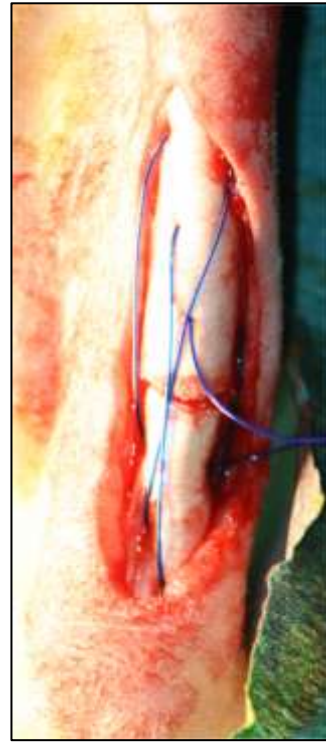


Fig. 34. Tras realizar la tenotomía se recolocaron las lazadas de la triple polea y se aproximaron los dos bordes tendinosos recién cortados.

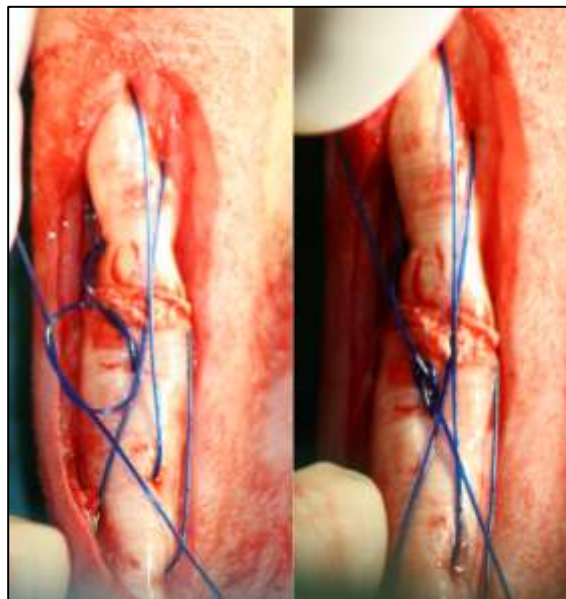


Fig. 35. Una vez aproximados los bordes tendinosos se procedió a anudar el patrón en triple polea. En este punto fue importante prestar atención para que los bordes de la tenotomía queden perfectamente posicionados.

El peritendón fue suturado con un patrón simple continuo con material monofilamento sintético reabsorbible (poligluconato, Monosyn[®] 3-0; BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania) (Fig. 36). El tejido subcutáneo se suturó siguiendo un patrón simple continuo con material monofilamento sintético reabsorbible (poligluconato, Monosyn[®] 2-0; BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania). Por último se realizó un cierre de la piel con puntos simples discontinuos y usando monofilamento no reabsorbible (poliamida, Dafilon[®] 2-0; BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania) (Fig. 37). La incisión se limpió con povidona yodada (Braunol[®]; BBraun VetCare, Barcelona, España) y se cubrió con un apósito estéril.



Fig. 36. Tras la reparación de la tenotomía, se procedió a la sutura del peritendón mediante un patrón simple continuo.



Fig. 37. Para el cierre cutáneo se empleó un patrón simple discontinuo.

1.5. Protección del tendón de Aquiles en el periodo postoperatorio

Un aspecto importante en este modelo experimental fue proteger la reparación del tendón durante el periodo postoperatorio. Para ello se diseñó un sistema que permitiese al animal apoyar peso sobre la extremidad sin someter al tendón de Aquiles a cambios de longitud o macromovimientos que pudiesen comprometer la integridad de la sutura. Este dispositivo fue un fijador externo transarticular tarsal modificado (T-TAESF) (Fig. 38). Un dispositivo similar fue usado por Skerry y Lanyon para inmovilizar el tarso de ovejas, y de esta manera producir una disminución de la densidad ósea en el calcáneo (Skerry y Lanyon, 1993; Skerry y Lanyon, 1995). El T-TAESF se colocó una vez suturada la piel y se mantuvo durante todo el experimento.

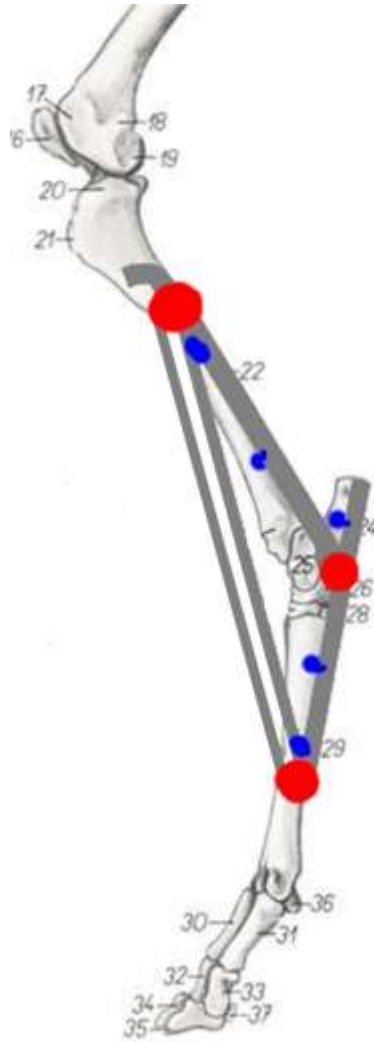


Fig. 38. Esquema del fijador externo transarticular de tarso (T-TAESF) que se empleó para inmovilizar el tarso y proteger así el tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio.

El T-TAESF se colocó en configuración unilateral-uniplanar en la cara medial de la extremidad posterior derecha. Se practicaron dos incisiones sobre la piel de la cara medial de la tibia a lo largo del eje óseo; una de ellas justo en la mitad de la diáfisis tibial y la otra en el tercio distal. A través de estas incisiones se disecó la fascia y tejido subcutáneo con ayuda de unas pinzas mosquito hasta evidenciar la superficie ósea (Fig. 39). A través de esta incisión se hizo un pre-taladrado de los orificios con una broca de 3.0 mm (Veterinary Instrumentation®; Sheffield, Reino Unido). En cada uno de esos orificios se insertó un aguja de 3.0 mm con rosca positiva en la punta (Veterinary Instrumentation®; Sheffield, Reino Unido) (Fig. 40). De un modo similar al anteriormente descrito, se insertaron otras dos agujas en la cara medial del metatarso.

Estas dos agujas atravesaban tanto el tercer como el cuarto metatarsiano, en su tercio proximal y en su mitad. Una última aguja se insertó en la cara medial del centro del calcáneo.



Fig. 39. Para colocar las agujas del T-TAESF se hicieron pequeñas incisiones cutáneas sobre la piel que recubría el punto donde se colocaría la aguja, y con ayuda de unas pinzas mosquito se disecó la fascia que recubría la superficie ósea.



Fig. 40. A continuación se fueron colocando las agujas de punta roscada de 3.0 mm, en orificios que habían sido previamente pre-taladrados con una broca de 3.0 mm.

El T-TAESF fue ensamblado mediante barras conectoras de 4 mm de acero inoxidable (Veterinary Instrumentation[®]; Sheffield, Reino Unido) unidas a las agujas mediante un sistema de rótulas Meynard de 3.0 mm x 4.0 mm (Veterinary Instrumentation[®]; Sheffield, Reino Unido). Las dos agujas de la tibia se unieron a una misma barra conectora (barra conectora de la tibia) y las dos agujas del metatarso junto con la aguja del calcáneo se unieron en otra misma barra conectora (barra conectora del metatarso) (Fig. 41). El extremo proximal de la barra conectora de la tibia fue doblado para evitar que las rótulas se deslizasen y se desmontase el sistema. El extremo distal de la barra conectora de la tibia se unió al tercio proximal de la barra conectora del metatarso mediante un sistema de rótulas de Meynard barra-barra de 4.0 mm x 4.0 mm (Veterinary Instrumentation[®]; Sheffield, Reino Unido). El extremo proximal de la barra conectora de la tibia fue unido al extremo distal de la barra conectora del metatarso

mediante la colocación de dos barras conectoras paralelas entre sí, y unidas mediante rótulas barra – doble barra de 4.0 mm x 4.0 mm (Fig. 42). Esta doble barra incrementaba la rigidez del sistema. El tarso fue inmovilizado con una angulación de 140° (medido con goniómetro), que es la angulación fisiológica normal del tarso de la oveja.



Fig. 41. Las agujas de la tibia se unieron a una misma barra conectora (barra conectora de la tibia), mientras que las agujas del metatarso y la del calcáneo se unieron a otra barra (barra conectora del metatarso). Ambas barras conectoras se unieron entre sí por medio de una rótula de Meynard barra-barra de 4.0 mm x 4.0 mm, formando un ángulo de 140°.

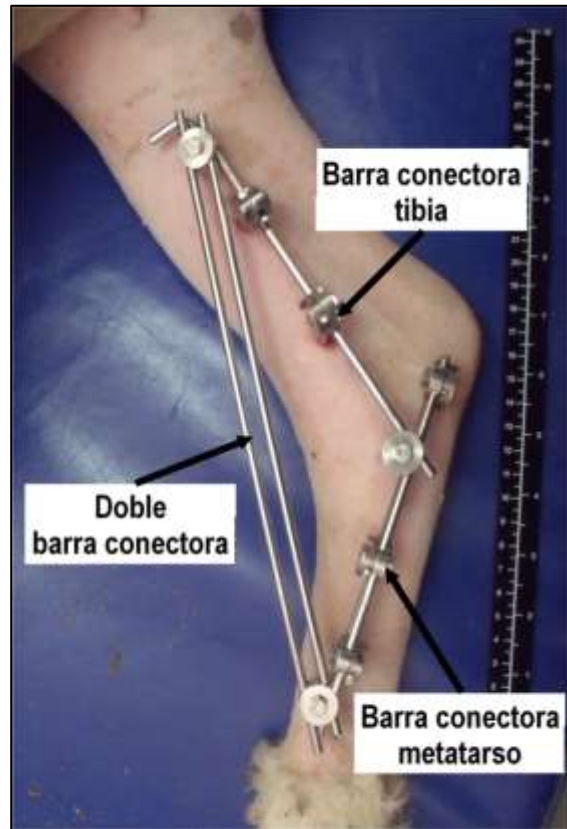


Fig. 42. Para proporcionar mayor rigidez al T-TAESF, tanto el extremo proximal de la barra conectora de la tibia, como el extremo distal de la barra conectora del metatarso se unieron mediante dos barras conectoras paralelas entre sí, y unidas mediante rótulas de Meynard barra – doble barra de 4.0 mm x 4.0 mm.

Tras apretar adecuadamente todas las rótulas, los orificios de entrada de las agujas se limpiaron con povidona yodada (Braunol®; BBraun VetCare, Barcelona, España) y se cubrieron con gasas estériles. El T-TAESF se cubrió mediante la colocación de un vendaje protector para evitar autotraumatismos en los animales e impedir que el fijador se golpee o enganchase con la malla metálica del establo (Fig. 43).



Fig. 43. El T-TAESF fue protegido mediante un vendaje para evitar que los animales se golpearan y se hiciesen daño con las barras conectoras. Además, este vendaje protegía al fijador externo de golpes con el mobiliario del establo, y prevenía la contaminación de los orificios de entrada de las agujas.

1.6. Cuidados postoperatorios

Una vez que los animales fueron extubados se llevaron a una sala de recuperación y fueron vigilados hasta que se mantuvieron en pie por sí mismos (Fig. 44). Tras la cirugía se administró una dosis de antibiótico de amplio espectro y acción prolongada (bencilpenicilina 15000 IU/kg IM junto con dihidroestreptomicina 15 mg/kg IM) (Shotapen[®] LA; Virbac Salud Animal, Barcelona, España), que se volvió a repetir a las 72 horas de la cirugía. Para garantizar una adecuada cobertura analgésica se empleó buprenorfina 0.02 mg/kg/8h IM (Buprex[®] 0.3 mg; Shering-Plough, Madrid, España) durante 5 días tras la cirugía. Los animales no recibieron ningún fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ni corticoesteroides que pudiesen interferir con los procesos inflamatorios que intervienen en el mecanismo de reparación tisular.



Fig. 44. Durante la recuperación anestésica, los animales se mantuvieron en una habitación acolchada y estuvieron en todo momento asistidos por uno de los investigadores, para evitar que se golpeasen contra el suelo o paredes.

Durante la primera semana tras la cirugía, los cuidados postoperatorios (cambio del vendaje, desinfección y evaluación de la herida quirúrgica) se llevaron a cabo diariamente en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba. Después, los animales regresaron a la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba y allí continuaron los cuidados postoperatorios semanalmente durante todo el experimento.

2. Metodología de obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles de la oveja

Como ya hemos estudiado en la revisión bibliográfica, actualmente existen una enorme cantidad de productos terapéuticos autólogos ricos en plaquetas, todos ellos comúnmente denominados PRP. Cada uno de estos productos se obtiene mediante una metodología que puede diferir significativamente entre un producto y otro. Estas diferencias en el protocolo de obtención irremediablemente se asocian con diferencias importantes en la formulación del PRP, tanto desde el punto de vista de composición celular como de concentración de factores de crecimiento (Anitua et al., 2009a; Dohan Ehrenfest et al., 2009; Engebretsen et al. 2010). Con el objetivo de intentar definir con la mayor precisión posible la metodología de obtención del PRP usado en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, nosotros hemos empleado PRGF (PRGF-Endoret[®] System, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España). Este PRGF es un tipo de PRP que se caracteriza básicamente ser una fracción plasmática autóloga con una concentración moderada de plaquetas (2 – 3 veces la concentración en sangre periférica), pobre tanto en leucocitos como eritrocitos, que se obtiene de manera sencilla y rápida (proceso de centrifugación único), y que emplea citrato de sodio como anticoagulante y cloruro de sodio como activador plaquetario (Anitua et al., 2009a). Anitua y colaboradores han empleado previamente con éxito este mismo protocolo de obtención de PRGF en la especie ovina (Anitua et al., 2006b).

2.1. Metodología de obtención del PRGF en la especie ovina

El protocolo de obtención del PRGF fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del laboratorio que ha desarrollado la utilización terapéutica de este producto (PRGF-Endoret[®] System, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España), y adoptando las consideraciones que Anitua y colaboradores definieron para la especie ovina (Anitua et al., 2006b).

2.1.1. Extracción de sangre

Para cada aplicación de PRGF se extrajeron cuatro tubos de sangre entera de la vena yugular externa del animal. La extracción de sangre se realizó a través de un sistema cerrado con aspiración por vacío (BD Vacutainer[®], Becton Dickinson Company, Madrid, España). Los tubos empleados tenían una capacidad de 5 ml, y contenían 0.5 ml de citrato de sodio (3.8%) como anticoagulante (BTI[®] Extraction Tube, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España). La extracción de sangre se hizo justo antes de administrar los fármacos preanestésicos, con el animal correctamente inmobilizado pero sin ningún tipo de sedación (Fig. 45). Todas las extracciones de sangre se realizaron por la mañana, dentro de una franja horaria similar, y con los animales en ayunas. De esta manera conseguimos minimizar el efecto que el ritmo circadiano ejerce sobre los parámetros hematológicos de los animales.



Fig. 45. La extracción de sangre se realizó de la vena yugular externa, usando un sistema de extracción cerrado con llenado por vacío. Este tipo de sistema de extracción minimiza el riesgo de contaminación bacteriana de la muestra de sangre.

2.1.2. Protocolo de centrifugado

Para llevar a cabo el aislamiento del PRGF, fue necesario someter la sangre a un proceso de centrifugación. Una vez llenos, los cuatro tubos de sangre se centrifugaron inmediatamente o, en un máximo de una hora tras la extracción. Los cuatro tubos procedentes de la misma oveja se introdujeron en una centrífuga comercializada también por la empresa BTI (BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España). Esta centrífuga se caracteriza por tener con un rotor oscilante 90°, de modo que cuando comienza a centrifugar mantiene los tubos en posición horizontal (Fig. 46). Este importante detalle hace que, tras el proceso de centrifugación, la interfase entre plasma y componente celular quede perfectamente horizontal, y por tanto se facilita el posterior proceso de pipeteo. La metodología para la obtención del PRGF requiere un único proceso de centrifugación, a diferencia de otros protocolos que requieren dos centrifugaciones a diferente velocidad (Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich et al., 2002; Weibrich et al., 2003; Weibrich et al., 2005). Los parámetros de centrifugación que se emplearon en este estudio para la obtención de PRGF en la especie ovina fueron 630G durante 8 minutos. Estos parámetros ya habían sido empleados previamente por Anitua y colaboradores para obtener PRGF en ovejas (Anitua et al., 2006b).

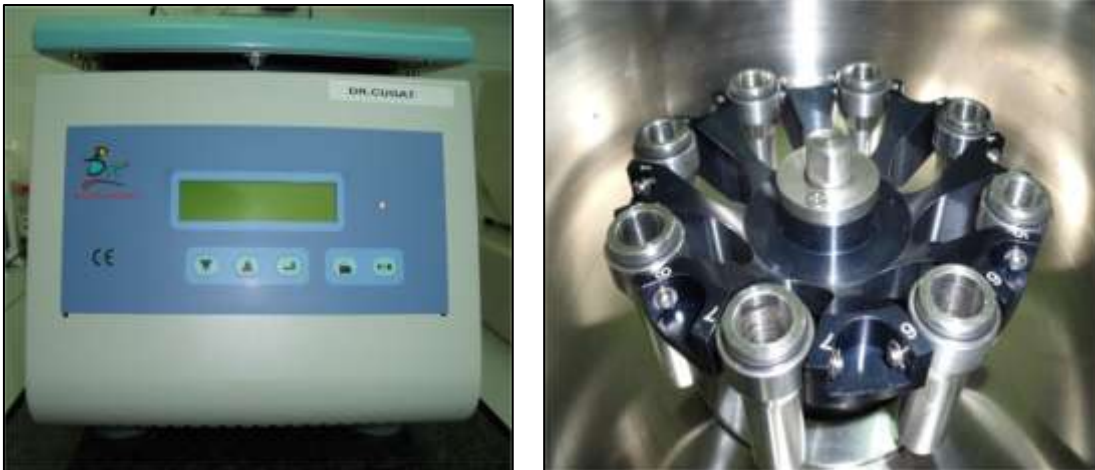


Fig. 46. Tras la extracción de la sangre, se procedió al centrifugado de la misma. El protocolo de centrifugación que se empleó para obtener el PRGF a partir de la sangre de oveja fue 630 G durante 8 minutos.

2.1.3. Fraccionamiento y aislamiento del PRGF

Tras la centrifugación de la sangre, se produjo una separación entre la fase plasmática y el componente celular. El componente celular de la sangre está compuesto en su mayoría por eritrocitos. Los leucocitos, debido a que poseen una densidad ligeramente inferior a la de los eritrocitos, se disponen en una interfase situada inmediatamente por encima del sedimento de eritrocitos. Esta interfase leucocitaria se conoce con el nombre de “*buffy coat*” (Fig. 47). Las plaquetas poseen una densidad inferior a la de los leucocitos, y por tanto, tras el procedimiento de centrifugación quedan alojadas en la fracción plasmática situada inmediatamente por encima de los leucocitos. Es precisamente esta fracción plasmática la que recibe el nombre genérico de PRP. Algunos autores sostienen que la densidad de las plaquetas más jóvenes es ligeramente superior, y por tanto más parecida a la de leucocitos e incluso eritrocitos. Esto hace que, tras el proceso de centrifugación, una cantidad variable de plaquetas quedan alojadas en la capa leucocitaria o incluso en las porciones superiores del sedimento eritrocitario (Marx et al., 1998).

Para continuar con el aislamiento del PRGF fue necesario llevar a cabo un proceso de pipeteo fragmentado de la fracción plasmática obtenida tras el centrifugado de los cuatro tubos. Todo el procedimiento de pipeteo y fraccionamiento del plasma se realizó en una campana de flujo laminar, con guantes, gorro y mascarilla. Todos los accesorios que entraron en contacto con el PRGF, entre ellos pipetas regulables y puntas de pipetas, fueron previamente esterilizados (Fig. 48). Resulta fundamental realizar estos procedimientos prestando especial atención a las normas de asepsia, para así evitar la contaminación bacteriana del PRGF. Otro aspecto importante fue manipular los tubos, una vez centrifugados, siempre en posición vertical y con cuidado de no someterlos a movimientos bruscos que pudiesen mezclar las diferentes interfases. Todos los procesos de pipeteo fraccionado del plasma para la obtención de PRGF fueron realizados por el mismo investigador, para así minimizar el grado de variabilidad en el procedimiento debido al operador.



Fig. 47. Tubo de sangre tras el proceso de centrifugado. La fracción plasmática y el sedimento eritrocitario quedan separados por una delgada capa leucocitaria o "buffy coat".



Fig. 48. Todo el proceso de pipeteo de la fracción plasmática para el aislamiento del PRGF se realizó dentro de una campana de flujo laminar, empleando material estéril y respetando estrictamente las normas de asepsia. De esta manera se minimiza el riesgo de contaminación bacteriana del PRGF.

Durante el proceso de pipeteo de la fracción plasmática fue necesario ser muy meticuloso y cuidadoso para evitar crear turbulencias. Estas turbulencias podrían entremezclar la separación entre las diferentes interfases. Según la metodología descrita por BTI[®] Biotechnology Institute para el aislamiento de PRGF a partir de tubos de 5 ml, el PRGF es un volumen de 0.5 ml de plasma situado inmediatamente por encima de la capa leucocitaria. A continuación pasaremos a describir el proceso de fraccionamiento plasmático, para finalmente aspirar y aislar el PRGF (Fig. 49).



Fig. 49. Procedimiento de fraccionamiento del plasma para la obtención del PRGF, según las instrucciones de BTI[®] Biotechnology Institute. El volumen de plasma que se aspiró en primer lugar fue aquel situado más superficialmente (F1) y que correspondía al volumen total de plasma menos 1 ml. A continuación se extrajo la F2, que serían los siguientes 0.5 ml. Por último se aislaron los 0.5 ml que quedaron justo por encima de la capa leucocitaria. Esta última fracción constituyó el PRGF.

En primer lugar, se observó el volumen de plasma obtenido con ayuda de la graduación indicadora que tienen los tubos de extracción (BTI[®] Extaction Tube, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España). Esta cantidad de plasma varió en función del hematocrito de cada animal, pero rondó en torno al 50% del volumen de sangre extraído. Con ayuda de una micropipeta regulable que aspira un volumen de 500 μ l (Nichipet[®] EX 100~1000 μ l, Nichiryu Co., Tokio, Japón) y usando una punta de pipeta estéril, se retiró la fracción plasmática superior consistente en un volumen igual al volumen total de plasma menos 1 ml. Para ir aspirando las diferentes fracciones plasmáticas, se mantuvo la punta de la pipeta en todo momento en la zona plasmática superior, de modo que se van aspirando las diferentes fracciones desde arriba hacia abajo (Fig. 50). A este volumen de plasma se le conoce como fracción F1 (o Plasma Pobre en Plaquetas). Para cada uno de los cuatro tubos de un mismo paciente se repitió este mismo procedimiento. Las diferentes fracciones F1 de cada uno de los cuatro tubos se depositaron en unos tubos de fraccionamiento plasmático con interior estéril (BTI[®] Fractionation Tube, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España) (Fig. 51).



Fig. 50. A la hora de aspirar con la pipeta, fue importante colocar la punta de la misma justo en la zona más superficial del plasma, a nivel del menisco que se formaba por acción de la tensión superficial. El aspirado se realizó de manera suave, evitando movimientos bruscos que pudiesen ocasionar turbulencias.



Fig. 51. Las diferentes fracciones plasmáticas aisladas de cada uno de los cuatro tubos se depositaron en un tubo estéril correctamente identificado. Durante el paso de un tubo a otro fue importante cuidar que no se contamine ni la punta de la pipeta ni el interior de los tubos.

A continuación se procedió a la separación de la fracción F2. Esta fracción plasmática se correspondía con los siguientes 500 μ l. Para ello se empleó de nuevo la micropipeta regulable con un volumen de aspiración de 500 μ l. Las diferentes

fracciones F2 de cada uno de los cuatro tubos extraídos de cada paciente se reunieron en un mismo tubo de fraccionamiento correctamente identificado. Por último, con una micropipeta regulable que aspira un volumen de 100 μl (Nichipet[®] EX 20~200 μl , Nichiryo Co., Tokio, Japón) y usando una nueva punta de pipeta estéril, se extrajo la fracción de PRGF. El PRGF se correspondía con los 500 μl que quedan justo por encima de la capa leucocitaria, y por lo tanto fue necesario repetir 5 veces el proceso de aspirado para extraer los 500 μl que componían esta última fase. Durante el aspirado de esta fase plasmática fue importante evitar crear turbulencias, y sobre todo evitar el aspirado tanto de hematíes como leucocitos. Teóricamente esta fracción plasmática es la más rica en plaquetas y factores de crecimiento. Las fracciones correspondientes al PRGF de cada uno de los cuatro tubos de un mismo paciente se reunieron en un mismo tubo de fraccionamiento estéril debidamente identificado. De cada paciente se obtuvo un volumen total de 2 ml de PRGF (4 tubos x 500 μl por tubo) (Fig. 52).



Fig. 52. Fraccionamiento finalizado. La fracción de PRGF de cada uno de los cuatro tubos se deposita en un tubo de fraccionamiento correctamente identificado. El volumen de PRGF final es de 2 ml (0.5 ml por cada tubo de sangre).

2.1.4. Activación del PRGF

El proceso de activación de las plaquetas contenidas en el PRGF se llevó a cabo usando cloruro de calcio exclusivamente, de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio que desarrolló el empleo terapéutico del PRGF (BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España). De esta manera, se emplearon 50 μl de cloruro de calcio

10% (Cloruro de Calcio 10%, BBraun Medical, Barcelona, España) por cada mililitro de PRGF que se deseaba activar. El proceso de activación del PRGF se llevó a cabo justo antes de la aplicación del PRGF en la zona de la lesión.

2.2. Aplicación de PRGF en la zona lesionada

Según hemos estudiado en la revisión bibliográfica, existen diversas formas de realizar las aplicaciones de PRP en el tendón lesionado. En algunos estudios se ha propuesto la aplicación de matrices de PRP recubriendo la zona de la reparación quirúrgica del tendón (Sanchez et al., 2007), mientras que en otros estudios se propone la infiltración de PRP en torno a los bordes del tendón lesionado (Schepull et al., 2011). En nuestro trabajo se optó por la aplicación del PRGF activado en forma líquida mediante infiltración de los bordes tendinosos.

Actualmente no existe consenso sobre si el proceso de cicatrización tendinosa se beneficia más de una aplicación única de PRP, o si bien son necesarias aplicaciones repetidas de este producto para mejorar la reparación tendinosa (Andía et al., 2010). En nuestro estudio se llevó a cabo una inyección intraoperatoria de PRGF, y posteriormente se llevaron a cabo inyecciones semanales de PRGF durante las siguientes 3 semanas. El protocolo de aplicación de PRGF usado en este estudio fue similar al que previamente habían empleado Anitua y colaboradores (2006) en su estudio acerca del efecto del PRGF sobre el tendón de Aquiles, donde también emplearon un modelo experimental ovino e infiltraciones tendinosas repetidas semanalmente (Anitua et al., 2006).

2.2.1. Aplicación intraquirúrgica del PRGF

La sangre para la preparación del PRGF fue extraída justo antes de la preparación preanestésica, de modo que el centrifugado y aislamiento del PRGF se llevó a cabo al mismo tiempo que se realizaba la cirugía. El tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y la aplicación del PRGF en la zona de la lesión nunca superó la hora. Una vez que se terminó de suturar el peritendón, se procedió a la activación y aplicación del PRGF. El volumen de 2 ml de PRGF contenido en el tubo

de fraccionamiento correspondiente se cargó en una jeringa de 2 ml (Jeringa Injekt® 2 ml, BBraun Medical, Barcelona, España). Para la activación del PRGF se empleó un volumen de 0.1 ml de cloruro de calcio al 10% (50 µl/ml de PRGF), que se cargó en una jeringuilla de insulina (Jeringa Omnifix® 1 ml, BBraun Medical, Barcelona, España) con una aguja de 23G (Aguja Sterican® 23G, BBraun Medical, Barcelona, España) (Fig. 53). El cloruro de calcio se introdujo en el interior de la jeringa que contenía el PRGF, y se agitó suavemente (Fig. 54). A partir de este momento comenzó el proceso de activación plaquetaria, y el PRGF empezó a gelificar. El tiempo que transcurre hasta que el PRGF se convierte en gel es variable, y depende fundamentalmente de la temperatura a la que se encuentre la mezcla. Por ello, si queremos realizar una aplicación de PRGF activado en su forma líquida, no podemos demorar la inyección tras su activación, ya que si se produce la gelificación del PRGF en el interior de la jeringa no sería posible su inyección a través de la aguja.



Fig. 53. Jeringa con los 2 ml de PRGF junto con el volumen de cloruro de calcio que fue empleado para la activación plaquetaria.



Fig. 54. El cloruro de calcio se introdujo en el interior de la jeringa con el PRGF y se mezcló suavemente. A partir de este momento se produce la activación del PRGF, y no se debe demorar la aplicación del mismo en la zona de la lesión. Antes de la inyección intratendinosa del PRGF activado fue necesario eliminar todo el aire y burbujas del interior de la jeringa.

Una vez activado el PRGF, se procedió a su inyección en los bordes tendinosos recién reparados. Para la inyección se empleó una aguja de calibre 23G (Aguja Sterican® 23G, BBraun Medical, Barcelona, España). Esta primera aplicación intraoperatoria del PRGF se llevó a cabo mediante inspección directa, de modo que el cirujano se encargó de infiltrar un volumen de un mililitro en cada uno de los bordes tendinosos que habían sido suturados previamente. Para llevar a cabo esta infiltración intratendinosa se pinchaba el tendón y se dejaba una pequeña cantidad de PRGF, a continuación se redirigía la aguja en el interior del tendón y se volvía a

dejar otra pequeña cantidad de PRGF, y así sucesivamente hasta conseguir infiltrar todo el borde tendinoso (Fig. 55). Una vez terminada la infiltración se procedía al cierre del plano subcutáneo y piel.



Fig. 55. La aplicación intraquirúrgica del PRGF se realizó justo tras la sutura del peritendón. Los dos bordes tendinosos recién suturados fueron infiltrados empleando una aguja de 23G.

2.2.2. Aplicaciones de PRGF durante el periodo postoperatorio

Durante el periodo postoperatorio se llevaron a cabo tres aplicaciones de PRGF, una aplicación cada semana. La primera de estas aplicaciones postoperatorias se llevó a cabo justo a la semana de la cirugía, y las dos posteriores durante las siguientes dos semanas. En nuestro trabajo, al igual que en el trabajo publicado previamente por Anitua y colaboradores, las aplicaciones de PRGF se espaciaron una semana entre sí (Anitua et al. 2006b). Estas aplicaciones postoperatorias de PRGF consistieron en la inyección intratendinosa de PRGF activado en forma líquida y bajo control ecográfico.

Las aplicaciones postoperatorias de PRGF se llevaron a cabo con los animales sedados y correctamente inmovilizados. La sedación se consiguió tras la inyección

intravenosa de 0.02 mg/kg de xilacina (Xilagesic 2%[®] 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España). Antes de sedar al animal se realizaba la extracción de 4 tubos de sangre, y se aislaban 2 ml de PRGF. La piel de la zona que recubre el tendón de Aquiles fue rasurada, y se limpió con clorhexidina jabonosa (Desinclor[®] Solución jabonosa, Grupo AGB, Madrid, España). Una vez se retiró la mayor parte de la materia orgánica, la piel se preparó para llevar a cabo la inyección intratendinosa en unas adecuadas condiciones de asepsia. Para ello la piel se limpió usando gasas impregnadas en clorhexidina (Desinclor[®] Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España) (Fig. 56). El tendón de Aquiles se examinó ecográficamente y se localizó la zona de la reparación quirúrgica. A continuación, se activó el PRGF con el cloruro de calcio y se procedió a realizar la inyección de PRGF de manera ecoguiada. De esta manera se depositaba la dosis de PRGF justo en la zona de la lesión tendinosa (Fig. 57). Las infiltraciones intratendinosas se realizaron usando una aguja de 23G (Aguja Sterican[®] 23G, BBraun Medical, Barcelona, España). Una vez que se atravesaba la piel, se profundizaba hasta llegar al tendón y se depositaba una pequeña cantidad de PRGF. A continuación se redirigía la aguja, siempre bajo guía ecográfica, y se depositaba nuevamente PRGF. Este procedimiento se repetía hasta infiltrar toda la zona de lesión con los 2 ml de PRGF. Entre la extracción de la sangre y la aplicación del PRGF nunca pasó más de una hora. Todas las aplicaciones ecoguiadas de PRGF en el tendón de Aquiles fueron realizadas por el mismo investigador, siguiendo la misma metodología de trabajo, con el objetivo de minimizar la variabilidad entre tratamientos debida al efecto del operador.



Fig. 56. La piel que recubre el tendón de Aquiles se rasuró y se preparó asépticamente para la inyección de PRGF. Las suturas sobre la piel de la zona lateral del tendón se emplearon a modo de referencia, y se situaron a 2, 5 y 8 cm de la inserción del tendón en el calcáneo.



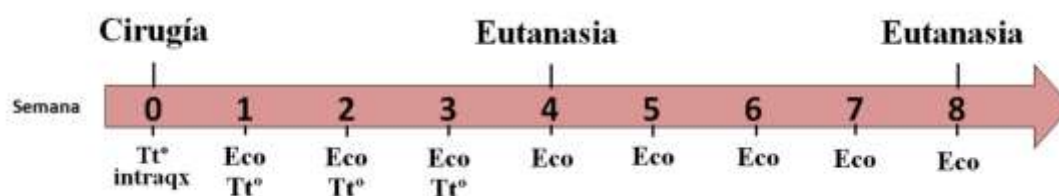
Fig. 57. El área de reparación tendinosa se localizó mediante ecografía, y se realizó la infiltración ecoguiada de PRGF justo en esa zona. De esta manera se conseguía una aplicación precisa del tratamiento y se minimizaba el daño causado por el pinchazo con la aguja.

3. Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología del estudio

Para la realización de la fase experimental de esta Tesis Doctoral se emplearon un total de 20 animales, que fueron aleatoriamente divididos en cuatro grupos de estudio. Cada uno de los grupos de estudio estuvo compuesto por 5 animales. En dos de los grupos de estudio los animales fueron sacrificados a las cuatro semanas de la cirugía, mientras que en los otros dos grupos los animales fueron eutanasiados a las ocho semanas de la cirugía. En cada uno de estos dos tiempos existía un grupo tratado con PRGF, y otro grupo tratado con solución salina (NaCl 0.9%®; BBraun VetCare, Barcelona, España):

Grupo PRGF – 4 semanas (n=5)	Animales tratados con PRGF y eutanasiados a las 4 semanas
Grupo SALINO – 4 semanas (n=5)	Animales tratados con SALINO y eutanasiados a 4 semanas
Grupo PRGF – 8 semanas (n=5)	Animales tratados con PRGF y eutanasiados a las 8 semanas
Grupo SALINO – 8 semanas (n=5)	Animales tratados con SALINO y eutanasiados a 8 semanas

Los grupos tratados con PRGF recibieron cuatro aplicaciones de PRGF, una de ellas intraquirúrgica y las otras tres aplicaciones se llevaron a cabo semanalmente durante la primera, segunda y tercera semana tras la cirugía. Los grupos tratados con salino recibieron una pauta idéntica de cuatro aplicaciones de solución salina. En los dos grupos experimentales que se llevaron hasta las ocho semanas, no se administró ningún tipo de tratamiento después de la tercera semana. Durante el periodo postoperatorio se llevaron a cabo controles semanales en todos los animales de los diferentes grupos de estudio. Durante estos controles semanales se realizó un examen físico general y ortopédico, y además se llevó a cabo una evaluación ecográfica del proceso de cicatrización del tendón. Tras la eutanasia de los animales (a las cuatro u ocho semanas, según el grupo experimental) se realizó una evaluación anatomopatológica del proceso de cicatrización del tendón.



4. Exámenes físicos durante el periodo postoperatorio

Durante el periodo postoperatorio se llevaron a cabo exámenes generales y ortopédicos de los animales todas las semanas. Los exámenes generales de los animales fueron realizados siempre por el mismo investigador, que era un veterinario colegiado. El objetivo de estos exámenes generales era evaluar el estado de salud de los animales con el fin de detectar posibles procesos sistémicos que pudiesen estar asociados con algún tipo de enfermedad sistémica o infección local. Para ello se evaluaron las constantes vitales de los animales (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, estado de carnes, tiempo de relleno capilar, estado de hidratación, auscultación torácica y abdominal), se evaluó el aspecto general del animal, presencia o no de apatía, anorexia o signos clínicos de dolor. Todas las anomalías relacionadas con el estado de salud general de los animales quedaban registradas en un historial de seguimiento de cada animal. Durante estos exámenes físicos semanales se evaluó el proceso de cicatrización de la herida quirúrgica y de los orificios de las agujas del fijador externo. Cualquier incidencia relacionada con el proceso de cicatrización (signos de infección, seroma, exudado, dehiscencia de las suturas, sangrado) era anotada en el historial de seguimiento. El T-TAESF fue inspeccionado semanalmente para comprobar su integridad y buen funcionamiento. Cualquier incidencia o complicación relacionada con el procedimiento quirúrgico, con las inyecciones intratendinosas de PRGF o con el T-TAESF quedaba registrada en el historial de seguimiento. Justo antes de la eutanasia se volvió a determinar el peso de los animales, y se comparó con el peso al inicio del estudio.

Semanalmente se llevó a cabo un examen ortopédico de los animales. Durante este examen ortopédico se evaluó subjetivamente el grado de cojera de la extremidad operada mediante una escala de valoración semicuantitativa. Esta escala de valoración semicuantitativa (*AAEP lameness scale*) iba de 0–5, y fue una modificación de la escala empleada por Keegan y colaboradores (Keegan et al., 2010) para evaluar el grado de cojera en caballos. Los animales que presentaban el grado máximo de cojera (sin apoyo de la extremidad) recibían un valor de 5, mientras que los animales que no tenían cojera aparente recibían un valor de 0. Además del grado de cojera, también se midió semanalmente el perímetro del muslo

de los animales con ayuda de una cinta métrica. Una disminución o un aumento progresivo en este valor nos podría indicar un proceso de atrofia o hipertrofia muscular respectivamente (Ferraresi et al., 2011). Estas mediciones siempre se hicieron colocando la cinta justo por encima de la rótula y pasando por detrás de la rodilla. Otro de los parámetros determinados durante estos exámenes ortopédicos semanales fue el grosor del tendón operado. Esta medida se realizó en un punto situado 5 cm proximalmente a la inserción del tendón en el calcáneo, y para ello se empleó un calibrador o pie de rey (Fig. 58).



Fig. 58. El grosor del tendón de Aquiles operado fue determinado a lo largo del periodo postoperatorio, usando para ello un calibrador o pie de rey. El punto de medición de este grosor se situó 5 cm proximal a la inserción en el calcáneo.

5. Estudio anatomopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

5.1. Eutanasia de los animales

Según el grupo al que perteneciesen, los animales fueron eutanasiados a las 4 o a las 8 semanas de la cirugía. La eutanasia se llevó a cabo de manera humanitaria, de acuerdo con la normativa vigente de protección de los animales de experimentación en Europa. Según esta normativa, la eutanasia en ovejas de experimentación debe de llevarse a cabo con los animales correctamente inmovilizados y/o sedados, de modo que disminuya el estrés y la ansiedad, y el proceso de eutanasia pueda realizarse mientras que el animal permanece tranquilo (Close et al., 1996). Previamente a la eutanasia, las ovejas se sedaron mediante la inyección intravenosa de 0.02 mg/kg de xilacina (Xilagesic 2%[®] 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España). Cuando los animales estuvieron correctamente sedados, se procedió a la eutanasia mediante la inyección intravenosa de 15 ml de un agente eutanásico comercial de uso veterinario (T-61[®]; Intervet, Madrid, España).

5.2. Examen macroscópico de los tendones

Tras la eutanasia de los animales, se retiró el T-TAESF y se extrajeron los tendones de Aquiles, tanto el tendón operado como el tendón contralateral. Los tendones contralaterales no operados se emplearon como control normal. Para la extracción de los tendones se realizó un corte con bisturí en la zona dorsal de la piel que recubre el tendón. A continuación se disecó el tejido subcutáneo que rodeaba al tendón, desde su inserción en el calcáneo hasta la unión musculotendinosa (Fig. 59). El hueso calcáneo se cortó con ayuda de una sierra ósea a nivel de la inserción del tendón de Aquiles. Otro corte se realizó proximalmente a nivel de la unión musculotendinosa. De esta manera se consiguió una extracción en bloque de los tendones de Aquiles (Fig. 60). Acto seguido, el tendón de Aquiles se dividió en dos

mitades. Para ello se realizó un corte de espesor completo en la línea media dorsal a lo largo del eje longitudinal del tendón con ayuda de una hoja de bisturí del número 22 (Scalpel Blade No. 22, BBraun Aesculap, Tuttlingen, Alemania). Por último se retiraron todos los restos de sutura que se habían empleado para reparar la tenotomía. (Fig. 61).



Fig. 59. Diseción del tendón de Aquiles tras la eutanasia de los animales. El tendón se disecó desde su inserción la tuberosidad del calcáneo hasta la unión musculotendinosa. Durante este procedimiento se valoró la formación de adherencias entre la zona de reparación y los tejidos adyacentes.



Fig. 60. En todos los animales se extrajeron ambos tendones de Aquiles. El tendón de la extremidad derecha fue el operado (PRGF vs. Salino), y el de la extremidad izquierda no fue operado, y se usó como control normal.

A continuación se realizó una inspección macroscópica del tendón de Aquiles, y se evaluó el proceso de cicatrización tendinosa mediante una escala de valoración semicuantitativa que evaluó las siguientes características: grado de adherencias entre la zona de reparación y los tejidos adyacentes, grosor de la zona de reparación (en comparación con el grosor del tendón contralateral), grado de unión de los bordes tendinosos, y apariencia del tejido de reparación. El valor final se obtenía tras sumar las valoraciones de los cuatro subapartados, pudiendo adquirir un valor mínimo de 0 (tendón con una pobre cicatrización) y un máximo de 10 (cicatrización tendinosa óptima desde el punto de vista macroscópico) (Tabla 3).



Fig. 61. El tendón de Aquiles fue dividido en dos mitades y los restos de sutura fueron retirados. El área de reparación tendinosa fue evaluada macroscópicamente según su apariencia, grosor y grado de unión de los bordes tendinosos.

Tabla 3. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación macroscópica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles.

Grado de adherencias (a nivel de la zona de reparación tendinosa)	(0-3)
Formación intensa de adherencias	0
Formación moderada de adherencias	1
Formación ligera de adherencias	2
Sin adherencias	3
Grosor en la zona de reparación tendinosa	(0-3)
Más de 2 veces el grosor del tendón normal	0
Entre 1.5 y 2 veces el grosor del tendón normal	1
Menos 1.5 veces el grosor del tendón normal	2
Igual grosor que el tendón normal	3
Grado de unión de los bordes tendinosos	(0-2)
No existe unión	0
Unión parcial	1
Unión completa (continuidad entre los bordes tendinosos)	2
Apariencia del tejido de reparación	(0-2)
Presencia de tejido de granulación amorfo	0
Presencia de tejido con aspecto fibrilar	1
Tejido similar al tendón adyacente	2

5.3. Examen microscópico de los tendones

5.3.1. Procesado y tallado de las muestras de tendón

Una vez que se evaluó macroscópicamente el proceso de cicatrización, se realizó la fijación de los tendones de Aquiles mediante la inmersión en botes de plástico con formol al 10% diluido en tampón fosfato pH 7.0 durante 48 horas. Durante el periodo de fijación, se prestó especial atención para que los tendones permaneciesen rectos y no se doblasen.

Tras la fijación de los tejidos, se procedió al tallado de los tendones. Para el tallado de las muestras, en primer lugar se identificó el área de reparación tendinosa en cada una de las mitades del tendón operado. A continuación, con ayuda de una hoja de bisturí, se cortó una loncha de tejido de aproximadamente 1 mm de espesor, paralela a la superficie del corte longitudinal que dividía al tendón en dos mitades. Esta loncha de tejido incluía toda la longitud del área de reparación, y se dividió a su vez por la mitad, justo en el centro del área de tejido de reparación. Cada una de estas dos mitades fue a su vez cortada de manera que cupiesen en los cassettes de inclusión en parafina, procurando que incluyeran todo el tejido de reparación y el borde proximal o distal al área de reparación, donde se apreciaba macroscópicamente la presencia de fibras tendinosas aparentemente normales (Fig. 62).

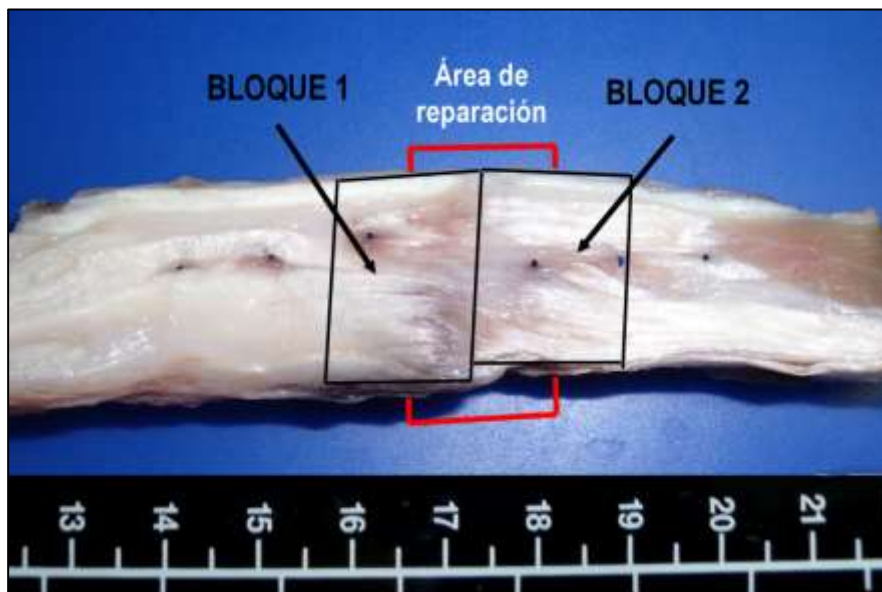


Fig. 62. De cada uno de los tendones operados se procesaron dos bloques de tejido. Entre estos dos bloques se conseguía incluir la longitud completa del área de reparación. En cada uno de los bloques también se trató de incluir o bien el borde proximal o bien el distal al área de reparación, donde se observaban macroscópicamente fibras tendinosas aparentemente normales.

El borde de la muestra de tejido recién tallada que contenía fibras tendinosas aparentemente intactas fue marcada mediante un tinte histológico de color amarillo (Tissue Marking Dye – Yellow[®], CellPath Ltd., Powys, Reino Unido) (Fig. 63). Cada una de estas dos mitades se incluyó en un bloque de parafina utilizando un programa estándar de 15 horas de duración en un procesador de tejidos automático (Shandon Hypercenter XP Enclosed Tissue Processor[®], Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, Estados Unidos). De este modo, por cada tendón de Aquiles operado se obtuvieron 2 bloques de tejido.

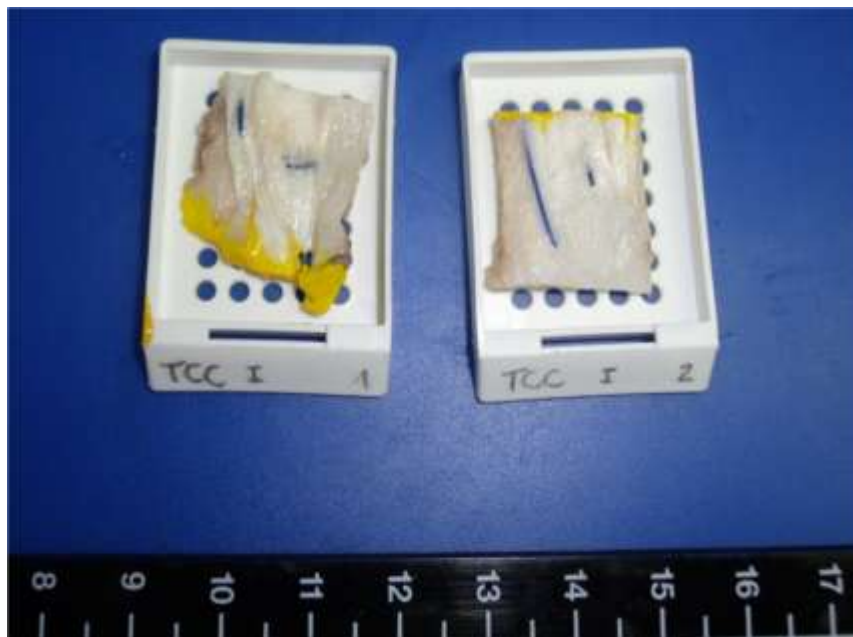


Fig. 63. Los dos bloques de tejido procedentes de un mismo tendón, se identificaron adecuadamente y se incluyeron en parafina. El borde del bloque donde se apreciaban fibras de tendón aparentemente normales fue identificado mediante un marcador tisular de color amarillo, para así facilitar su identificación durante el estudio microscópico.

El tendón contralateral (no operado) de cada uno de los animales fue tallado y procesado de manera que una loncha de tejido del tercio medio del tendón de Aquiles fue incluido en otro bloque de parafina. Estos tendones contralaterales fueron usados como control normal.

5.3.2. Preparación de los cortes histológicos

De cada uno de estos bloques se hicieron ocho secciones histológicas longitudinales no consecutivas de 3 μ m de grosor. Estas secciones histológicas

fueron montadas sobre un portaobjetos (Polisyne[®], Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania) previamente tratado con el agente adherente Vectabond[®] (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EEUU) del siguiente modo: 1) baño con acetona durante 5 minutos; 2) inmersión en el agente adherente Vectabond[®] diluido 1:50 en acetona durante 5 minutos; 3) lavado en agua destilada durante 30 segundos; 4) secado al aire. Los cortes histológicos fueron desparafinados e hidratados mediante el protocolo habitual de inmersiones en xilol y en alcoholes de gradación descendente.

5.3.3. Tinción histoquímica (Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson)

De los ocho cortes histológicos obtenidos por cada bloque, tres fueron teñidos con la técnica histoquímica Hematoxilina-Eosina, otros tres fueron teñidos con la técnica histoquímica Tricrómico de Masson, y los otros dos restantes fueron teñidos mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).

El protocolo de tinción con la técnica Hematoxilina-Eosina se realizó de la manera habitual, sumergiendo los cortes histológicos en la hematoxilina de Harris (Harris Hematoxylin[®], Diapath S.p.A., Mantinengo, Italia) durante 7 minutos. A continuación se lavaban en agua corriente durante 5 minutos, y por último se sumergían en Eosina (Eosina G o Y policrómica solución acuosa 1%[®], Diapath S.p.A., Mantinengo, Italia) durante 30 segundos.

La técnica histoquímica Tricrómico de Masson permite una buena visualización y estudio de las fibras de colágeno, y ha sido empleada previamente para el estudio del proceso de cicatrización en el tendón (Casalechi et al., 2009; Lyras et al., 2009a). El protocolo de tinción de la técnica Tricrómico de Masson se hizo empleando el kit de la casa comercial Bio-Optica[®] (Kit Tricrómico de Masson con azul de anilina, Bio-Optica[®], Milán, Italia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Una vez realizada la tinción de los cortes histológicos, se procedió al lavado de los mismos, fijación y montaje con un cubreobjetos, para su posterior estudio microscópico y conservación a largo plazo (Fig. 64).

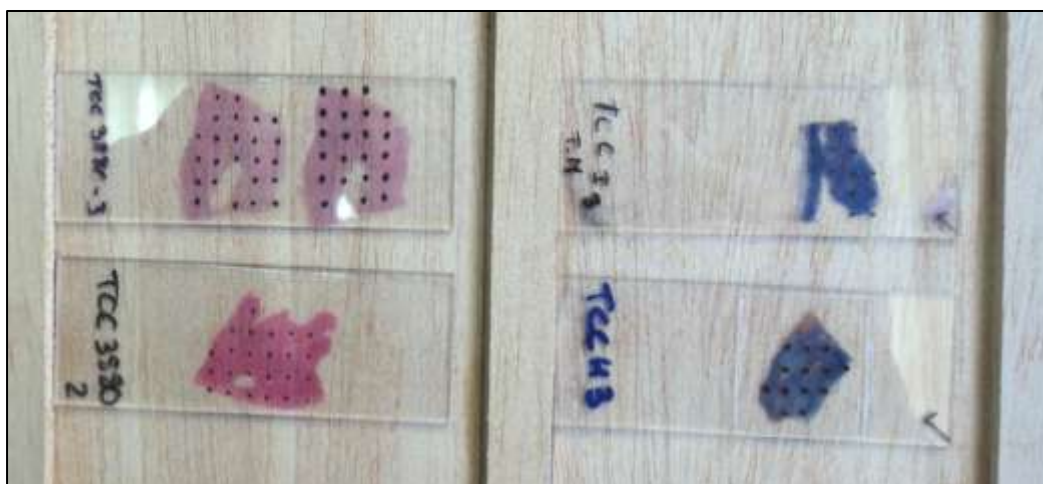


Fig. 64. Cortes histológicos de los tendones de Aquiles. A la izquierda se muestran los teñidos con Hematoxilina-Eosina y a la derecha los cortes histológicos teñidos con Tricrómico de Masson.

5.3.4. Tinción inmunohistoquímica (detección de colágeno tipo I y tipo III)

Para evaluar el tipo de colágeno sintetizado en la zona de cicatrización del tendón, dos de los cortes histológicos de cada bloque se tiñeron mediante técnicas IHQ para la detección de colágeno de tipo I y de tipo III. Los anticuerpos específicos empleados fueron los siguientes:

Colágeno tipo I: Anticuerpo de tipo policlonal, anti-colágeno tipo I bovino, desarrollado en conejo (Rabbit Anti-bovine Collagen type I Polyclonal Antibody[®], Millipore Iberica S.A., Madrid, España). Este anticuerpo es específico para la detección de colágeno de tipo I bovino, y es válido para llevar a cabo estudios IHQ en tejidos fijados con formol e incluidos en parafina.

Colágeno tipo III: Anticuerpo de tipo policlonal, anti-colágeno tipo III de rata, desarrollado en conejo (Rabbit Anti-rat Collagen type III Polyclonal Antibody[®], AbD Serotec, BioNova Científica S.L., Madrid, España). Este anticuerpo es específico para la detección de colágeno de tipo III en rata, y es válido para llevar a cabo estudios IHQ en tejidos fijados con formol e incluidos en parafina.

En primer lugar fue necesario estandarizar las técnicas IHQ de detección de colágeno tipo I y tipo III en el tendón ovino. Para ello se utilizaron muestras de tendón normal bovino (para colágeno tipo I), tendón normal de rata (para colágeno tipo III), tendón normal ovino y piel normal de oveja, procesadas de forma idéntica a

la ya descrita para las muestras de tendón, es decir, fijadas en formol tamponado al 10% e incluidas en parafina.

a) Controles positivos: Los cortes de tejido de tendón normal bovino (para colágeno tipo I), de rata (para colágeno tipo III), tendón ovino y piel normal de oveja se incubaron con los anticuerpos específicos. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

1. Funcionamiento de las técnicas desarrolladas en las muestras de tendón normal bovino (para colágeno tipo I) y de rata (para colágeno tipo III), ya que estas muestras contienen los antígenos frente a los que se desarrollaron los anticuerpos a ensayar (control positivo técnico).
2. La reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados con los correspondientes antígenos ovinos en las muestras de tendón y piel normal de oveja (control positivo de especie).
3. La dilución óptima de los anticuerpos utilizados en las muestras de tendón ovino.
4. El tratamiento de desenmascaramiento antigénico idóneo en las muestras de tendón ovino.

b) Controles negativos: Los cortes de tejido de tendón normal bovino (para colágeno tipo I), de rata (para colágeno tipo III), tendón ovino y piel normal de oveja no se incubaron con los anticuerpos primarios específicos sino con tampón fosfato (PBS) 0.01 M a pH 7.2. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

1. La presencia o ausencia de reacción del PBS con los tejidos objetos de estudio.
2. La presencia o ausencia de reacciones no deseadas de los productos utilizados para colorear la reacción antígeno-anticuerpo con los tejidos objeto de estudio (en los cortes incubados con PBS).

La metodología para la realización de las técnicas IHQ se dividía en las siguientes fases:

1. Preparación de los cortes de tejido para la reacción antígeno - anticuerpo: Las secciones histológicas fueron montadas sobre portaobjetos previamente tratados con el agente adherente Vectabond[®], y se dejaron secar durante una noche a 37°C. Tras desparafinar e hidratar los cortes de tejido mediante

inmersión sucesiva en xilol (3 baños de 10 minutos), alcohol de gradación decreciente (100°, 96° y 70°) (1 baño de 5 minutos en cada uno) y agua destilada, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno diluido al 3% en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. A continuación se llevó a cabo el procedimiento de desenmascaramiento antigénico, previamente estandarizado, mediante tratamiento de los cortes de tejido con tampón citrato 0.01M, pH 6'0 a temperatura elevada sin presión (98°C en vaso de precipitado por el procedimiento del “baño María”) durante 25 minutos. Por último, se procedió a tratar los cortes con suero normal de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente, para bloquear las posibles uniones inespecíficas de las distintas inmunoglobulinas.

2. Reacción antígeno – anticuerpo: Se llevó a cabo mediante la incubación de los cortes de tejido con el anticuerpo primario anti-colágeno (tipo I ó tipo III), diluido 1:50 en PBS 0.01 M, pH 7'2 con 10% de suero normal de cabra, durante 18 horas a 4° C en cámara húmeda.

3. Desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo para su visualización en microscopía óptica: Se llevó a cabo utilizando un procedimiento técnico estandarizado comercial (Vectastain ABC Kit[®], Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EEUU). Previamente se realizaron varios lavados con PBS a temperatura ambiente (un total de 3 de 10 minutos cada uno), para retirar los restos de anticuerpo primario no unido. La técnica de visualización consiste, básicamente, en la incubación de los cortes de tejido con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón desarrollado en cabra y conjugado con biotina (AO433, DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluido 1:20 en PBS con 10% de suero normal de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, los cortes se incubaron con el cromógeno 3.3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), diluido al 0.5% en Tris 0.05M pH 7'6 con 0.3% de peróxido de hidrógeno durante 1 minuto a temperatura ambiente, que sirve como sustrato para la técnica complejo avidina-biotina-peroxidasa. Tras lavar en agua corriente, se tiñó con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto a temperatura ambiente, para visualizar los núcleos.

5.3.5. Muestreo, selección y digitalización de las capturas histológicas

La valoración microscópica de determinados parámetros importantes del proceso de cicatrización tendinosa se llevó a cabo con ayuda de un programa informático de análisis de imagen microscópica (Image Pro Plus[®] versión 6.0, Media Cybernetics Inc., Bethesda MD, EEUU). Este programa informático se usa con frecuencia en el análisis de la imagen histológica, y ha sido empleado previamente en estudios donde se valoraba el proceso de cicatrización del tendón (Lyras et al., 2009a; Lyras et al., 2010a; Lyras et al, 2010b; Lyras et al., 2010c; Lyras et al. 2011). Para ello fue necesario llevar a cabo previamente un muestreo, selección y digitalización de las capturas histológicas en los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina.

El muestreo de los cortes histológicos para la posterior captura de microfotografías se realizó de una manera aleatoria y sistemática. Para ello, sobre los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina se superpuso una plantilla transparente punteada. Con ayuda de un bolígrafo permanente de punta fina, se marcaron puntos a lo largo de todo el área del corte histológico. Estos puntos marcados sobre el vidrio del portaobjetos se emplearon como referencia para elegir las zonas donde se tomaba la fotografía histológica. Estos puntos se localizaron fácilmente durante el examen microscópico, y la microfotografía se realizó en el campo microscópico localizado justo a la izquierda del punto (Fig. 65).

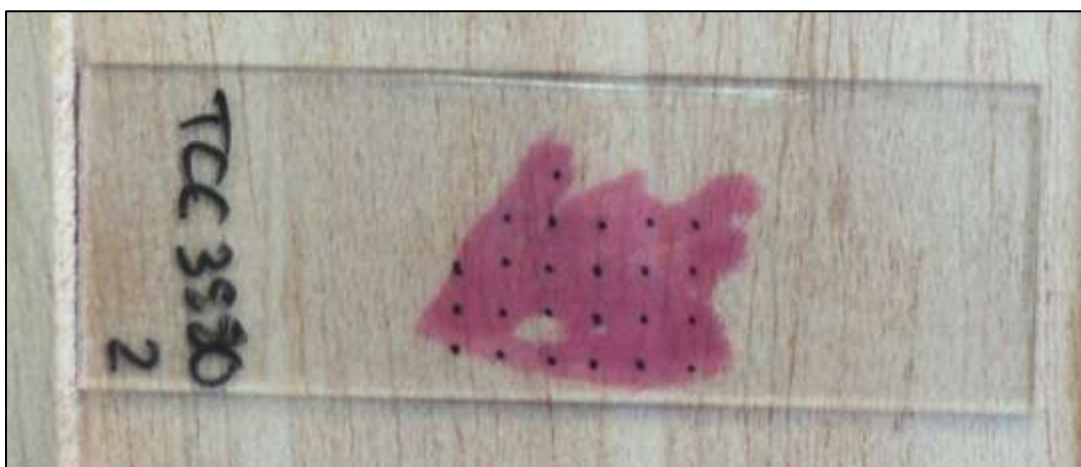


Fig. 65. Los cortes histológicos fueron muestreados de una manera sistemática y aleatoria. Para ello se superpuso una plantilla punteada sobre cada preparación se marcaron una serie de puntos.

Las microfotografías fueron realizadas y digitalizadas usando para ello un fotomicroscopio (Carl-Zeiss® Axiophot, Carl-Zeiss® Inc., Oberkochen, Alemania), con una cámara digital acoplada (Nikon® DS Camera Head DS-5M, Nikon® Corp., Tokyo, Japón). La cámara digital estaba unida a una unidad de control de digitalización de imágenes (Nikon® DS Camera Control Unit DS-L1, Nikon® Corp., Tokyo, Japón) que nos permitía observar, enfocar y realizar la captura de las imágenes microscópicas (Fig. 66).

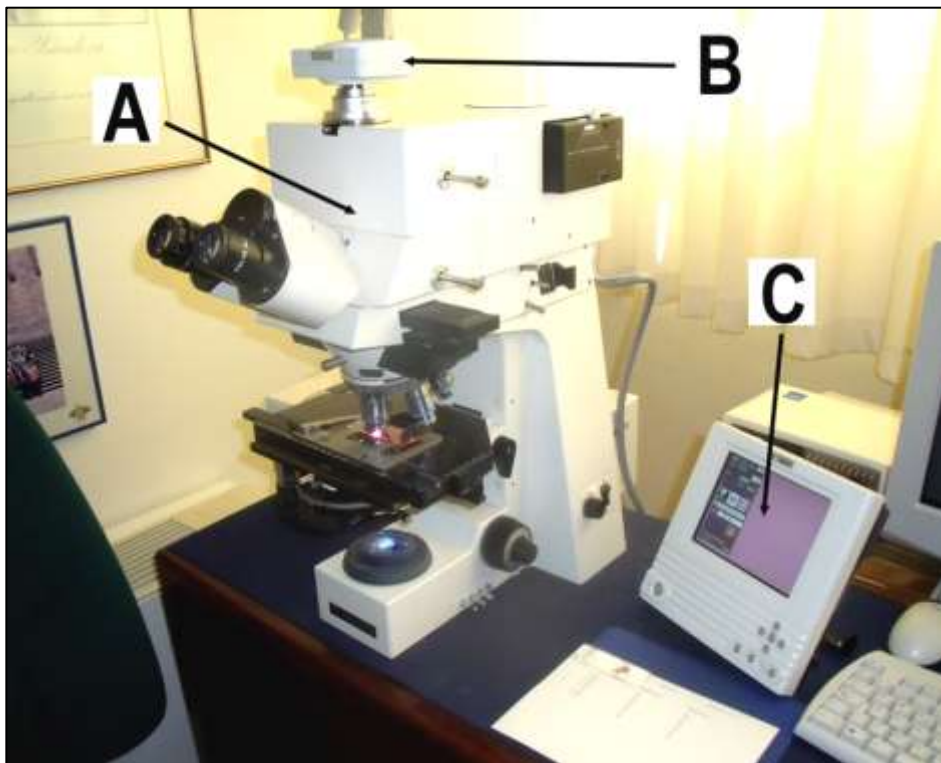


Fig. 66. Para la realización de las microfotografías se empleó un fotomicroscopio (A) unido a una cámara digital (B). Esta cámara digital estaba acoplada a una unidad de digitalización de imágenes (C).

Todas las microfotografías fueron realizadas con el eje longitudinal del tendón en posición horizontal. Este detalle fue crucial para que el programa de análisis de imagen nos diera valores correctos con respecto a la orientación de las células en la zona de reparación. Durante las primeras fases de la reparación tendinosa puede resultar difícil averiguar la dirección del eje longitudinal del tendón, debido a la severa desorganización de fibras existentes en el área de cicatrización. Para solventar este problema, se localizó el margen de la preparación histológica que

había sido teñido de amarillo con el marcador tisular. En este margen existían fibras de tendón intactas, que nos permitieron averiguar la orientación del eje longitudinal del tendón.

Se establecieron unos criterios exclusión para descartar microfotografías que no resultasen útiles para el posterior análisis asistido por ordenador. Estos criterios de exclusión incluyeron la existencia de artefactos histológicos (como por ejemplo rotos en el tejido debido al proceso de corte con el micrótopo, o anomalías de la tinción), o presencia de trayectos de sutura.

De cada una de las preparaciones histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina se tomaron un total de 9 capturas histológicas con una magnificación de x200, y otras 9 con una magnificación de x630. Como antes se ha descrito, de cada uno de los bloques se hicieron tres cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina, y de cada tendón se obtuvieron a su vez dos bloques. Esto hizo que de cada tendón de Aquiles estudiado se obtuviera una colección de imágenes microscópicas compuesta por 54 capturas (9 capturas/corte histológico x 3 cortes histológicos/bloque x 2 bloques) con una magnificación de x200 y otras 54 capturas con una magnificación de x630. Toda la colección de imágenes se almacenó en un ordenador equipado con el programa de análisis de imagen microscópica Image Pro Plus® versión 6.0. Las imágenes microscópicas fueron correctamente identificadas y posteriormente codificadas mediante la asignación de un código numérico para llevar a cabo la evaluación asistida por ordenador de una manera ciega.

5.3.6. Valoración microscópica de la cicatrización tendinosa

Para realizar una valoración microscópica del proceso de cicatrización tendinosa existen una serie de características histológicas clave que nos permiten definir de una manera precisa como está siendo la evolución de la reparación del tendón. Estas características histológicas se relacionan con la respuesta fisiológica normal del tendón ante un daño agudo. En esta Tesis Doctoral se estudiaron los siguientes parámetros histológicos del proceso de reparación tendinosa:

a) *Morfometría del núcleo de los fibroblastos*

Los fibroblastos son la célula clave del proceso de cicatrización del tendón, como ya hemos visto en la sección de “Cicatrización del tendón” de la Revisión Bibliográfica. El estudio de la morfología del núcleo celular proporciona datos cuantificables, que pueden ayudar a evaluar de manera más precisa cómo está evolucionando un determinado proceso histológico (Sala et al., 1994; Kirillov et al., 2001; Cui et al., 2007). En un estudio previo se han empleado datos morfométricos cuantitativos del núcleo de los fibroblastos para evaluar el proceso de cicatrización tendinoso (Hou et al., 2009a).

La cuantificación de los datos morfométricos del núcleo de los fibroblastos se realizó con la ayuda del programa informático de análisis de la imagen microscópica Image Pro Plus[®] versión 6.0, Media, que previamente había sido calibrado mediante el uso de una plantilla micrométrica. Los datos morfométricos del núcleo de los fibroblastos fueron calculados a partir en las capturas histológicas realizadas con una magnificación de x630. Una vez que la captura histológica era abierta con el programa informático de análisis de imagen, todos los núcleos de los fibroblastos contenidos en la foto eran cuidadosamente contorneados con ayuda de una tableta gráfica conectada al ordenador (Tableta gráfica Slimline Design TB-5300, Trust Spain[®] S.A., Madrid, España) (Fig. 67). Una vez que todos los núcleos de los fibroblastos estaban contorneados, el programa informático de análisis de imagen nos daba los valores de los siguientes parámetros morfométricos de cada una de las siluetas trazadas: área (μm^2), perímetro (μm), eje mayor (μm), eje menor (μm), aspecto nuclear [*nuclear aspect ratio* (NAR)], orientación nuclear [*nuclear orientation angle* (NOA)], y factor forma (Fig. 68).

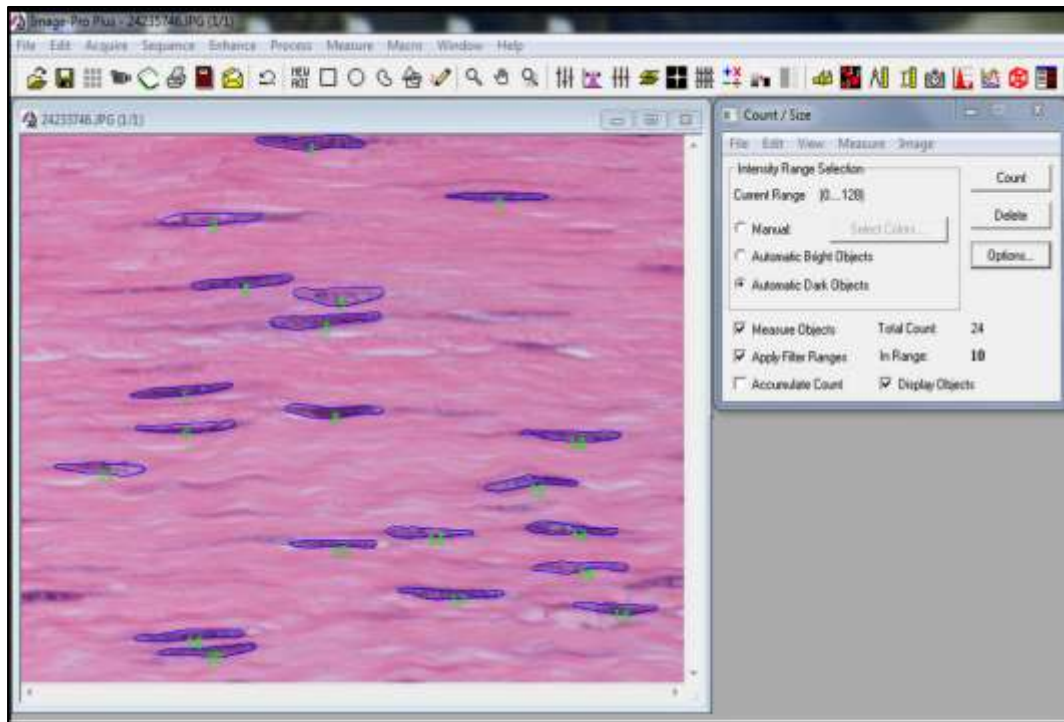


Fig. 67. Los núcleos de los fibroblastos de cada una de las imágenes histológicas tomadas a grandes aumentos (x630) fueron contorneados con ayuda de una tableta digital.

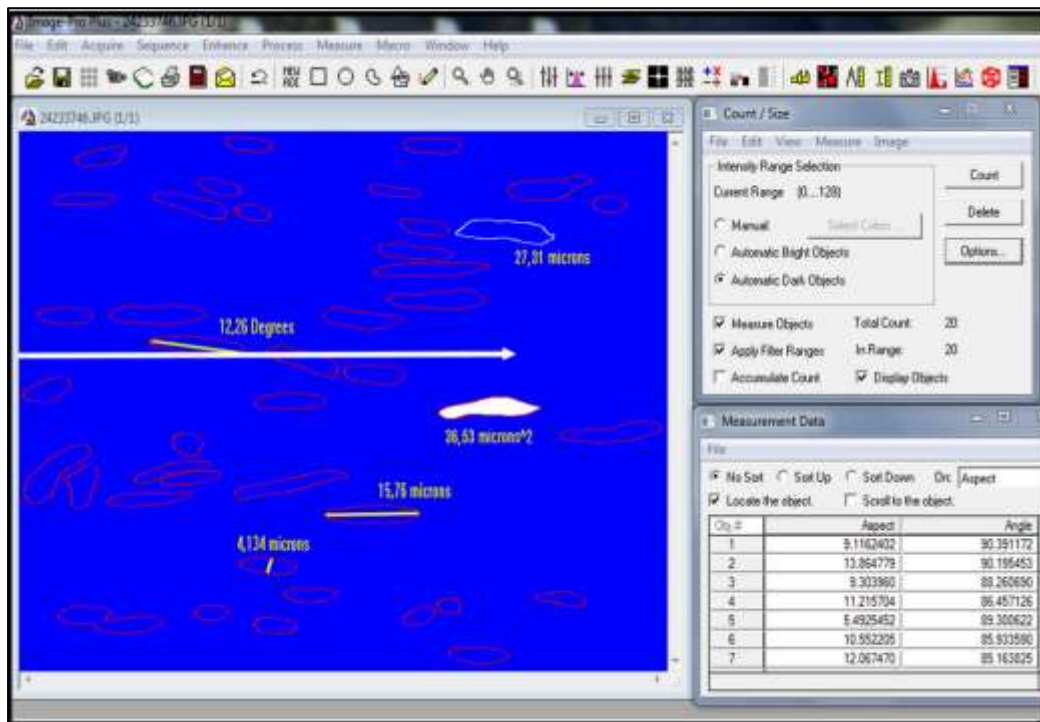


Fig. 68. El programa informático Image Pro Plus® versión 6.0, proporcionó los datos morfométricos de cada una de las siluetas correspondientes al contorno del núcleos de los fibroblastos.

El parámetro NAR fue definido como la relación existente entre el eje menor y el eje mayor del núcleo del fibroblasto (eje menor / eje mayor). A medida que este valor se aproximaba a cero, sugería una forma más alargada del núcleo; mientras que cuanto más cercano a uno sea este valor, más redondeada sería la forma del núcleo (Hou et al., 2009a). El parámetro NOA se definió como el ángulo existente entre el eje mayor del núcleo del fibroblasto y el eje longitudinal del tendón. Valores cercanos a 0° indicaban que el núcleo del fibroblasto estaba alineado con el eje longitudinal del tendón, mientras que valores extremos de 90° indicaban que la orientación del núcleo del fibroblasto era perpendicular al eje longitudinal del tendón (Hou et al., 2009a). El factor forma viene definido por la fórmula $[(\text{Perímetro}^2)/4 \times \pi \times \text{Área}]$. Este parámetro nos proporcionó una idea general de la morfología del núcleo del fibroblasto. Un valor igual o cercano a la unidad nos indicaba una forma circular, mientras que cuanto más se alejaba la forma del núcleo de un círculo, mayor era el valor de este parámetro.

Los datos morfométricos del núcleo de los fibroblastos en un tendón determinado fueron calculados a partir en las 54 capturas histológicas realizadas en ese tendón. En primer lugar se hizo el promedio de los valores de todos los fibroblastos de una misma captura, luego el promedio de los valores de las 9 capturas de un mismo corte histológico, posteriormente de los tres cortes histológicos de un mismo bloque, y por último el promedio de los dos bloques de un mismo tendón.

b) Densidad de fibroblastos

La densidad de fibroblastos es otro parámetro clave a la hora de evaluar el proceso de cicatrización del tendón. Además, se trata de un parámetro cuantificable, y por tanto permite una evaluación y comparación objetiva y precisa. La cuantificación de la densidad de fibroblastos se realizó mediante el programa informático de análisis de la imagen microscópica Image Pro Plus® versión 6.0. Para ello se emplearon las capturas histológicas realizadas con una magnificación de x630. Los núcleos de los fibroblastos fueron cuidadosamente contorneados, y a continuación se superpuso una plantilla de contaje con cuatro rectángulos con un área total conocida. El programa informático contaba las siluetas de los fibroblastos que quedaban dentro del área de los rectángulos de la plantilla de contaje, sin que

tocasen ninguno de los dos bordes de exclusión (Fig. 69). La densidad de fibroblastos se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: Densidad fibroblastos (fibroblastos/mm²) = N/A_f; donde N se correspondía con el número de fibroblastos contados dentro de la plantilla de contaje, y A_f era el área de los cuatro rectángulos de la plantilla de contaje (A_f = 0.004 mm²).

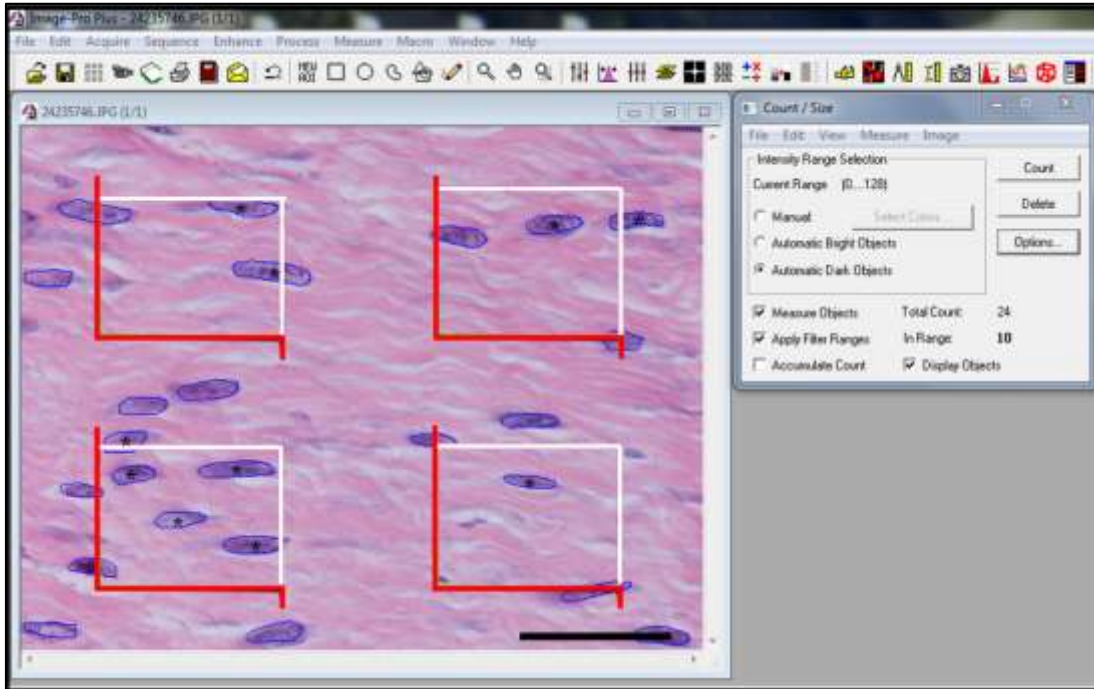


Fig. 69. La densidad de fibroblastos se calculó mediante la superposición de una plantilla de contaje sobre la imagen histológica capturada a una magnificación de x630. El programa informático Image Pro Plus® versión 6.0 contaba los núcleos de los fibroblastos que estaban dentro de los rectángulos de la plantilla de contaje. Para que los núcleos fuesen contados no debían de tocar los bordes de exclusión (bordes de color rojo). Los núcleos que tocaban los bordes blancos del rectángulo eran contados por el programa. El número total de núcleos contados [marcados con un asterisco (*)] era dividido entre el área total de los cuatro rectángulos de la plantilla de contaje (0.004 mm²) para obtener la densidad de fibroblastos (fibroblastos/mm²).

Los datos de densidad de fibroblastos en un tendón determinado fueron calculados a partir en las 54 capturas histológicas realizadas en ese tendón. En primer lugar se hizo el promedio de los valores de densidad de fibroblastos de los valores de las 9 capturas de un mismo corte histológico. Posteriormente se calculó el promedio de densidad de fibroblastos de los tres cortes histológicos de un mismo bloque, y por último el promedio de los dos bloques de un mismo tendón.

c) *Respuesta vascular*

Como ya se ha descrito en la sección “Cicatrización del tendón” de la Revisión Bibliográfica, la respuesta vascular juega un papel importante durante las fases proliferativa y de maduración del proceso de reparación del tendón. Esta respuesta vascular se caracterizó mediante la determinación de la densidad vascular en la zona de reparación y el diámetro de los capilares sanguíneos.

Tanto la densidad vascular como el diámetro de los vasos sanguíneos fueron cuantificados mediante el programa informático de análisis de la imagen microscópica Image Pro Plus[®] versión 6.0. Para ello se emplearon las capturas histológicas realizadas con una magnificación de x200. Los vasos sanguíneos fueron cuidadosamente contorneados, y a continuación eran contados. La densidad vascular se calculó dividiendo el número de vasos sanguíneos contados en la imagen histológica entre el área de la imagen capturada a una magnificación x200 (en nuestro estudio fue de 0.142 mm²). El diámetro medio de los capilares sanguíneos (µm) fue calculado mediante el programa Image Pro Plus[®] versión 6.0 a través de las siluetas previamente contorneadas (Fig. 70).

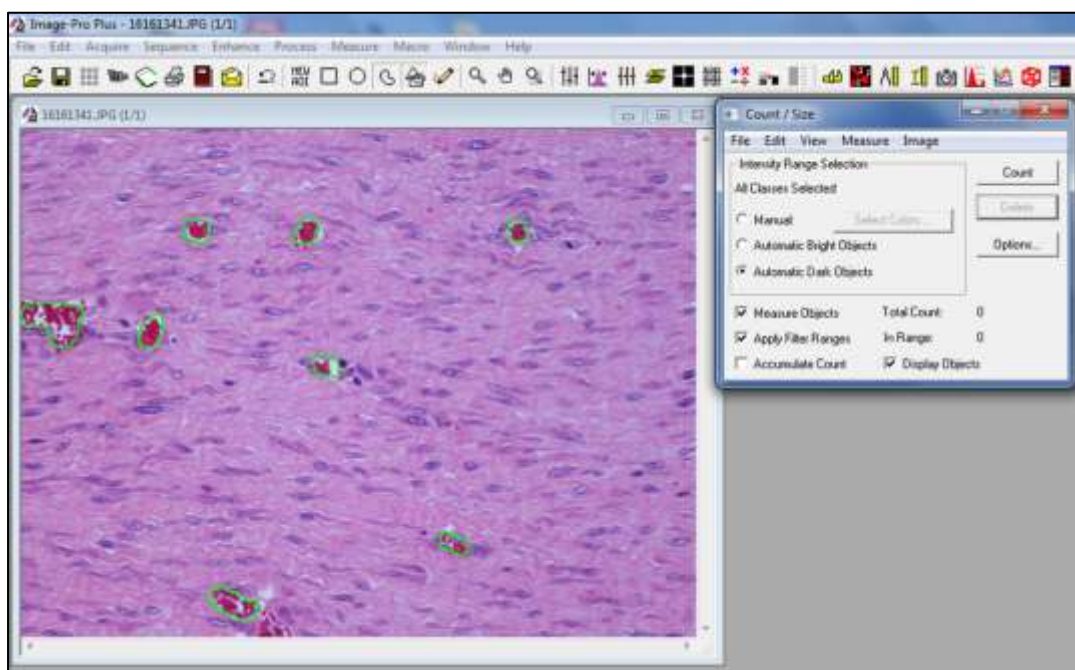


Fig. 70. Los vasos sanguíneos de cada una de las imágenes capturadas con una magnificación de x200 fueron contorneados, y posteriormente fueron contados. La densidad de vasos sanguíneos fue calculada tras dividir el número de vasos sanguíneos entre la superficie del área de la imagen histológica. El diámetro medio de los vasos sanguíneos también fue calculado.

d) Evaluación de la infiltración inflamatoria

El grado de infiltración inflamatoria en el área de reparación tendinosa fue calculado a partir de las imágenes histológicas teñidas con Hematoxilina-Eosina. La evaluación se hizo tras el examen microscópico de los cortes histológicos con un microscopio óptico de alta resolución, equipado con diferentes objetivos (x2, x4, x10, x20, x60) (Leica DM1000[®], Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España). La evaluación de la infiltración inflamatoria se realizó mediante una escala de valoración semicuantitativa (Tabla 4). Los cortes histológicos fueron evaluados de forma independiente por tres histopatólogos ciegos a los grupos de estudio, empleando la misma escala de valoración semicuantitativa. Posteriormente se ponían en común los resultados, y si existían diferencias en la valoración de alguno de los cortes histológicos se otorgaba una valoración tras alcanzar el consenso entre los tres especialistas.

Tabla 3. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación microscópica de la infiltración inflamatoria en la cicatrización del tendón (Modificada de Andersson et al., 2011)

Descripción Histológica	Valor (0-4)
Grado de inflamación severa , con presencia de células inflamatorias repartidas homogéneamente por todo el campo histológico	4
Presencia de un fuerte infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares	3
Grado de inflamación moderado , sobre todo en torno a los capilares sanguíneos	2
Presencia de ligero infiltrado inflamatorio	1
Ausencia de reacción inflamatoria	0

e) Organización de las fibras de colágeno

Buena parte de las propiedades biomecánicas del tendón vienen determinadas por una correcta organización de las fibras de colágeno que forman este tejido (Sharma y Maffulli, 2005a). Como ya hemos comentado en la sección “Cicatrización del tendón” de la Revisión Bibliográfica, a lo largo del proceso de cicatrización del tendón, se produce una reorganización progresiva de las fibras de colágeno. Por ello, la evaluación del grado de organización de las fibras de colágeno nos puede dar una buena idea de cómo está evolucionando el proceso de cicatrización en el tendón. A la hora de evaluar el grado de organización de las fibras de colágeno, se estudiaron dos parámetros importantes que definen la estructuración histológica de las fibras de colágeno en el tendón. Uno de estos parámetros fue el grado de compactación de las fibras de colágeno, y el otro fue el grado de orientación de las fibras de colágeno. El primero de estos parámetros nos indicaba como de empaquetadas están las fibras de colágeno que componen el tendón, de manera que a mayor madurez del proceso cicatricial cabe esperar un mayor grado de compactación de estas fibras. El segundo de los parámetros nos indicaba la disposición de las fibras de colágeno en el seno de la zona cicatricial. En un primer estadio del proceso de cicatrización, las fibras de colágeno se disponen de forma anárquica, y a medida que va madurando la reparación, las fibras de colágeno se disponen paralelamente al eje de carga del tendón, para así optimizar sus propiedades biomecánicas (Platt, 2005; Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007).

Para la evaluación histológica de la organización de las fibras de colágeno se emplearon los cortes histológicos teñidos con la técnica Tricrómico de Masson, que nos permitía una mejor visualización de los haces de colágeno. El examen microscópico se realizó usando un microscopio óptico de alta resolución, equipado con diferentes objetivos (x2, x4, x10, x20, x60) (Leica DM1000[®], Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España). La valoración de la organización de las fibras de colágeno se hizo mediante el uso de dos escalas de valoración semicuantitativa de cinco puntos; una para valorar el grado de compactación de los haces de colágeno, y la otra para valorar la orientación de las fibras de colágeno. Estas escalas fueron diseñadas a partir de escalas de valoración semicuantitativa empleadas previamente en tres artículos de diferentes autores que evaluaban la

organización de las fibras de colágeno en el proceso de cicatrización del tendón (Tabla 5 y 6) (Murray et al., 2007b; Casalechi et al., 2009; Oemeroglu et al., 2009). Los cortes histológicos fueron evaluados de forma independiente por tres histopatólogos ciegos a los grupos de estudio, empleando las mismas escalas de valoración semicuantitativa. Posteriormente se ponían en común las valoraciones, y si existían diferencias en la valoración de alguno de los cortes histológicos se otorgaba una valoración tras alcanzar el consenso entre los tres especialistas.

Tabla 5. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación microscópica del grado de compactación de las fibras de colágeno.

Descripción Histológica	Valor (0-5)
Formación homogénea de haces de colágeno altamente empaquetados	5
Formación regular de haces de colágeno con una compactación densa	4
Formación regular de haces de colágeno con una compactación moderada	3
Formación regular de haces de colágeno con una compactación pobre	2
Presencia de sustancia fundamental amorfa	1
Ausencia de colágeno	0

Tabla 6. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación microscópica de la orientación de las fibras de colágeno.

Descripción Histológica	Valor (0-5)
Haces de colágeno paralelos al eje del tendón	5
Haces de colágeno con una angulación ligera con respecto al eje del tendón	4
Haces de colágeno con una angulación moderada con respecto al eje del tendón	3
Haces de colágeno con una angulación marcada con respecto al eje del tendón	2
Haces de colágeno sin orientación específica	1
Ausencia de colágeno	0

f) Evaluación inmunohistoquímica del colágeno tipo I y tipo III

Para la evaluación de los cortes histológicos teñidos mediante técnicas IHQ, se tuvo en cuenta tanto la extensión como la intensidad de la reacción con los anticuerpos específicos, ya sea colágeno tipo I o colágeno tipo III. La evaluación de la reacción IHQ se realizó mediante una escala de valoración semicuantitativa, que tenía dos subapartados, uno donde se evaluaba la extensión de la reacción IHQ, y otro que evaluaba la intensidad de esta reacción. El valor final se obtenía tras sumar las valoraciones de los dos subapartados, pudiendo adquirir un valor mínimo de 0 y un máximo de 6 (Tabla 7). Este sistema de evaluación mediante el empleo de una escala de valoración semicuantitativa ha sido empleado previamente para la valoración de la reacción IHQ frente a colágeno tipo I y colágeno tipo III en un estudio donde se evaluaba la cicatrización en el tendón de Aquiles de oveja (Crovace et al., 2008).

Tabla 7. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación de la extensión y la intensidad de la reacción inmunohistoquímica frente a colágeno tipo I o colágeno tipo III.

Extensión de la reacción inmunohistoquímica	(0-3)
Inexistente	0
Menos del 50% del corte histológico	1
Entre el 50 – 80% del corte histológico	2
Más del 80% del corte histológico	3
Intensidad de la reacción inmunohistoquímica	(0-3)
Inexistente	0
Débil	1
Moderada	2
Fuerte	3

Los cortes histológicos fueron evaluados de forma independiente por tres histopatólogos ciegos a los grupos de estudio, empleando la misma escala de valoración semicuantitativa. Posteriormente se ponían en común las valoraciones, y si existían diferencias en la valoración de alguno de los cortes histológicos se otorgaba una valoración tras alcanzar el consenso entre los tres especialistas.

6. Estudio ecográfico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

A lo largo de todo el periodo postoperatorio se llevó a cabo un seguimiento y monitorización del proceso de cicatrización del tendón mediante el uso de ecografía. Como ya se ha destacado en el correspondiente apartado de la revisión bibliográfica, la ecografía es un método ampliamente empleado para evaluar de manera no invasiva el proceso de cicatrización del tendón durante el periodo de recuperación, tanto en la clínica diaria (Robinson, 2009), como en estudios experimentales (Bosch et al., 2011). A continuación pasamos a describir cómo se llevaron a cabo estos estudios ecográficos en el tendón de Aquiles de las ovejas durante el periodo postoperatorio, y también detallaremos el proceso de evaluación de la imagen ecográfica.

6.1. Ecografía del tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio

Los tendones de Aquiles de las ovejas fueron evaluados ecográficamente cada semana durante el periodo postoperatorio, comenzando la primera evaluación justo a los 7 días de la cirugía. Los exámenes ecográficos se llevaron a cabo con los animales sedados y correctamente inmovilizados. La sedación se consiguió tras la inyección intravenosa de 0.02 mg/kg de xilacina (Xilagesic 2%® 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España). Una vez sedados, los animales se colocaron en decúbito lateral izquierdo sobre un colchón, con la extremidad operada hacia arriba, paralela al suelo e inmovilizada a nivel de la pezuña con una correa de velcro que se fijaba a la silla del ecografista (Fig. 71). La zona del tendón de Aquiles fue rasurada y se limpió con agua templada antes de cada examen ecográfico. Sobre la piel que aplicó una cantidad abundante del gel de ultrasonidos (Aquasonic® 100 Ultrasound Transmission Gel, Parker Laboratories Inc., Fairfield, NJ, EEUU), y además se empleó un pack de gel para permitir un mejor contacto entre el transductor del ecógrafo y los relieves anatómicos existentes en la zona a explorar (Fig. 72).



Fig. 71. Puesto de trabajo en el que se realizaron las ecografías durante el periodo postoperatorio. Los animales eran sedados, y se tumbaban en decúbito lateral con la extremidad operada hacia arriba, paralela al suelo y fijada a nivel de la pezuña.



Fig. 72. Para mejorar el contacto entre el transductor del ecógrafo y los relieves anatómicos de la zona del tendón de Aquiles se empleó un pack de tendones. Este pack de tendones se fabricó relleno de gel de ultrasonidos un protector de sonda, con cuidado de que no quedasen burbujas de aire.

Los exámenes ecográficos se realizaron usando un equipo de ecografía portátil (Aloka® Prosound C3; Aloka, Tokio, Japón) con un transductor lineal multifrecuencia (7 – 12 MHz) (Aloka® UST-TL07; Aloka, Tokio, Japón) (Fig. 73). Este transductor ecográfico es de uso intraquirúrgico, y se eligió porque por sus dimensiones se adaptaba perfectamente al examen del tendón de Aquiles de la oveja (Fig. 74).



Fig. 73. El equipo de ecografía portátil permitió realizar los exámenes ecográficos en las mismas instalaciones donde se alojaban los animales.



Fig. 74. El pequeño tamaño del transductor lineal del ecógrafo (3 cm de longitud) facilitó el examen del tendón de Aquiles de la oveja.

El examen ecográfico es una prueba altamente técnico-dependiente, de modo que resulta imprescindible estandarizar y definir con precisión la metodología de evaluación ecográfica, así como realizar la exploración del tendón de una manera sistemática y reglada (Balius et al., 2007). Todos los exámenes ecográficos fueron realizados por el mismo investigador, siguiendo siempre la misma rutina de exploración. En primer lugar se localizó el área de tendón de Aquiles reparada, que se localizó fácilmente gracias a la presencia del material de sutura, que se observaban como estructuras hiperecoicas. Como se detallará en el siguiente apartado, se realizó una valoración del proceso de cicatrización durante el examen ecográfico mediante una escala de valoración semicuantitativa. Además de esta valoración en directo, se tomaron cinco imágenes ecográficas transversales y otras cinco imágenes longitudinales a lo largo del área de cicatrización del tendón de Aquiles para su posterior análisis con ayuda de un programa informático. Todas las imágenes ecográficas se tomaron con el haz de ultrasonidos en posición ortogonal a las fibras tendinosas, para así minimizar los artefactos en la imagen ecográfica causados por la anisotropía del tendón (Balius et al., 2007). Las imágenes longitudinales se tomaron justo en la línea media dorsal del tendón de Aquiles, y los cortes transversales se tomaron al mismo nivel que los cortes longitudinales (Fig.75).

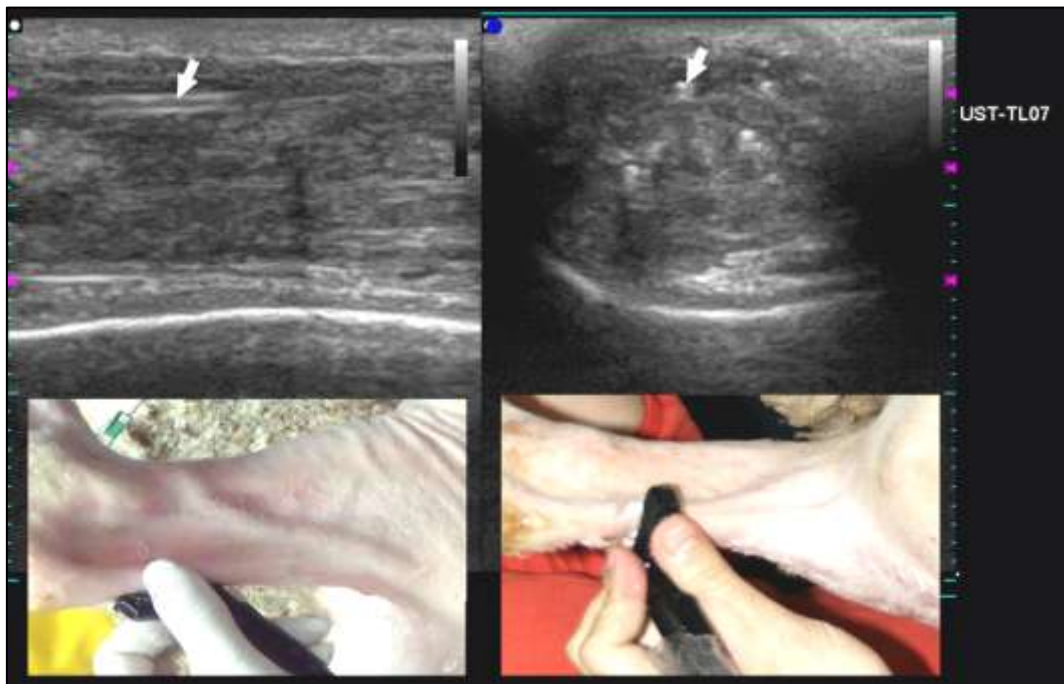


Fig. 75. Durante el examen ecográfico del tendón de Aquiles se tomaron varias imágenes tanto longitudinales (izquierda) como transversales (derecha), para su posterior análisis con ordenador. Las suturas se observaban en la imagen ecográfica como estructuras hiperecoicas (flechas blancas).

El examen ecográfico del tendón de Aquiles siempre se llevó a cabo con una frecuencia de 12 MHz. La configuración del equipo de ecografía con respecto al brillo y al contraste, así como la ganancia y la profundidad del foco se fijaron y se mantuvieron constantes en todos los estudios ecográficos durante el periodo de estudio. De esta manera se conseguía que los cambios de ecogenicidad que se observaban en las imágenes ecográficas de los diferentes tendones y a lo largo del estudio fuesen debidos únicamente a cambios en la respuesta del tejido cicatricial a los ultrasonidos, y no se viesen artefactuados por modificaciones en la configuración del equipo ecográfico. Tras la realización del estudio ecográfico, se procedió a la inyección ecoguiada del tratamiento con PRGF o a la administración de solución salina.

6.2. Valoración ecográfica del tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio

El proceso de cicatrización del tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio se llevó a cabo mediante la realización semanal de exámenes ecográficos. Para la valoración de estos exámenes ecográficos se empleó una escala de valoración semicuantitativa, y también se empleó un análisis ecográfico asistido por ordenador.

6.2.1. Evaluación ecográfica mediante escala de valoración semicuantitativa

La escala de valoración semicuantitativa empleada en esta Tesis Doctoral para la evaluación de la cicatrización del tendón fue una modificación de la escala propuesta por Reef en 2001 para la valoración de la cicatrización tendinosa en lesiones del tendón flexor digital superficial de caballos (Reef, 2001). Esta escala de valoración consideró cuatro parámetros ecográficos importantes en la cicatrización del tendón: ecogenicidad del tendón, alineación de las fibras tendinosas (arquitectura del tendón), porcentaje de lesión en el área transversal (área transversal lesionada / área transversal total), y grosor del tendón lesionado en comparación con el tendón sano. El valor final se obtenía tras sumar las valoraciones de los cuatro subapartados, pudiendo adquirir un valor mínimo

de 0 (tendón con un alto grado de lesión desde el punto de vista ecográfico) y un máximo de 10 (tendón ecográficamente normal) (Tabla 8).

Tabla 8. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación ecográfica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles (Modificado de Reef, 2001)

Ecogenicidad del tendón	(0-3)
Principalmente anecoico	0
50% anecoico / 50% ecogénico	1
Principalmente ecogénico	2
Ecogenicidad normal	3
Alineación de las fibras tendinosas (Arquitectura del tendón)	(0-3)
No existe apenas alineación de las fibras tendinosas	0
Entre 25 – 50 % fibras tendinosas muestran alineación	1
Entre 50 – 75 % fibras tendinosas muestran alineación	2
La mayoría de las fibras tendinosas están paralelas y alineadas	3
% lesión área transversal (área lesionada / área transversal total)	(0-2)
> 50 %	0
Entre un 10 – 50 %	1
< 10%	2
Grosor del tendón lesionado	(0-2)
Más de 2 veces el grosor del tendón normal	0
Entre 1.5 y 2 veces el grosor del tendón normal	1
Menos 1.5 veces el grosor del tendón normal	2

6.2.2. Valoración ecográfica asistida por ordenador

Como ya se ha comentado en la correspondiente sección de la revisión bibliográfica, el examen ecográfico es una técnica de evaluación del proceso de cicatrización ampliamente utilizada debido a que es un método no invasivo, rápido, económico, y permite una evaluación instantánea y dinámica del tendón (Robinson, 2009). Pero, desafortunadamente, se trata de una técnica muy dependiente del operador que esté realizando la ecografía, ya que para una correcta evaluación es necesario contar con un especialista experimentado tanto con la técnica ecográfica como con la interpretación de la imagen resultante (Robinson, 2009). En los últimos años, diversos

autores han publicado trabajos en los que se propone una evaluación de la imagen ecográfica basada exclusivamente en la información que proporcionan las imágenes obtenidas, realizando para ello un tratamiento informático de dichas imágenes y obteniendo así un resultado más objetivo (Martinoli et al., 1993; van Schie et al., 2010; Bosch et al., 2011). En esta Tesis Doctoral, además de la valoración del examen ecográfico mediante una escala de valoración semicuantitativa, se realizó una valoración de las imágenes ecográficas con ayuda del análisis informático.

1. Análisis computerizado de la imágenes ecográficas

El ecógrafo proporciona una imagen transformada en escala de grises. Cada uno de los miles de píxeles que componen la imagen ecográfica puede tomar un valor situado entre 0 (que corresponde con el negro) y 255 (que corresponde con el blanco). Entre estos dos valores se sitúa toda la gama de grises que compone la imagen ecográfica que nos proporciona el equipo. En una imagen ecográfica de un tendón patológico, el ojo humano puede definir determinadas áreas que presentan un patrón ecográfico común, con una ecogenicidad determinada, y que se corresponden con un determinado rango de grises. Estos diferentes patrones de ecogenicidad que podemos encontrar en el proceso de cicatrización del tendón se relacionan con una descripción ecográfica determinada, que puede ir desde la ecogenicidad normal del tendón sano hasta la imagen anecoica del fluido inflamatorio o sangre. En este punto es importante resaltar la importancia de realizar una buena técnica ecográfica, que minimice en la medida de lo posible los artefactos ecográficos que podrían simular una alteración en la ecogenicidad del tejido cuando realmente no existe.

Mediante un estudio piloto previo se tipificó el rango de grises entre los cuales se encontraba un determinado patrón ecogénico de los que cabría encontrar durante el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles. Para ello se contó con la colaboración de tres especialistas en ecografía del sistema musculoesquelético, con amplia experiencia en el diagnóstico y seguimiento de lesiones tendinosas mediante ecografía. A cada uno de estos especialistas se les pidió que contorneasen sobre unas imágenes ecográficas transversales de tendones de Aquiles ovinos en diferentes estadios del proceso de cicatrización, cuatro patrones ecogénicos diferentes de acuerdo con la siguiente descripción:

- *Ecogenicidad I*: Áreas de ecogenicidad moderada con punteado hiperecoico (ecogenicidad normal del tendón).
- *Ecogenicidad II*: Áreas con ecogenicidad de moderada a hiperecoica.
- *Ecogenicidad III*: Áreas de hipoecoicas a anecoicas, con una pobre demarcación.
- *Ecogenicidad IV*: Áreas anecoicas (fluido inflamatorio, sangre).

A continuación, estas imágenes ecográficas contorneadas por los especialistas fueron digitalizadas y se transfirieron a un ordenador equipado con el programa de análisis de imagen Image Pro Plus® versión 6.0. Mediante este programa se calculó el rango de grises que mejor definía cada uno de los patrones ecográficos contorneados por los especialistas. Para ello se eligieron áreas en las que los tres especialistas habían coincidido plenamente con el tipo de ecogenicidad que habían definido (Tabla 9).

Tabla 9. Correspondencia entre el tipo de ecogenicidad determinado por los especialistas y el rango de grises que mejor lo define.

Ecogenicidad	Rango de grises
Ecogenicidad tipo I	255 – 80
Ecogenicidad tipo II	79 – 52
Ecogenicidad tipo III	51 – 25
Ecogenicidad tipo VI	24 – 0

Una vez definido el rango de grises de cada una de las diferentes ecogenicidades consideradas, y con ayuda del programa informático Image Pro Plus® versión 6.0, se llevó a cabo un estudio de cada uno de los cinco cortes transversales de un mismo tendón de Aquiles. Previamente fue necesario contornear el área de corte transversal del tendón en cada una de las imágenes ecográficas con ayuda de una tableta gráfica (Tableta gráfica Slimline Design TB-5300, Trust Spain® S.A., Madrid, España) (Fig. 76). A continuación el programa informático mapeó el área de corte transversal de la imagen ecográfica, de modo que cada uno de los píxeles dentro de esta área fue catalogado según su tono de gris como perteneciente a uno de los cuatro tipos de ecogenicidad previamente definidos. A cada una de las diferentes ecogenicidades se le asignó un color diferente: Ecogenicidad tipo I – Celeste, Ecogenicidad tipo II – Azul Aciano, Ecogenicidad tipo III – Azul Marino y Ecogenicidad tipo VI – Negro. El programa de análisis nos proporcionó el porcentaje de cada una de las diferentes

ecogenicidades que componían el área de corte transversal de la imagen ecográfica (Fig. 77). Los porcentajes de cada una de las ecogenicidades existentes en la zona de cicatrización de un tendón determinado fueron calculados como promedio a partir de 5 imágenes ecográficas en corte transversal, realizadas durante el mismo examen ecográfico.

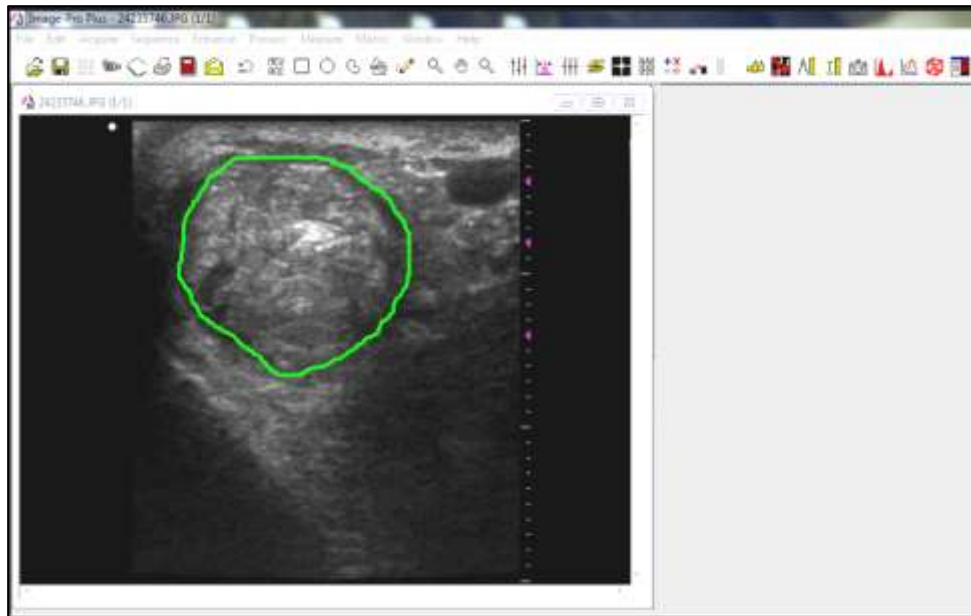


Fig. 76. El área de corte transversal del tendón de Aquiles fue contorneada para su posterior análisis y medición.

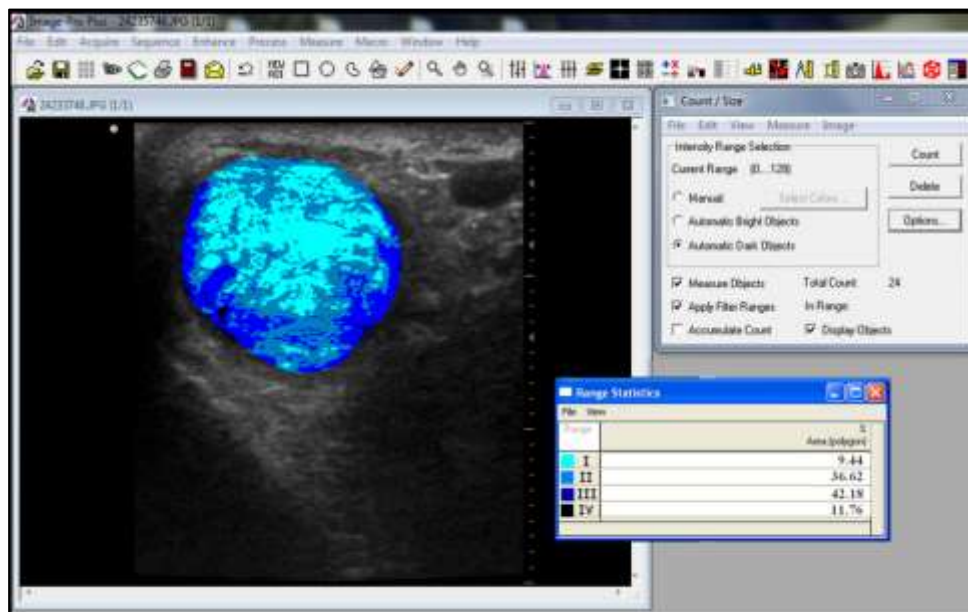


Fig. 77. El programa Image Pro Plus® mapeó el corte transversal del tendón de modo que los diferentes píxeles que formaban la imagen fueron clasificados según su tono de gris, y se agruparon en una de las categorías de ecogenicidad previamente definidas por los especialistas. El programa calculó el porcentaje del área ocupado por cada una de los tipos de ecogenicidades.

2. Determinación del valor medio de grises, diámetro, y área de corte transversal de la imagen ecográfica

Además de calcular el porcentaje de cada uno de los diferentes tipos de ecogenicidades que componían el corte transversal de la imagen ecográfica del tendón, también se llevó a cabo un análisis de la escala de grises que componían la imagen, y una medición del diámetro y área de corte transversal del tendón. Para ello se empleó de nuevo el programa informático de análisis de imagen Image Pro Plus[®] versión 6.0. Previamente, se realizó una calibración para que las mediciones sobre la imagen ecográfica se correspondiesen con el tamaño real en el tendón. En la imagen ecográfica del corte transversal del tendón se contorneó el área del tendón. A continuación, el programa informático nos proporcionaba los siguientes datos del área seleccionada en la imagen ecográfica: valor medio en la escala de grises (valor comprendido entre 0 – 255), diámetro del tendón (mm), y área de corte transversal del tendón (mm²). El valor de cada uno de estos parámetros para un tendón determinado fue calculado como el promedio a partir de 5 imágenes ecográficas en corte transversal, realizadas durante el mismo examen ecográfico.

7. Análisis estadístico de los datos obtenidos

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un paquete de software estadístico (SPSS[®] para Windows versión 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Los valores se presentaron como media \pm desviación típica (SD). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores de p eran menores o iguales 0.05.

7.1. Análisis de los datos de los exámenes físicos semanales

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para los datos del examen físico semanal, peso de los animales (antes de la cirugía y tras la eutanasia), así como para la presencia de complicaciones relacionadas con la herida quirúrgica o el T-TAESF. La evolución del grado de cojera, del perímetro del muslo y del grosor del tendón de Aquiles a lo largo del periodo de estudio fue comparado mediante un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con PRGF y los tratados con solución salina.

7.2. Análisis de los datos del estudio anatomopatológico

Los datos procedentes del estudio anatomopatológico de cada uno de los grupos de estudio fueron sometidos a una análisis estadístico descriptivo. En nuestro estudio existían dos tipos de variables:

- Variables continuas: datos relativos a la morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, densidad de vasos sanguíneos, grosor vasos sanguíneos.
- Variables categóricas: evaluación macroscópica del área de cicatrización del tendón, organización de las fibras de colágeno (compactación y orientación de las fibras de colágeno), evaluación de la infiltración inflamatoria, evaluación IHQ del colágeno tipo I y tipo III.

Las variables continuas fueron analizadas mediante el test no paramétrico Kruskas-Wallis, y el test U de Mann-Whitney fue usado para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con PRGF o los animales tratados con salino. Las variables categóricas fueron analizadas usando el test Chi-cuadrado, para determinar si la infiltración con PRGF o con salino produjo diferencias significativas en el proceso de cicatrización del tendón.

7.3. Análisis de los datos del examen ecográfico

Los datos ecográficos semanales obtenidos a lo largo del periodo de estudio fueron sometidos a un análisis estadístico descriptivo. La evaluación ecográfica mediante escala de valoración semicuantitativa, así como los datos obtenidos a través del análisis de la imagen ecográfica con ayuda del ordenador, fueron comparados a lo largo del periodo de estudio mediante un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre los animales tratados con PRGF y los tratados con salino.

8. Fuentes de financiación

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por la Fundación García-Cugat para la Investigación Biomédica, y por el Ministerio de Salud del Gobierno de España. El doctorando, D. José Andrés Fernández Sarmiento, ha disfrutado de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU), durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral. Esta beca FPU fue concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España, y tiene número de referencia AP2006-00150.

Ni el doctorando, ni los directores de esta Tesis Doctoral tienen ningún interés financiero ni otro tipo de relación comercial con ninguna de las compañías relacionadas con este estudio experimental.

Resultados

A continuación, vamos a exponer los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los datos derivados de este estudio experimental. Los resultados se han organizado en cuatro apartados diferentes:

1. Modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina
2. Exámenes físicos durante el periodo postoperatorio.
3. Seguimiento ecográfico semanal.
4. Estudio anatomopatológico del tendón de Aquiles:
 - Evaluación macroscópica.
 - Exámenes microscópicos mediante técnicas histoquímicas.
 - Exámenes microscópicos mediante técnicas inmunohistoquímicas.

1. Modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina

En este estudio experimental se emplearon 20 ovejas adultas cruce de raza Merina, y estos mismos 20 animales llegaron al final del estudio sin que se registrase la pérdida de ninguno durante el periodo postoperatorio.

El peso de los animales al comienzo del estudio fue 54.15 ± 6.91 kg. El peso de los animales al final del estudio fue 52.35 ± 5.88 kg. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales de los diferentes grupos ni al comienzo del estudio ni al final del mismo. La pérdida de peso observada no resultó ser estadísticamente significativa en ninguno de los grupos de estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Tabla comparativa de los pesos de los animales al principio y al final del estudio (kg).

	Grupo SALINO – 4 semanas	Grupo PRGF – 4 semanas	<i>p</i>
Inicio del estudio	53.60 ± 11.76	55.20 ± 2.77	0.78
Final del estudio	51.60 ± 9.96	52.60 ± 3.58	0.84
<i>p</i>	0.41	0.14	
	Grupo SALINO – 8 semanas	Grupo PRGF – 8 semanas	<i>p</i>
Inicio del estudio	52.60 ± 7.63	55.20 ± 4.09	0.52
Final del estudio	51.40 ± 5.32	53.80 ± 4.38	0.46
<i>p</i>	0.37	0.06	
	Animales eutanasiados a las 4 semanas	Animales eutanasiados a las 8 semanas	<i>p</i>
Inicio del estudio	54.40 ± 8.10	53.90 ± 5.93	0.88
Final del estudio	52.10 ± 7.08	52.60 ± 4.76	0.76
<i>p</i>	0.09	0.06	
	Animales tratados con SALINO	Animales tratados con PRGF	<i>p</i>
Inicio del estudio	53.10 ± 9.36	55.20 ± 3.29	0.52
Final del estudio	51.50 ± 7.53	53.20 ± 3.82	0.68
<i>p</i>	0.21	0.06	

El procedimiento quirúrgico para la creación del modelo experimental no planteó ninguna dificultad técnica destacable, y los cirujanos se familiarizaron pronto con el abordaje quirúrgico al tendón de Aquiles de la oveja, así como a la colocación del sistema de fijación externa. Siguiendo la metodología propuesta en este trabajo se consiguió un daño tendinoso reproducible, estandarizado, homogéneo y uniforme entre

los diferentes animales. La duración de la cirugía fue de 55 ± 13 minutos, si bien en las primeras diez intervenciones el tiempo medio fue de 62 ± 15 minutos, y en las últimas diez el tiempo empleado disminuyó a 48 ± 4 minutos. Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0.02$).

El sistema de fijación externa (T-TAESF) permaneció íntegro durante todo el periodo postoperatorio, y permitió que el tendón de Aquiles no experimentase macromovimientos cuando el animal apoyaba peso en la extremidad operada. Estos macromovimientos podrían llevar a la separación de los bordes tendinosos recién suturados, o incluso a la rotura del material de sutura empleado para la reparación de la tenotomía. El T-TAESF fue tolerado bien por los animales y no manifestaron ni cambios destacables en su conducta ni signos visibles de incomodidad o malestar (Fig. 78).

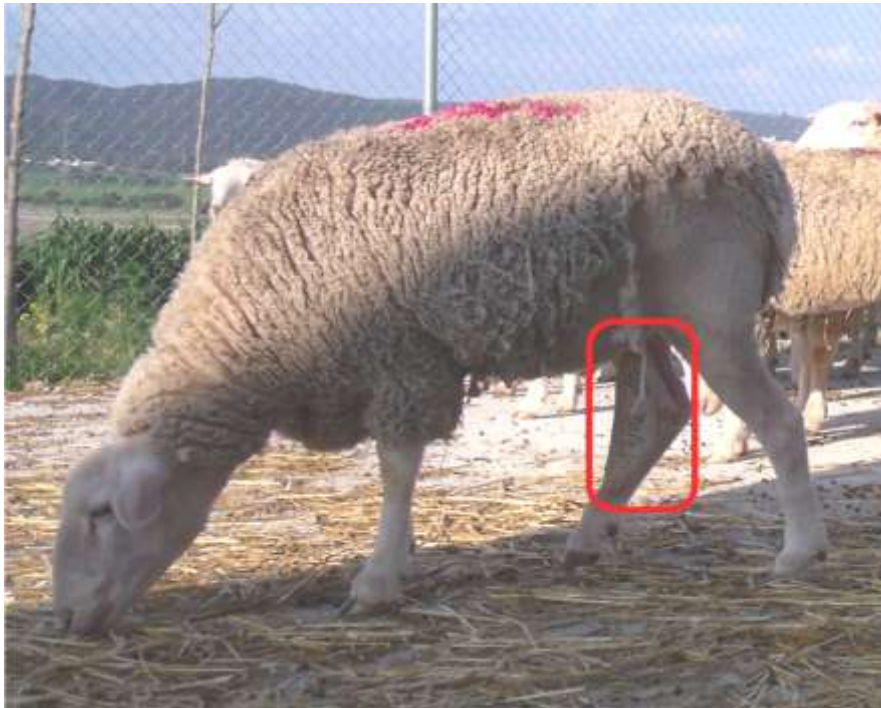


Fig. 78. La colocación del T-TAESF no supuso para los animales una incomodidad detectable, y estos desarrollaron su vida normal sin ninguna alteración evidente de su conducta.

2. Exámenes físicos durante el periodo postoperatorio

2.1. Exámenes físicos semanales

Los exámenes físicos semanales que se llevaron a cabo en los animales revelaron un buen estado de salud general. No se detectaron ni episodios de fiebre, ni anorexia, ni apatía, ni ningún otro signo clínico que pudiese manifestar la existencia de un proceso de enfermedad sistémica. Las constantes vitales de los animales (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, estado de carnes, tiempo de relleno capilar, estado de hidratación, auscultación torácica y abdominal) se mantuvieron dentro de los valores normales para esta especie en todos los animales durante todo el periodo de estudio.

No se detectó ninguna complicación postquirúrgica mayor asociada a la creación del modelo experimental durante el periodo de estudio. El proceso de cicatrización de la herida quirúrgica se produjo de manera adecuada, y a los diez días se retiraron los puntos de sutura en todos los animales sin que se registrasen incidencias asociadas a la cicatrización de la piel. En cinco animales (25%) se observó una ligera secreción serosanguinolenta asociada al orificio por el cual penetraba alguna de las agujas del T-TAESF. Esto fue considerado una complicación menor que se resolvió en todos los casos con la limpieza de la herida con clorhexidina (Desinclor[®] Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España) durante varios días y la administración de una dosis de antibiótico de amplio espectro y acción prolongada (bencilpenicilina 15000 IU/kg IM junto con dihidroestreptomicina 15 mg/kg IM) (Shotapen[®] LA; Virbac Salud Animal, Barcelona, España) (Fig. 79).

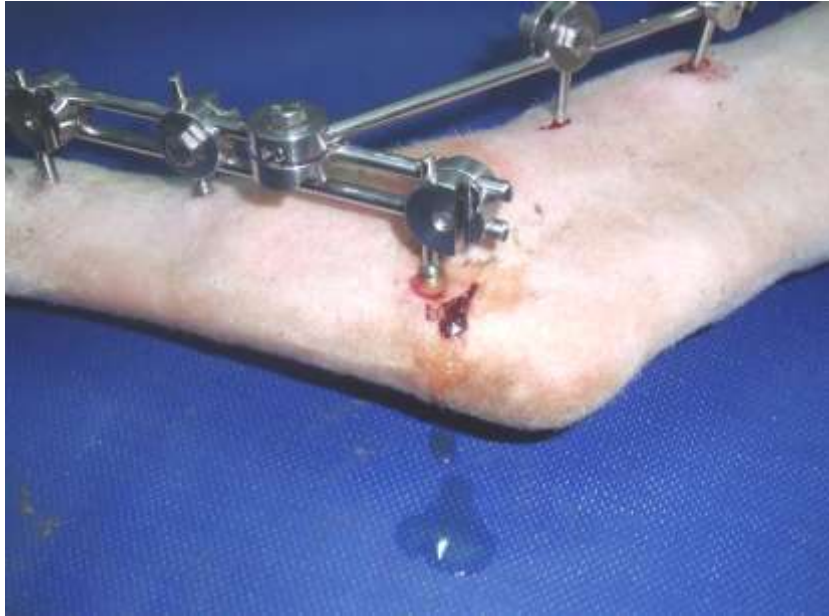


Fig. 79. En 5 de los 20 animales se detectó una secreción serosanguinolenta asociada al orificio de entrada de alguna de las agujas del fijador externo. Esta complicación se solucionó en todos los animales con la aplicación de curas locales y antibioterapia sistémica.

2.2. Exámenes ortopédicos semanales

Durante los exámenes ortopédicos semanales se evaluó el grado de cojera de los animales, el diámetro del muslo y el grosor del tendón de Aquiles operado. El grado de cojera fue evaluado usando una escala de valoración semicuantitativa con valores que iban desde 5 (sin cojera evidente) a 0 (máximo grado de cojera). Tras la cirugía, todos los animales manifestaron una cojera evidente, sin que se observasen diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con PRGF y aquellos infiltrados con solución salina en ninguno de los exámenes postoperatorios semanales (Tabla 11) (Gráfico 1). Tanto en el grupo de animales tratados con solución salina como en aquellos tratados con PRGF se observó un grado de cojera evidente en la primera semana tras la cirugía. En ambos grupos de estudio se observó una mejoría significativa en el grado de cojera a la 3ª y 4ª semana en comparación con la cojera existente a la primera semana tras la cirugía, pero el grado de cojera volvió a empeorar en las semanas subsiguientes, alcanzándose el peor grado de cojera al final del estudio (8ª semana) en ambos grupos experimentales (Gráficos 2 y 3).

Tabla 11. Tabla comparativa del grado de cojera (AAEP lameness scale) a lo largo del periodo de estudio.

	SALINO	PRGF	p
Basal	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	1.00
1ª semana	0.60 ± 0.52	0.60 ± 0.52	1.00
2ª semana	1.00 ± 0.47	1.10 ± 0.57	0.67
3ª semana	2.40 ± 1.07	1.80 ± 0.79	0.17
4ª semana	2.20 ± 0.92	1.60 ± 0.70	0.12
5ª semana	1.00 ± 1.00	2.00 ± 0.71	0.10
6ª semana	1.60 ± 0.89	0.80 ± 0.84	0.18
7ª semana	0.80 ± 0.84	0.80 ± 0.84	1.00
8ª semana	0.40 ± 0.55	0.20 ± 0.45	0.54

Gráfico 1. Evolución del grado de cojera a lo largo del periodo de estudio.

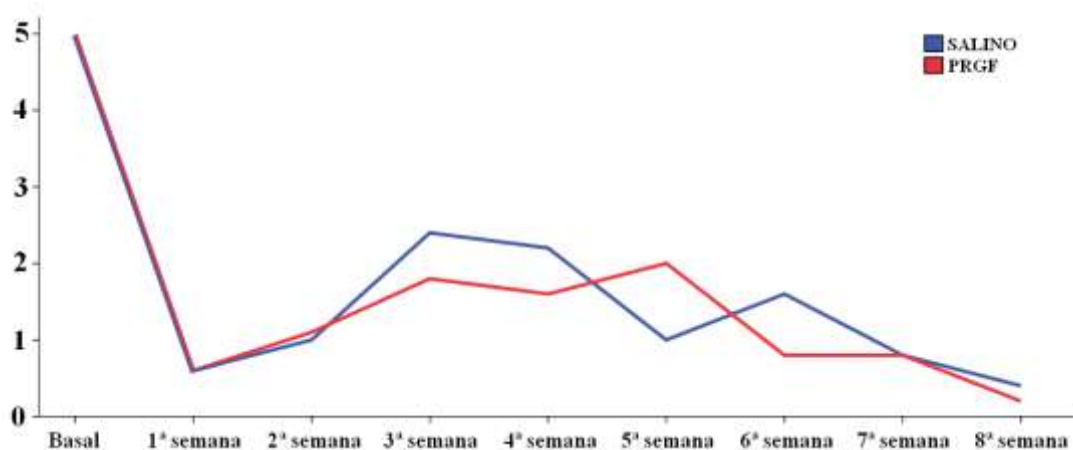


Gráfico 2. Evolución del grado de cojera a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

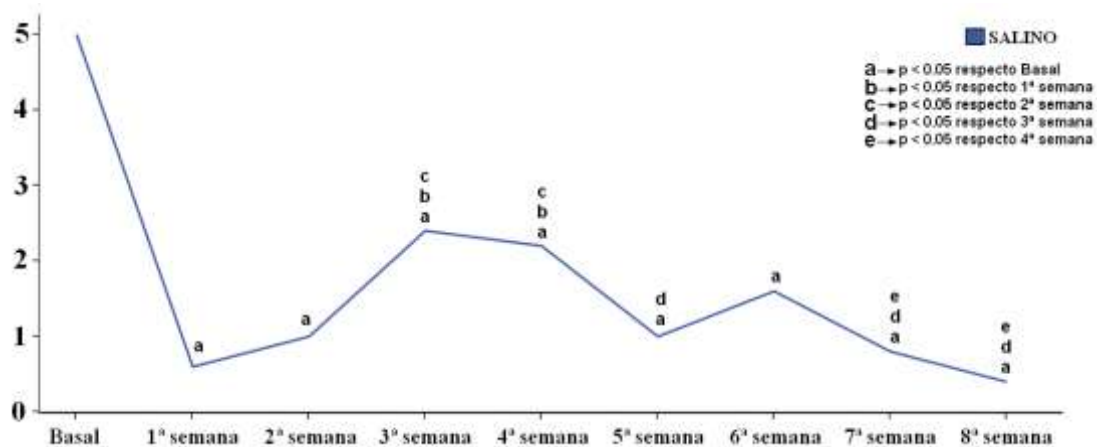
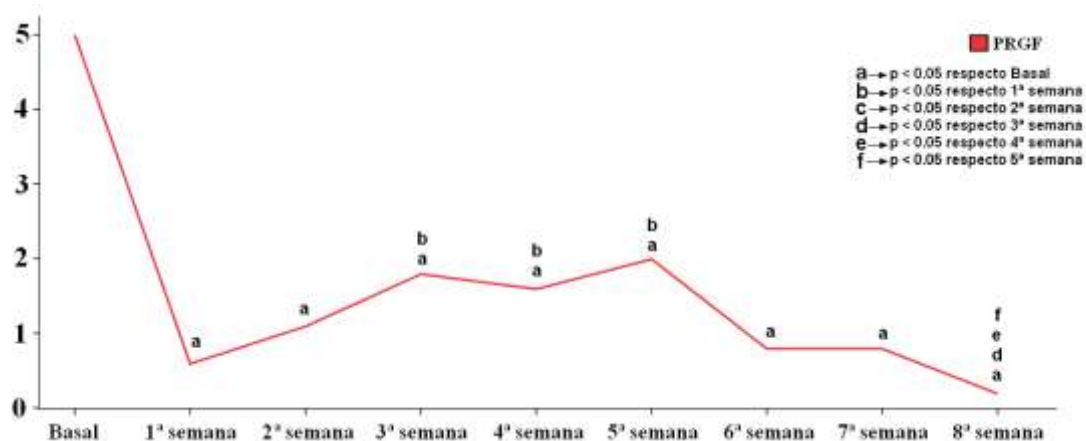


Gráfico 3. Evolución del grado de cojera a lo largo del periodo de estudio en el **grupo PRGF**.

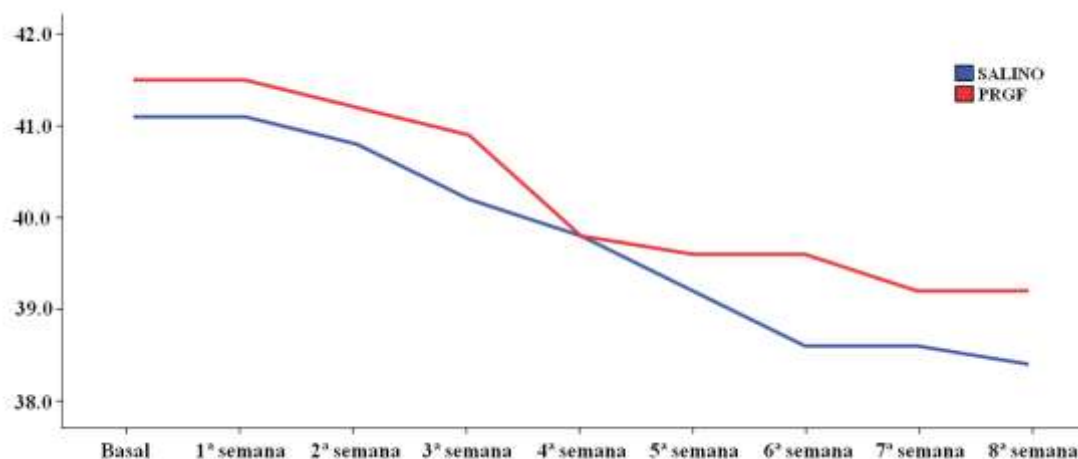


El perímetro del muslo de los animales al comienzo del estudio fue 41.3 ± 2.0 cm, y en el momento de la eutanasia disminuyó a 39.3 ± 2.0 cm. Esta disminución en el perímetro del muslo resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$), y fue consecuencia de la atrofia de la musculatura del muslo que se produjo tras el empleo del T-TAESF para la inmovilización postoperatoria del tendón de Aquiles. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la disminución del perímetro del muslo entre los animales del grupo salino y del grupo PRGF (Tabla 12) (Gráfico 4).

Tabla 12. Tabla comparativa del perímetro del muslo (cm) a lo largo del periodo de estudio.

	SALINO	PRGF	P
Basal	41.10 ± 2.28	41.50 ± 1.90	0.67
1ª semana	41.10 ± 2.28	41.50 ± 1.90	0.67
2ª semana	40.80 ± 2.15	41.20 ± 1.75	0.65
3ª semana	40.20 ± 2.04	40.90 ± 1.59	0.40
4ª semana	39.80 ± 2.04	39.80 ± 2.04	1.00
5ª semana	39.20 ± 1.79	39.60 ± 0.89	0.67
6ª semana	38.60 ± 2.07	39.60 ± 0.89	0.35
7ª semana	38.60 ± 2.07	39.20 ± 1.30	0.60
8ª semana	38.40 ± 1.95	39.20 ± 1.30	0.47
<i>p</i>	0.08	0.21	

Gráfico 4. Evolución del perímetro de la pierna (cm) a lo largo del periodo de estudio.



Otro de los parámetros evaluados durante los exámenes físicos semanales fue el grosor del tendón de Aquiles, medido mediante un calibrador. En todos los animales se observó un incremento significativo del grosor del tendón operado tras la cirugía. En la primera semana tras la cirugía, el grosor del tendón de Aquiles fue significativamente mayor en los animales del grupo PRGF en comparación con el grupo salino ($p = 0.02$). En el resto de los exámenes semanales no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio (Tabla 13) (Gráfico 5). A partir de la primera semana, ambos grupos experimentales manifestaron una evolución similar con respecto al grosor del tendón de Aquiles operado. Se alcanzó el pico máximo a las tres semanas de la cirugía, y posteriormente el grosor del tendón fue disminuyendo de manera progresiva. El grosor del tendón de Aquiles en el último examen (8ª semana) fue significativamente mayor que el grosor del tendón basal en ambos grupos de estudio (Gráfico 6 y 7).

Tabla 13. Tabla comparativa del grosor del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio, medido con el calibrador durante los exámenes físicos semanales. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	SALINO	PRGF	P
Basal	9.60 ± 0.70	9.30 ± 0.82	0.39
1ª semana	17.00 ± 1.56	18.70 ± 1.34	0.02
2ª semana	18.50 ± 2.72	18.90 ± 2.23	0.72
3ª semana	22.10 ± 2.56	22.50 ± 3.53	0.77
4ª semana	21.70 ± 2.83	22.00 ± 4.32	0.86
5ª semana	20.00 ± 3.08	19.80 ± 3.19	0.92
6ª semana	16.60 ± 1.14	18.40 ± 3.78	0.36
7ª semana	16.80 ± 0.84	18.00 ± 3.74	0.52
8ª semana	16.00 ± 1.87	17.00 ± 2.34	0.48

Gráfico 5. Evolución del grosor del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

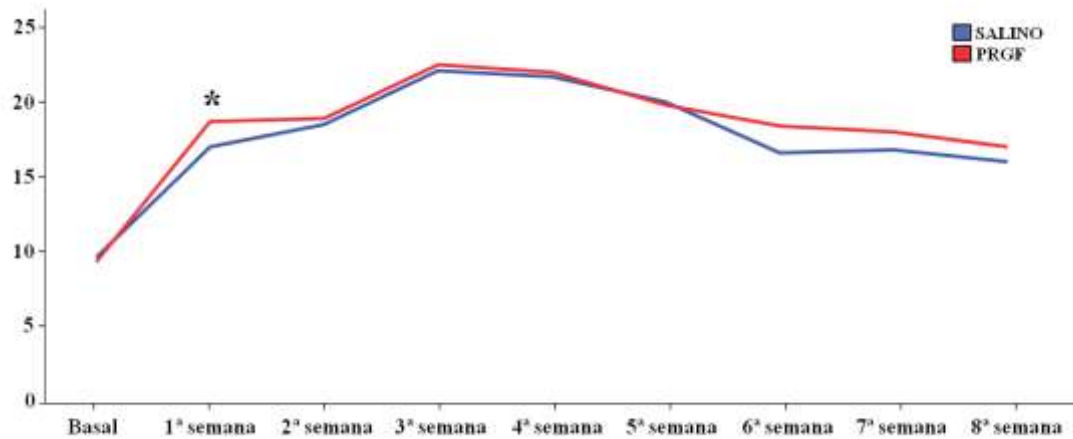


Gráfico 6. Evolución del grosor del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

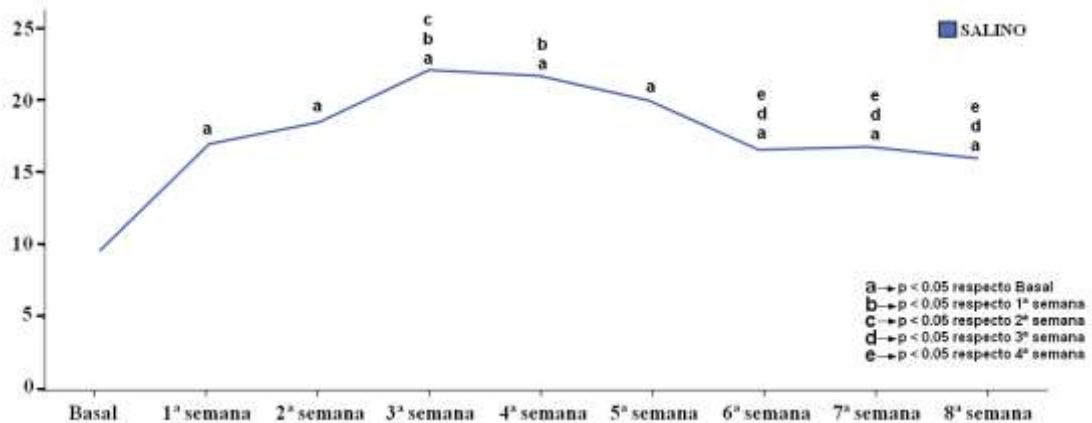
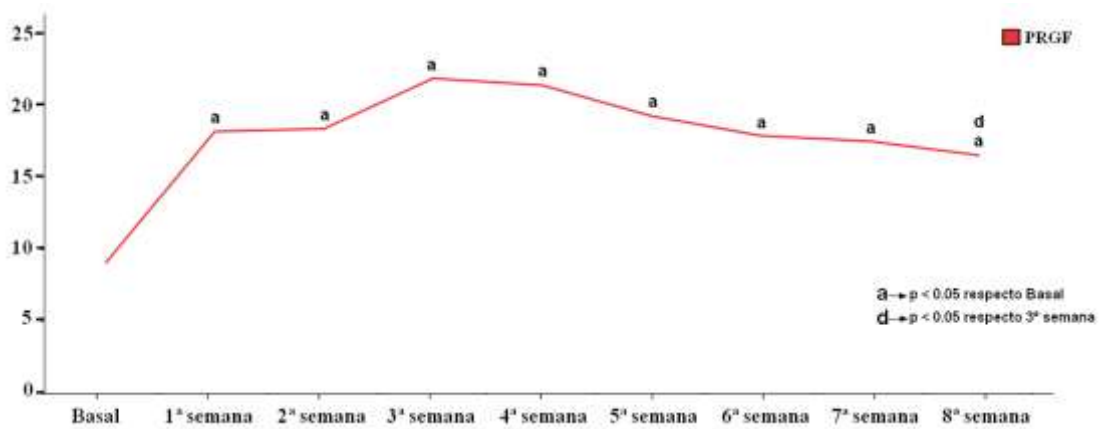


Gráfico 7. Evolución del grosor del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio en el **grupo PRGF**.



3. Seguimiento ecográfico semanal

3.1. Valoración ecográfica mediante escala de valoración semicuantitativa

Durante los exámenes ecográficos semanales de los tendones de Aquiles se llevó a cabo una evaluación mediante una escala de valoración semicuantitativa que consideraba varios aspectos del proceso de cicatrización que podían ser determinados al mismo tiempo que se realizaba el examen ecográfico. Los parámetros que recogía esta escala de valoración ecográfica fueron: ecogenicidad del tendón, alineación de las fibras tendinosas (arquitectura del tendón), porcentaje de lesión en el área transversal (área transversal lesionada / área transversal total), y grosor del tendón lesionado en comparación con el tendón sano.

A continuación se presentan una serie de imágenes ecográficas representativas de cada examen semanal, tanto de un tendón de Aquiles infiltrado con solución salina (Figs. 80 – 88), como de un tendón tratado con PRGF (Figs. 89 – 97).

En primer lugar se muestran las imágenes del **grupo Salino**:

Fig. 80. Examen ecográfico basal de un tendón del grupo salino.

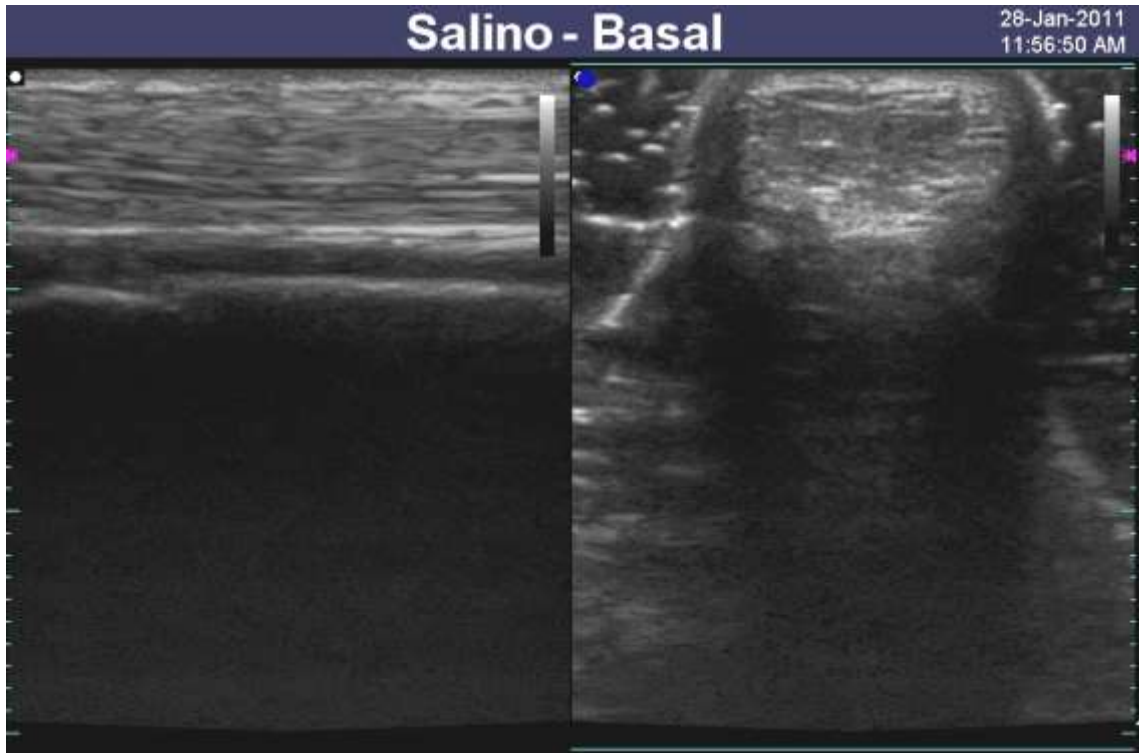


Fig. 81. Examen ecográfico en la 1ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.

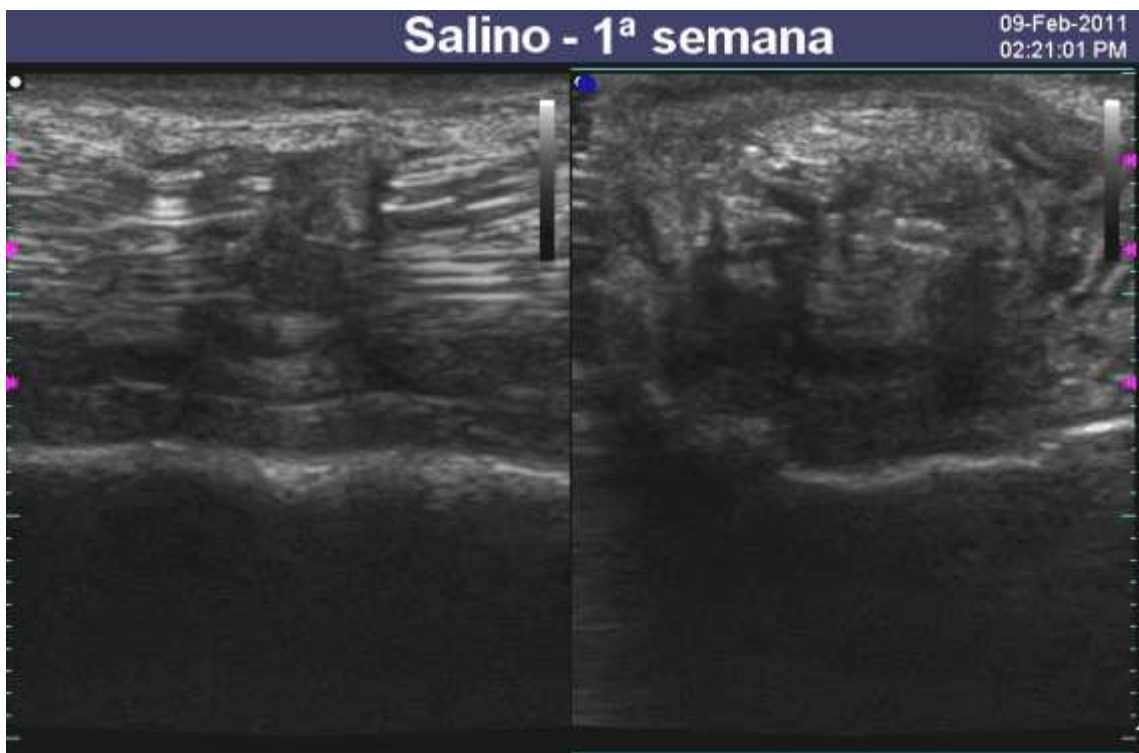


Fig. 82. Examen ecográfico en la 2ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.

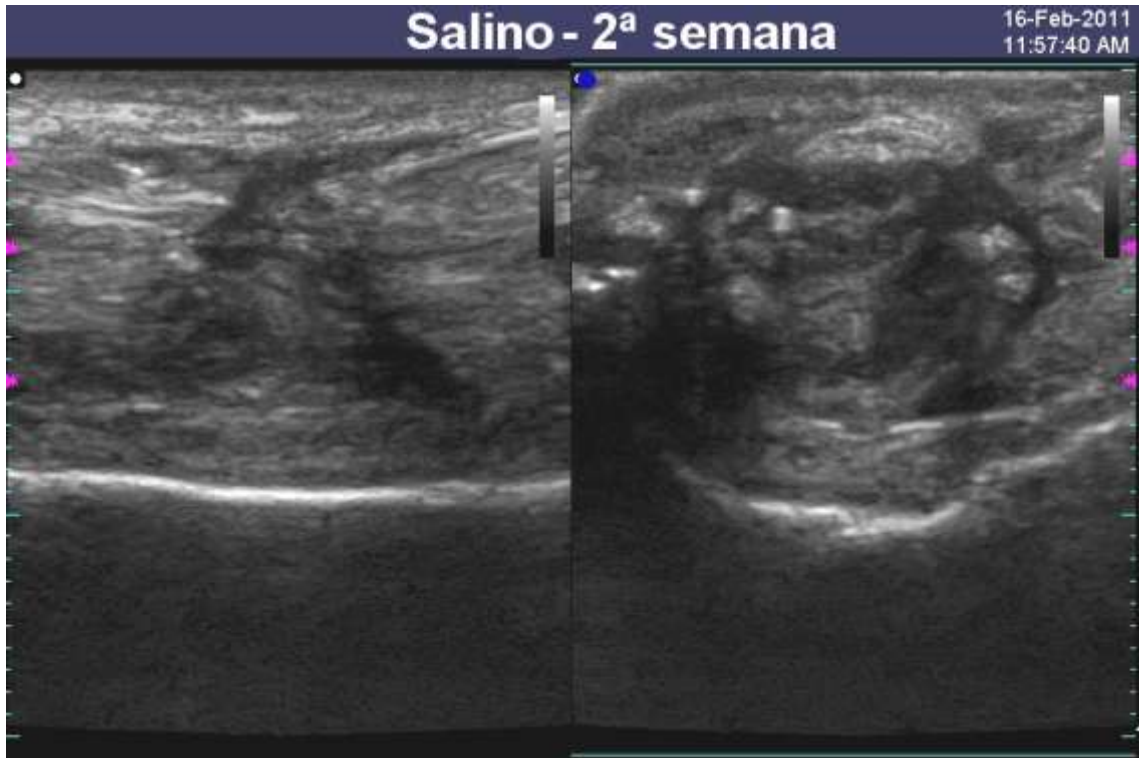


Fig. 83. Examen ecográfico en la 3ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.



Fig. 84. Examen ecográfico en la 4ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.

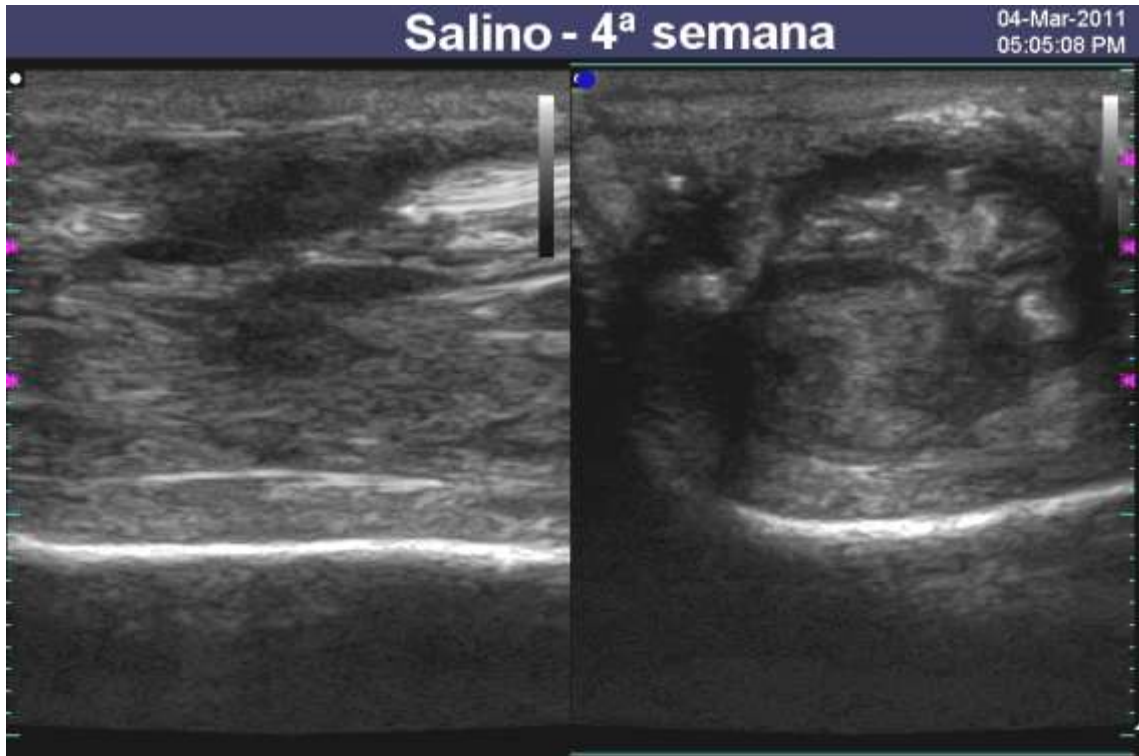


Fig. 85. Examen ecográfico en la 5ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.



Fig. 86. Examen ecográfico en la 6ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.



Fig. 87. Examen ecográfico en la 7ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.



Fig. 88. Examen ecográfico en la 8ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con solución salina.



A continuación se muestran las imágenes del **grupo PRGF**:

Fig. 89. Examen ecográfico basal de un tendón del grupo PRGF.

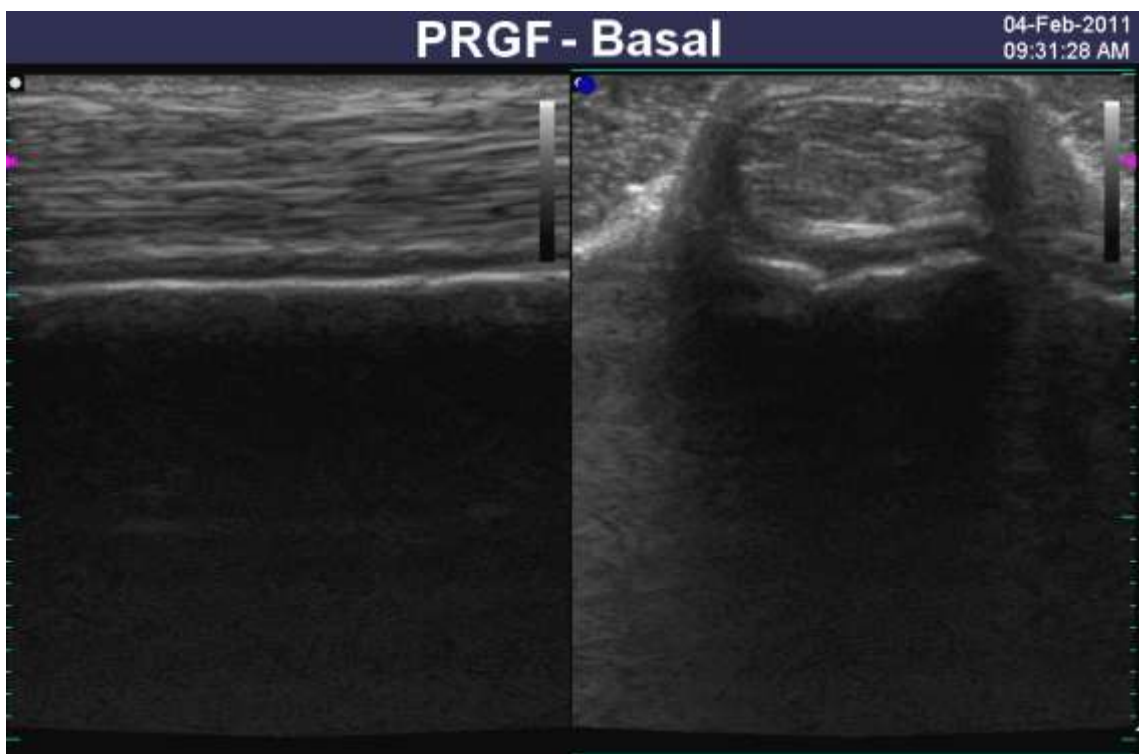


Fig. 90. Examen ecográfico en la 1ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

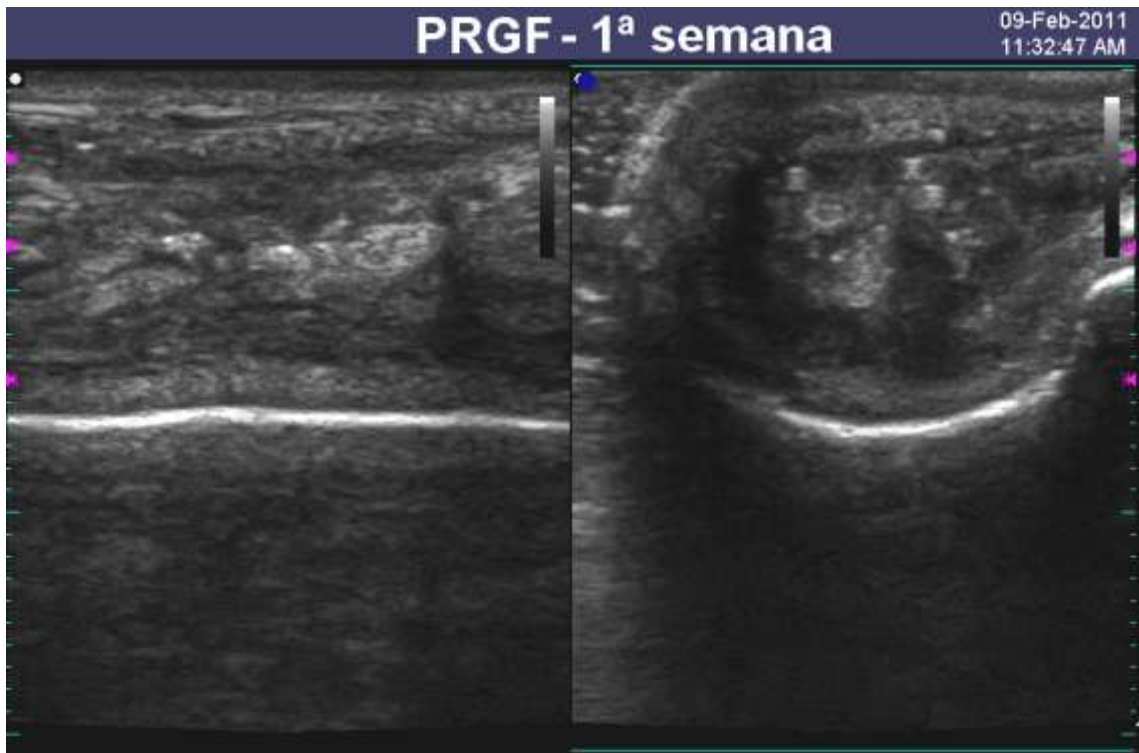


Fig. 91. Examen ecográfico en la 2ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

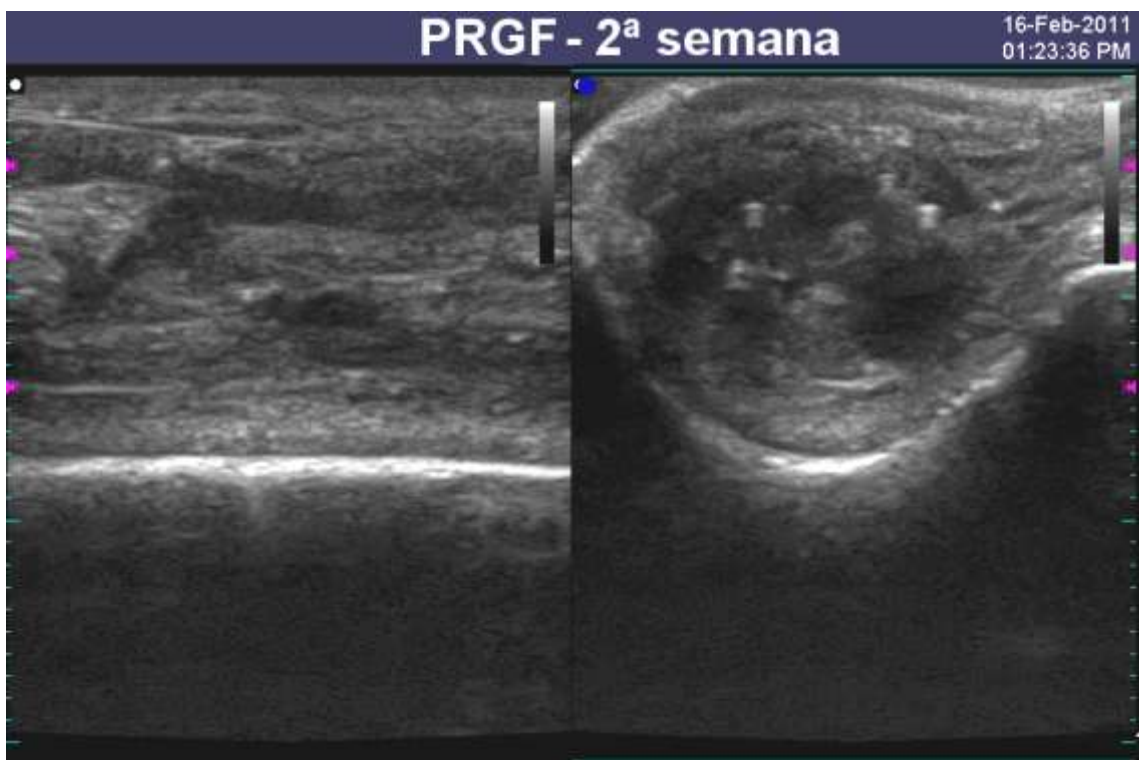


Fig. 92. Examen ecográfico en la 3ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

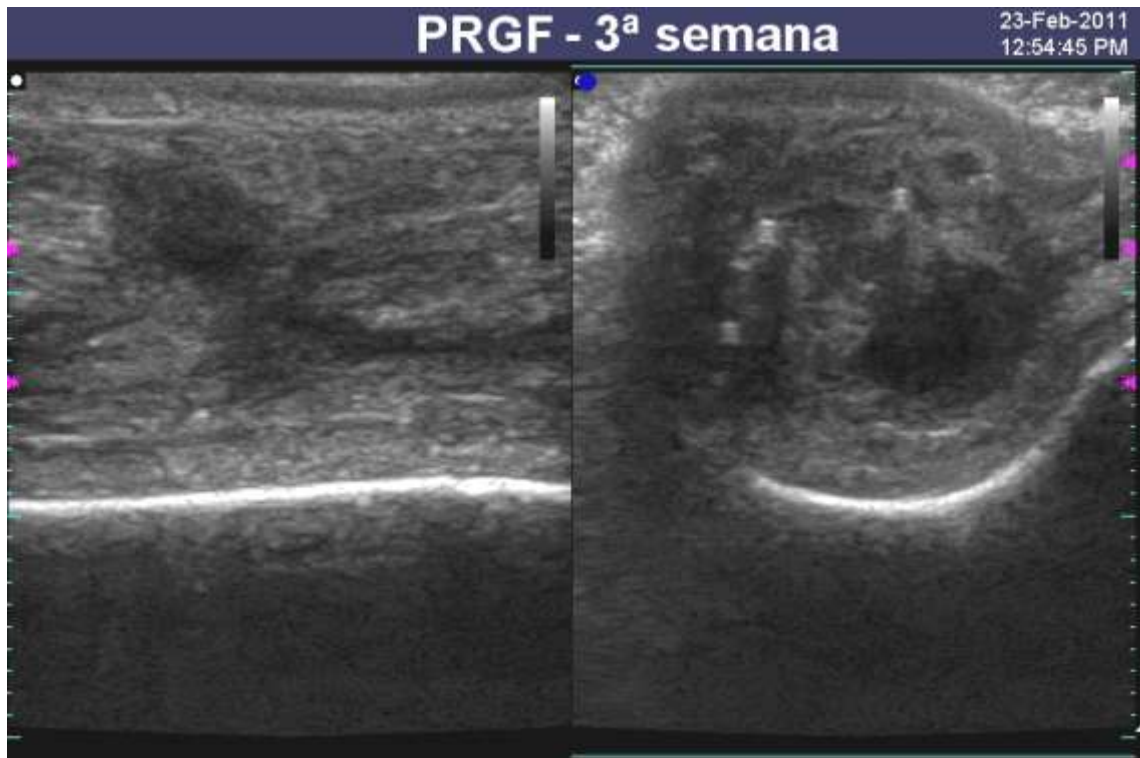


Fig. 93. Examen ecográfico en la 4ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

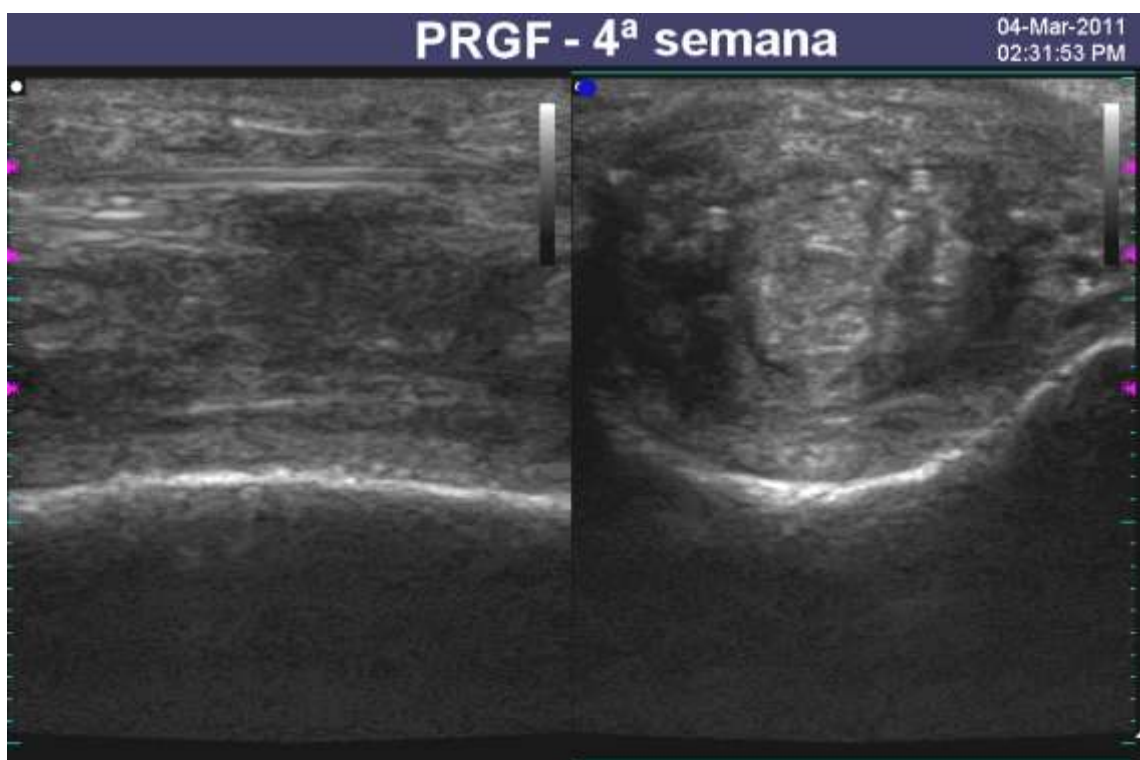


Fig. 94. Examen ecográfico en la 5ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

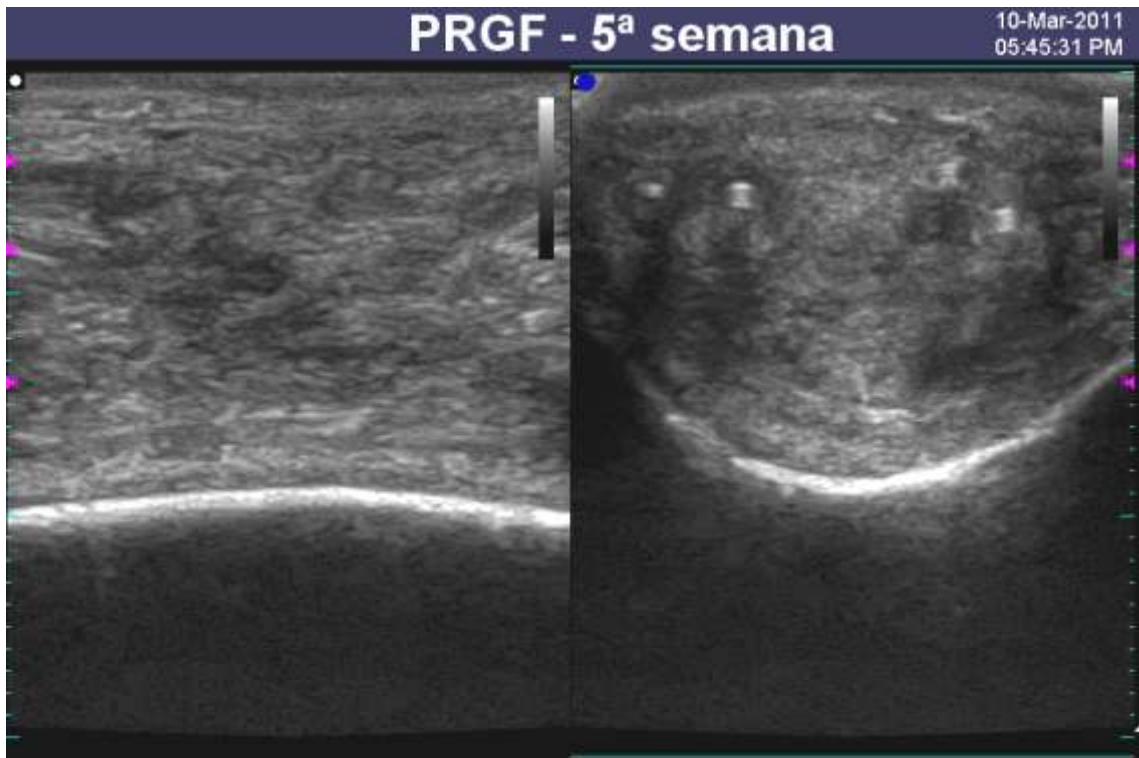


Fig. 95. Examen ecográfico en la 6ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

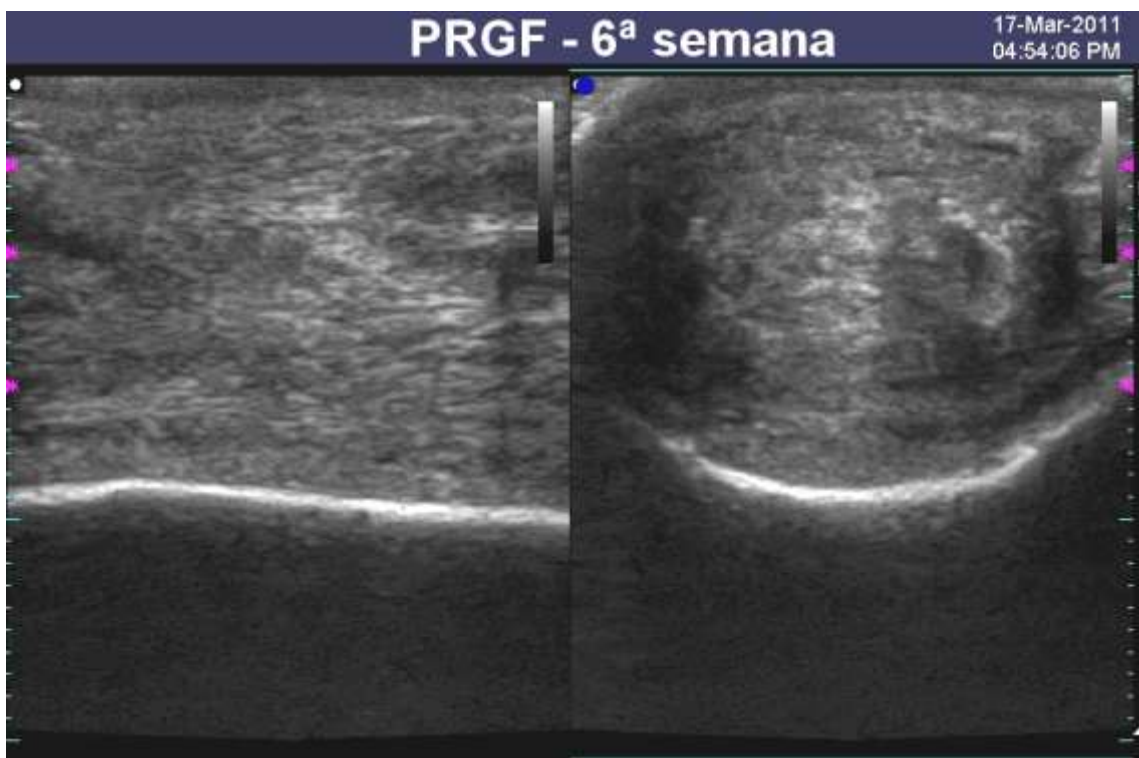


Fig. 96. Examen ecográfico en la 7ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.

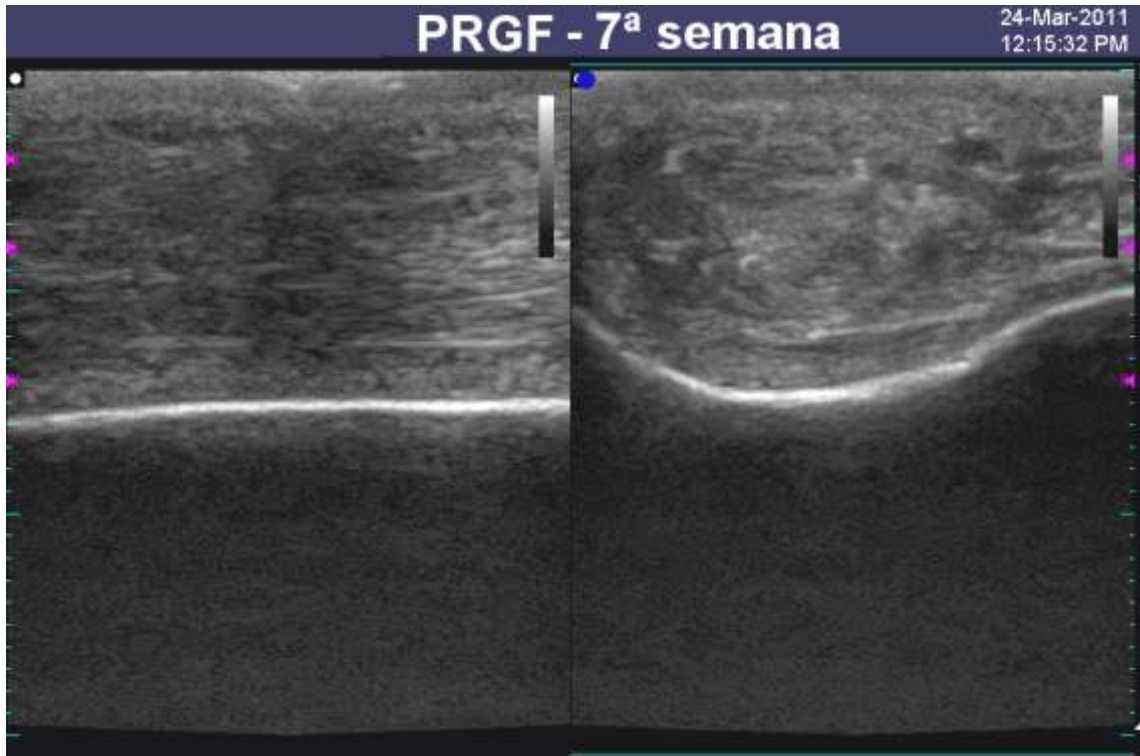
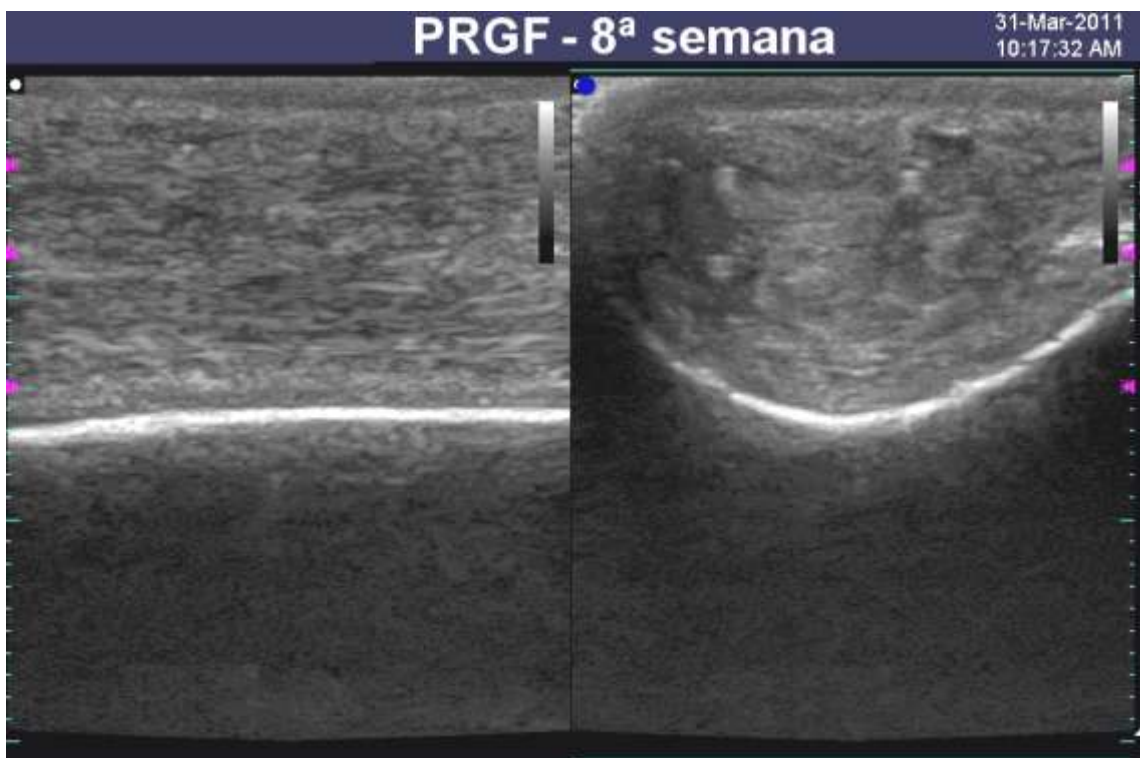


Fig. 97. Examen ecográfico en la 8ª semana tras la cirugía de un tendón infiltrado con PRGF.



Tras la comparación del valor de la escala ecográfica entre el grupo salino y el grupo PRGF a lo largo de los diferentes tiempos de examen, se observó que los tendones tratados con PRGF presentaban una valoración ecográfica significativamente más alta a la 8ª semana de estudio ($p = 0.012$), y por tanto un mejor aspecto ecográfico que los tendones infiltrados con solución salina. En los exámenes ecográficos realizados durante las semanas anteriores a la 8ª no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Tabla 14) (Gráfico 8). Tanto en el grupo salino como en el grupo PRGF se observó un marcado descenso en la valoración ecográfica justo tras la cirugía. A continuación, en ambos grupos de estudio, se produjo un incremento progresivo en la valoración ecográfica, si bien no se llegó a recuperar el valor basal (Gráficas 9 y 10).

Tabla 14. Tabla comparativa de la valoración ecográfica del tendón de Aquiles a lo largo del estudio [Evaluación realizada mediante una escala de valoración semicuantitativa (0-10) modificada de la escala propuesta por Reef en 2001]. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	SALINO	PRGF	<i>p</i>
Basal	10.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00	1.00
1ª semana	2.40 ± 0.97	2.70 ± 0.68	0.43
2ª semana	2.60 ± 0.84	3.00 ± 0.47	0.21
3ª semana	3.70 ± 0.67	3.50 ± 0.53	0.47
4ª semana	4.20 ± 0.63	4.30 ± 1.06	0.80
5ª semana	4.60 ± 0.55	5.00 ± 1.22	0.52
6ª semana	4.80 ± 0.48	5.40 ± 0.55	0.09
7ª semana	5.00 ± 1.00	6.20 ± 1.09	0.11
8ª semana	5.80 ± 0.45	7.00 ± 0.71	0.012

Gráfico 8. Evolución de la valoración ecográfica del tendón de Aquiles a lo largo del periodo de estudio. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

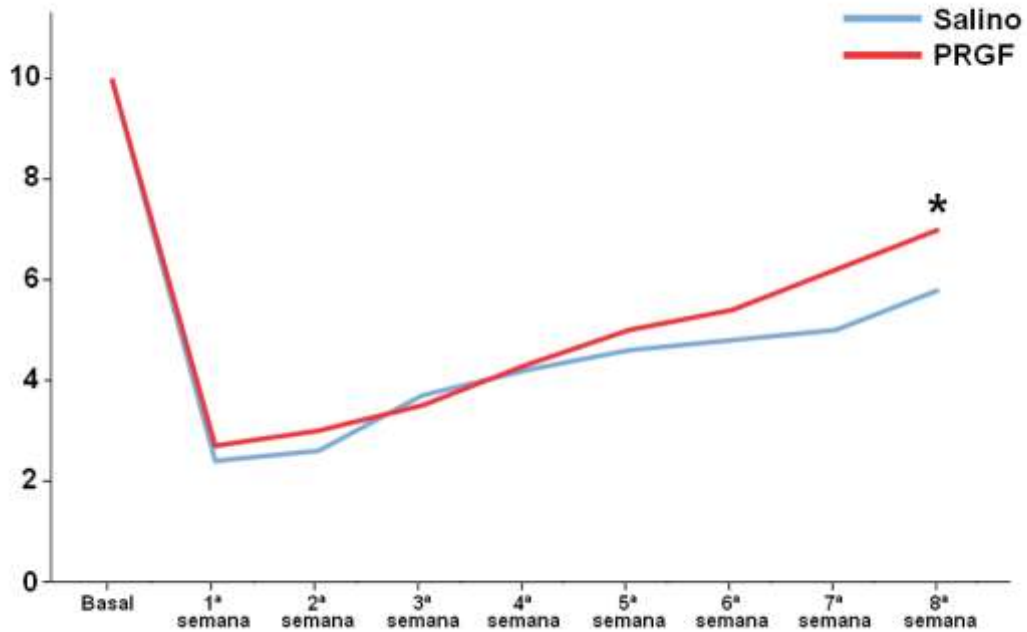


Gráfico 9. Evolución de la valoración ecográfica del tendón de Aquiles a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

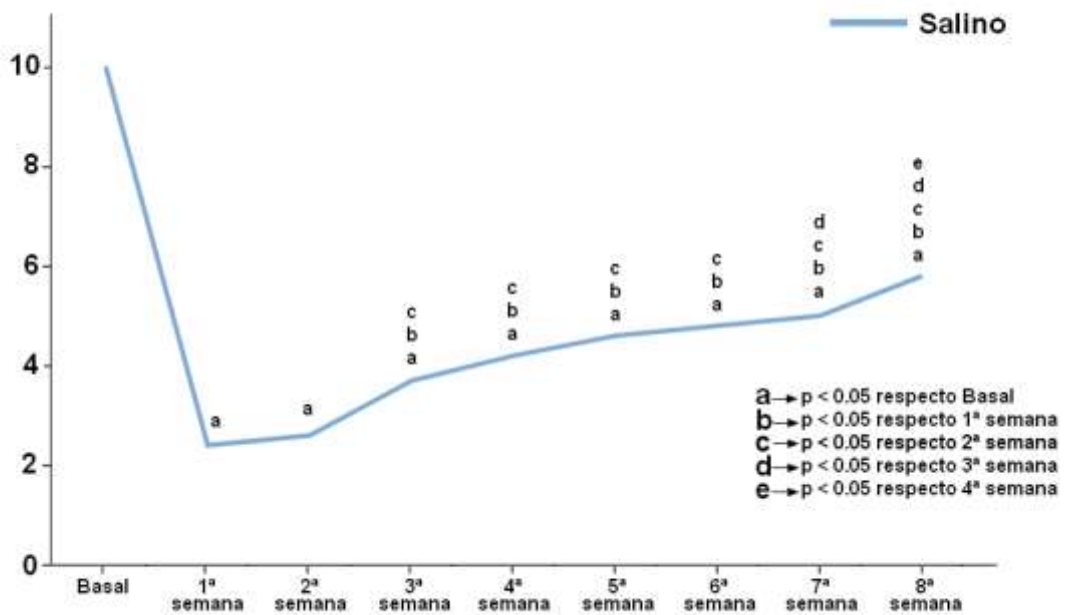
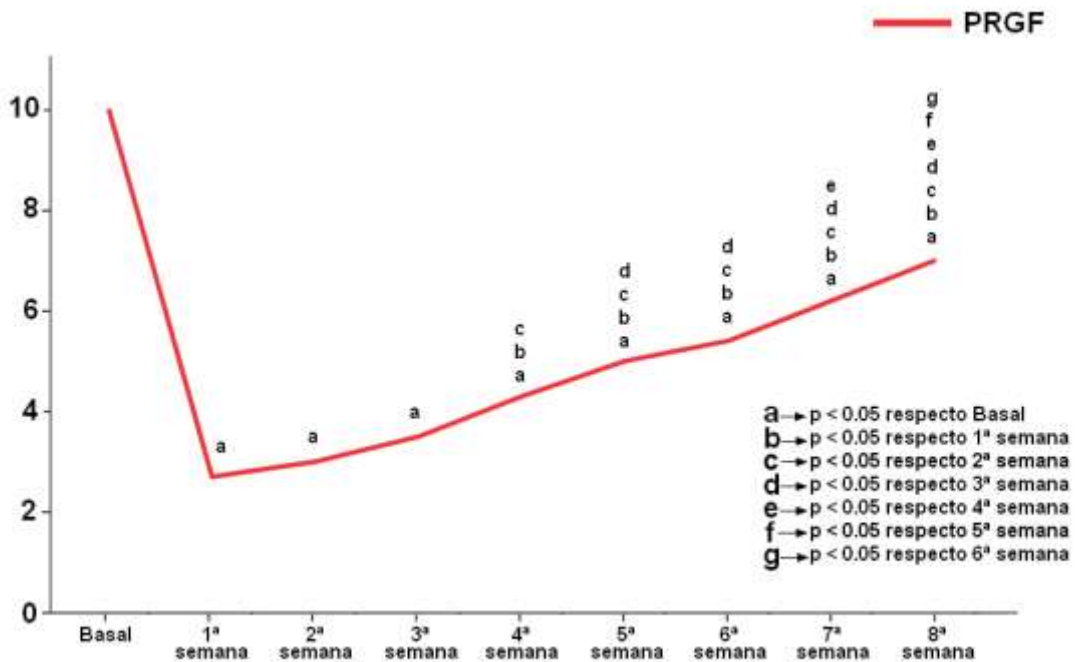


Gráfico 10. Evolución de la valoración ecográfica del tendón de Aquiles a lo largo del periodo de estudio en el grupo PRGF.



3.2. Análisis computerizado de la imagen ecográfica

Tal y como se ha detallado en la sección “Material y Método”, con ayuda del programa informático Image Pro Plus® versión 6.0 se determinó la proporción de cada uno de los diferentes patrones ecogénicos existentes en la imagen ecográfica transversal del tendón. La proporción de cada una de los cuatro tipos distintos de ecogenicidades se expresó como porcentaje con respecto al total del área transversal de la imagen ecográfica. A cada uno de los tipos de ecogenicidades se le asignó un color diferente: Ecogenicidad tipo I – Celeste, Ecogenicidad tipo II – Azul Aciano, Ecogenicidad tipo III – Azul Marino y Ecogenicidad tipo VI – Negro.

A continuación se presentan una serie de imágenes representativas de cada examen ecográfico semanal tras el procesado informático para la determinación de los porcentajes de cada tipo de ecogenicidad, tanto en un tendón de Aquiles infiltrado con solución salina (Figs. 98 – 106), como en otro tendón tratado con PRGF (Figs. 107 – 115).

En primer lugar se muestran las imágenes del **grupo Salino**:

Fig. 98. Patrones de ecogenicidad en el examen basal de un tendón del grupo salino.

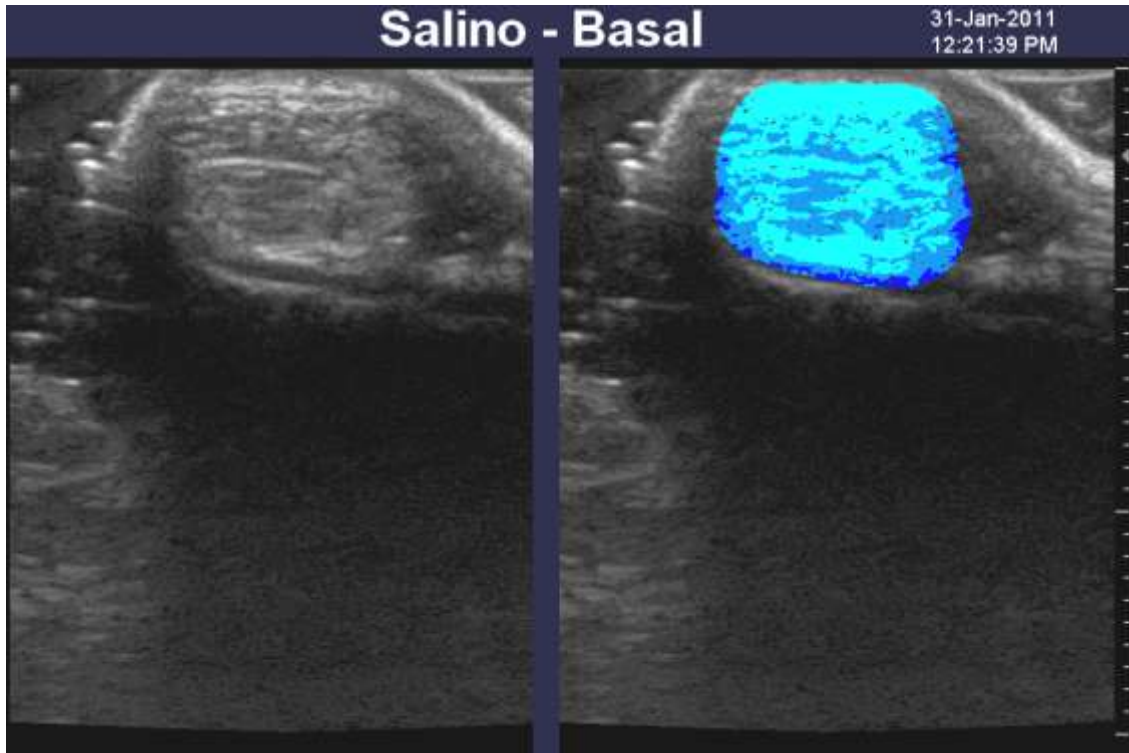


Fig. 99. Patrones de ecogenicidad en la 1ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

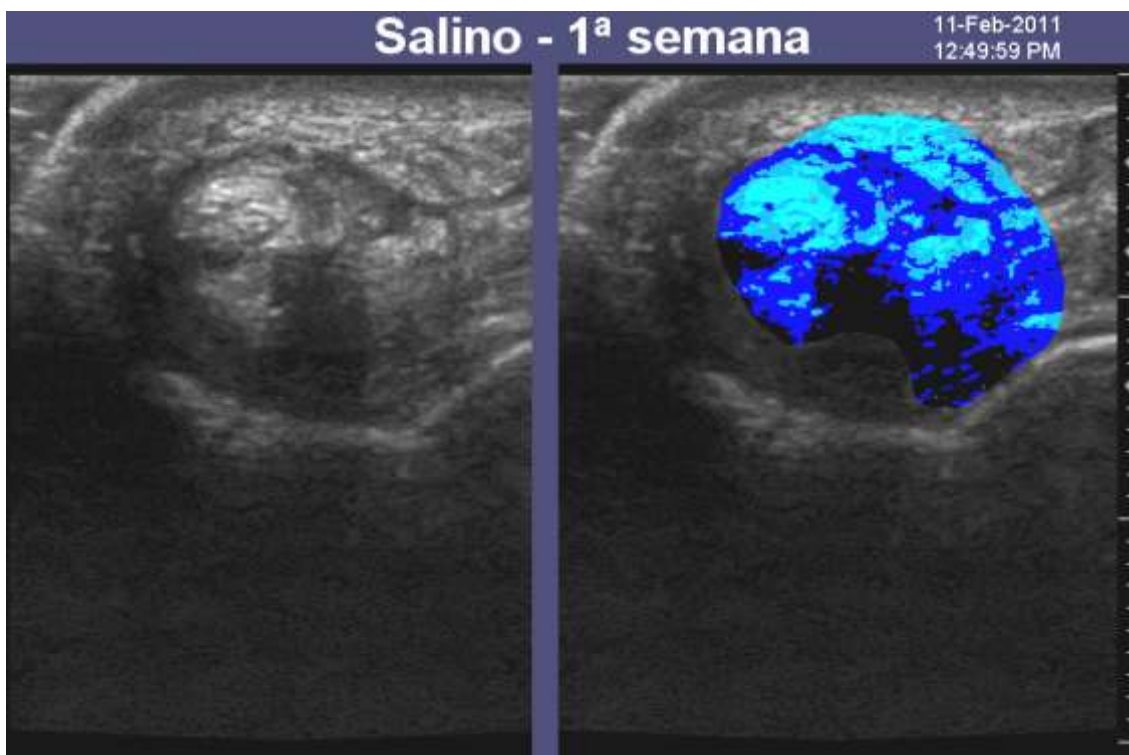


Fig. 100. Patrones de ecogenicidad en la 2ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

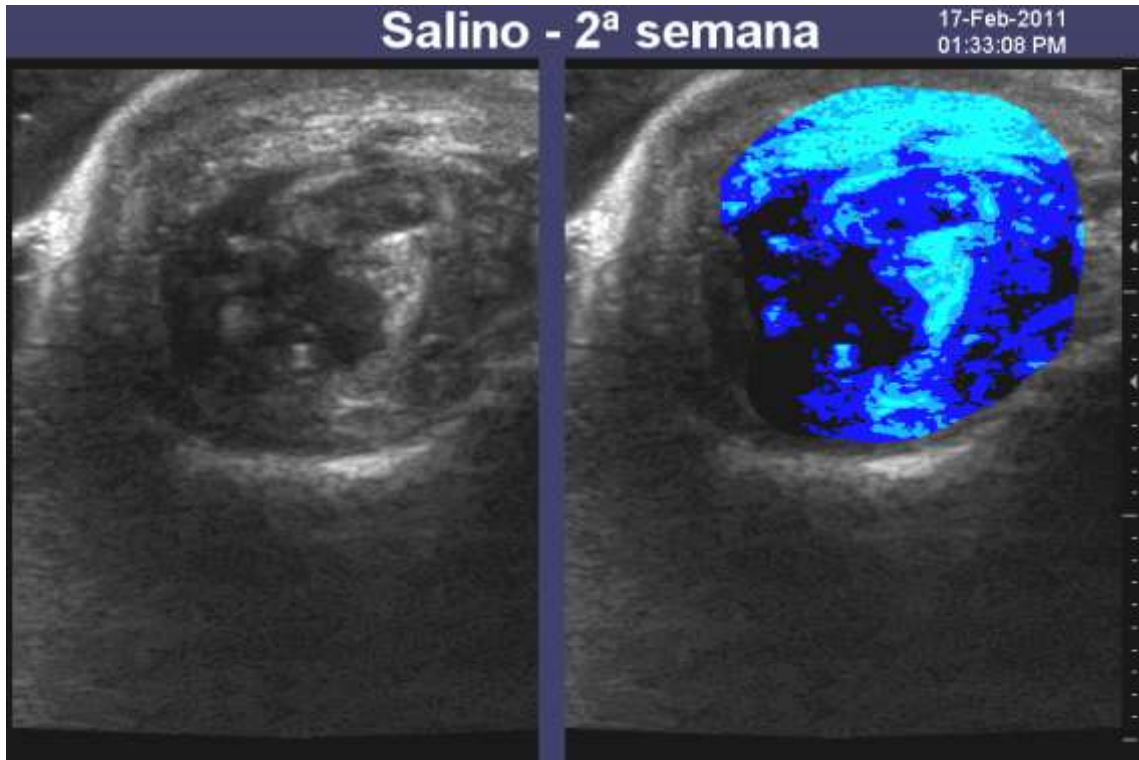


Fig. 101. Patrones de ecogenicidad en la 3ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

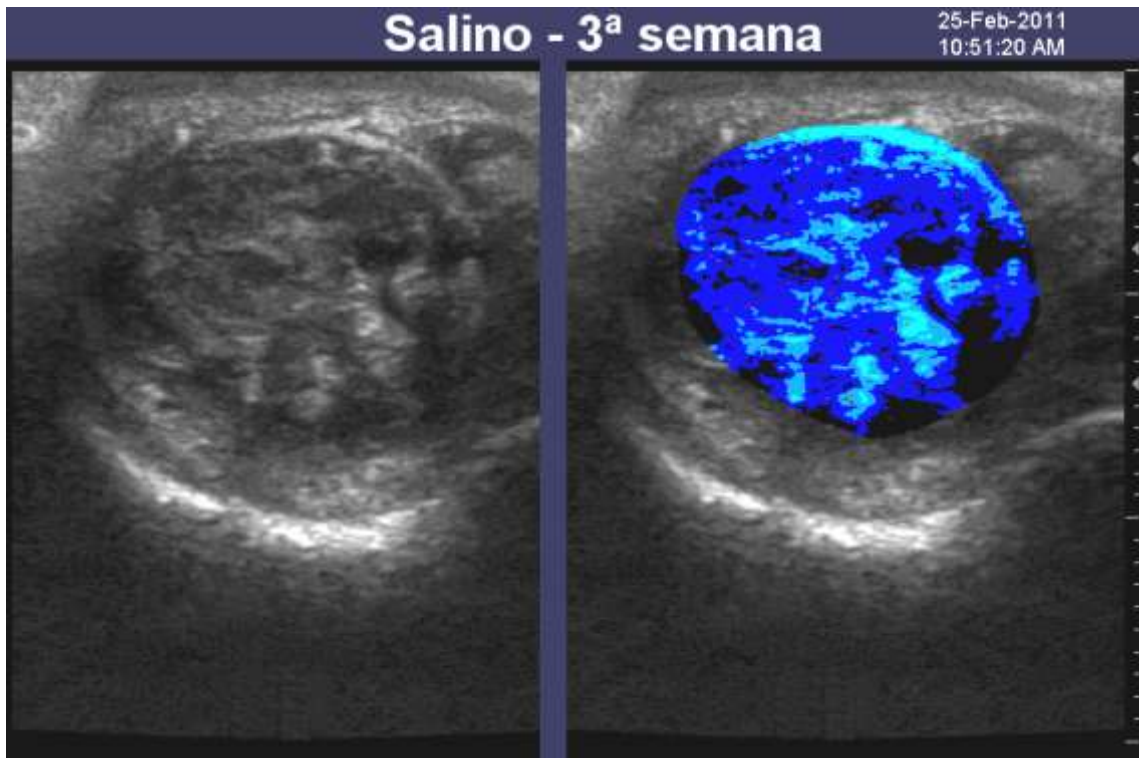


Fig. 102. Patrones de ecogenicidad en la 4ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

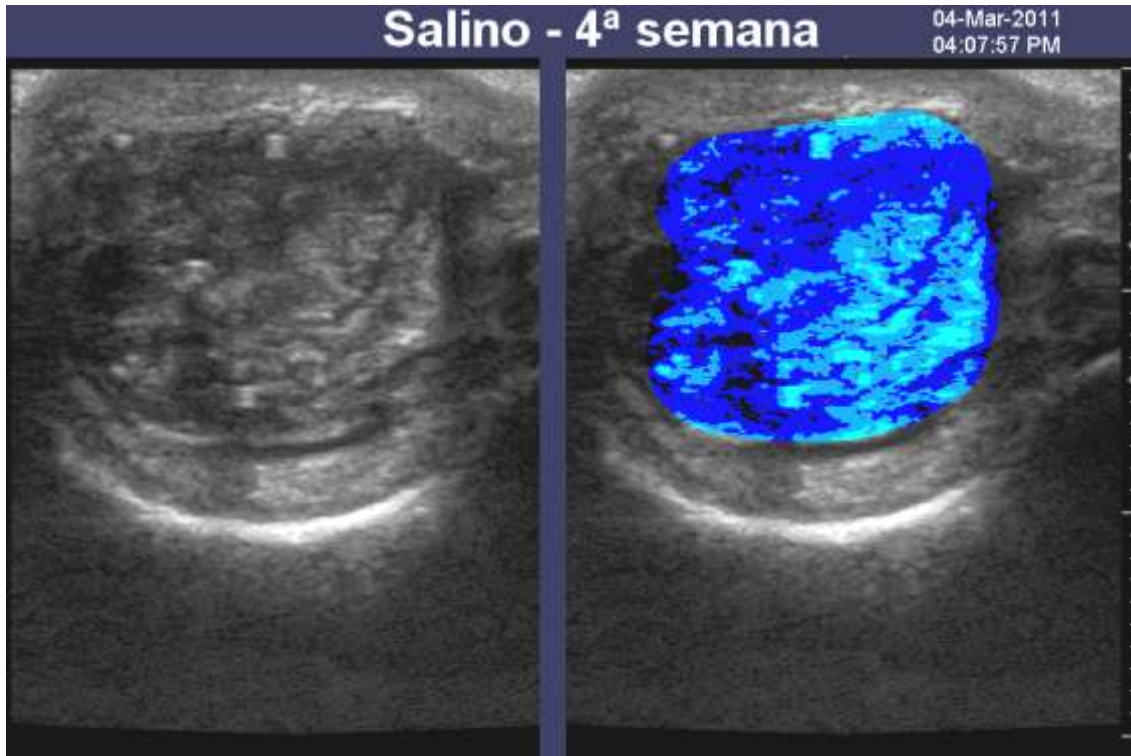


Fig. 103. Patrones de ecogenicidad en la 5ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

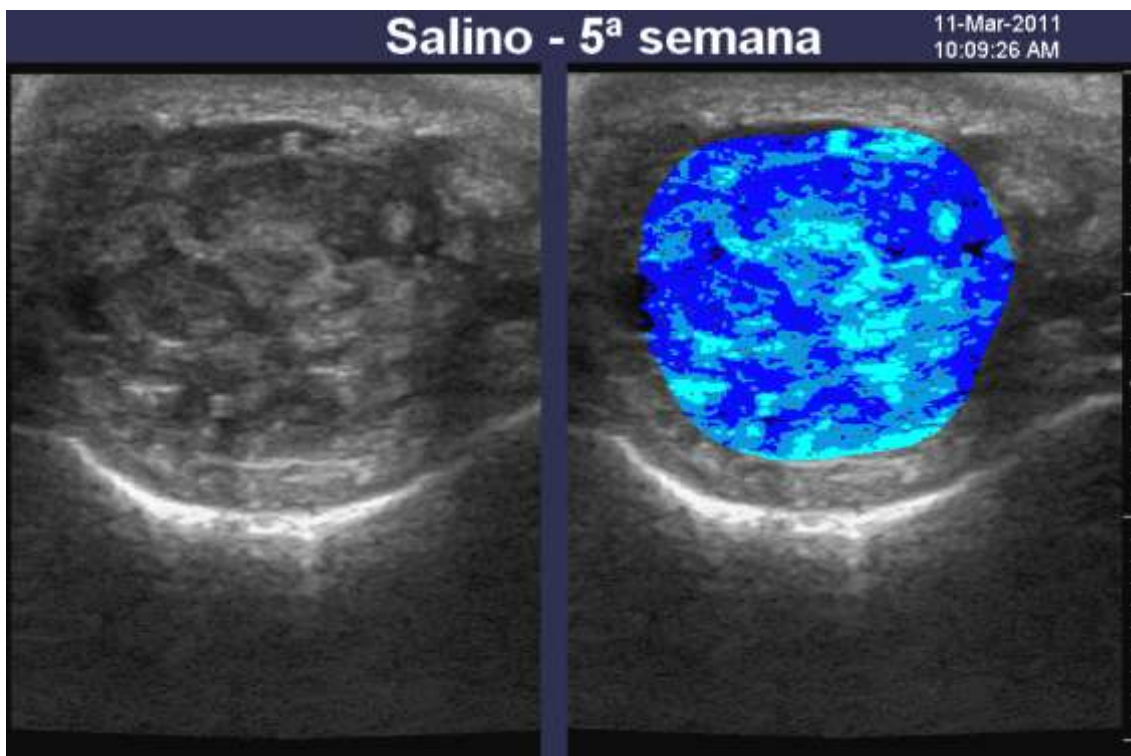


Fig. 104. Patrones de ecogenicidad en la 6ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

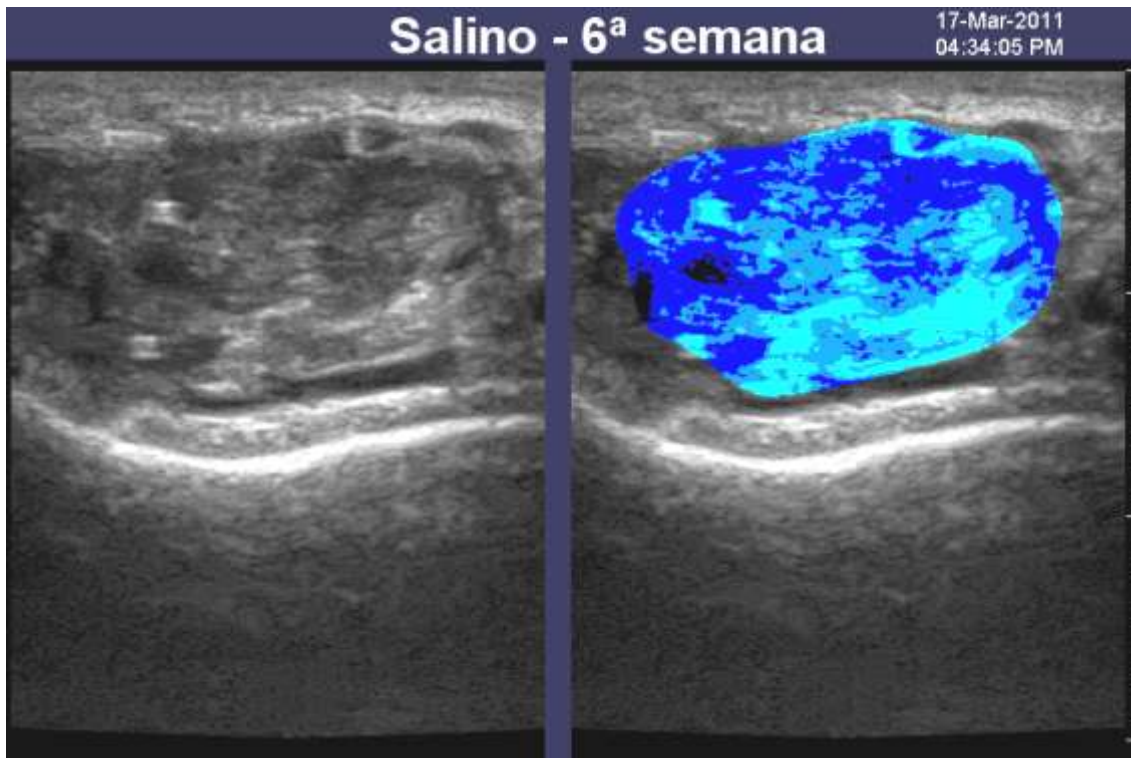


Fig. 105. Patrones de ecogenicidad en la 7ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.

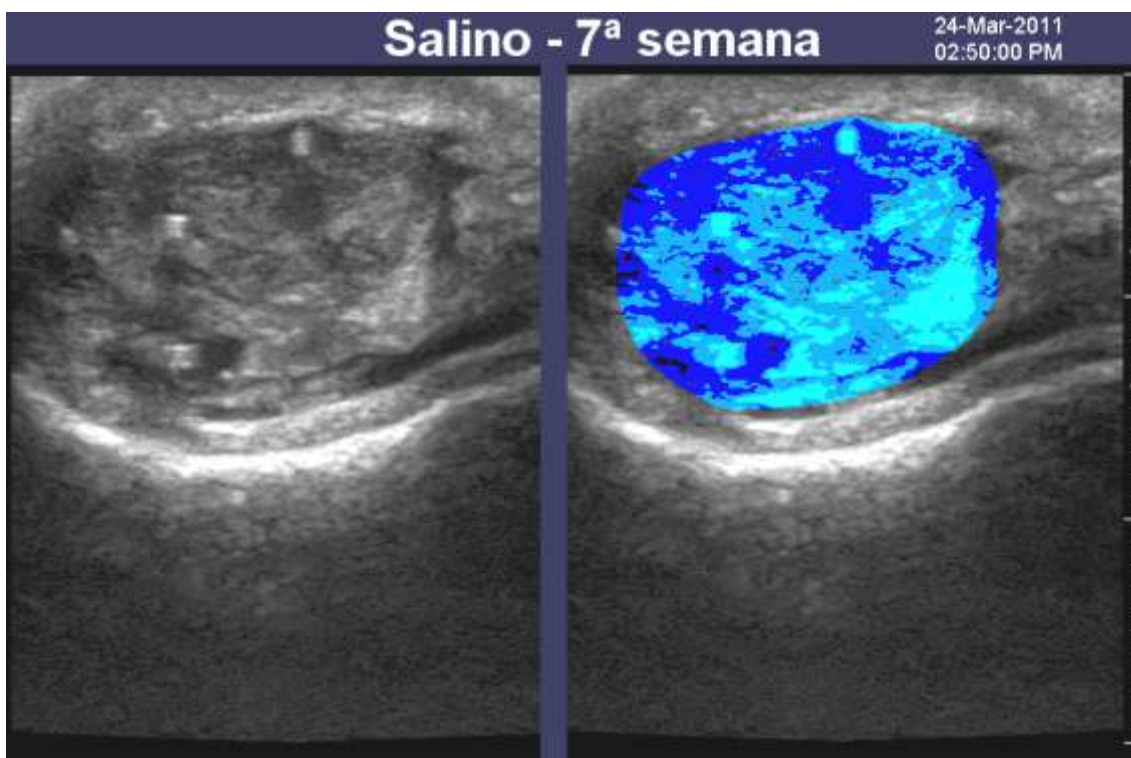
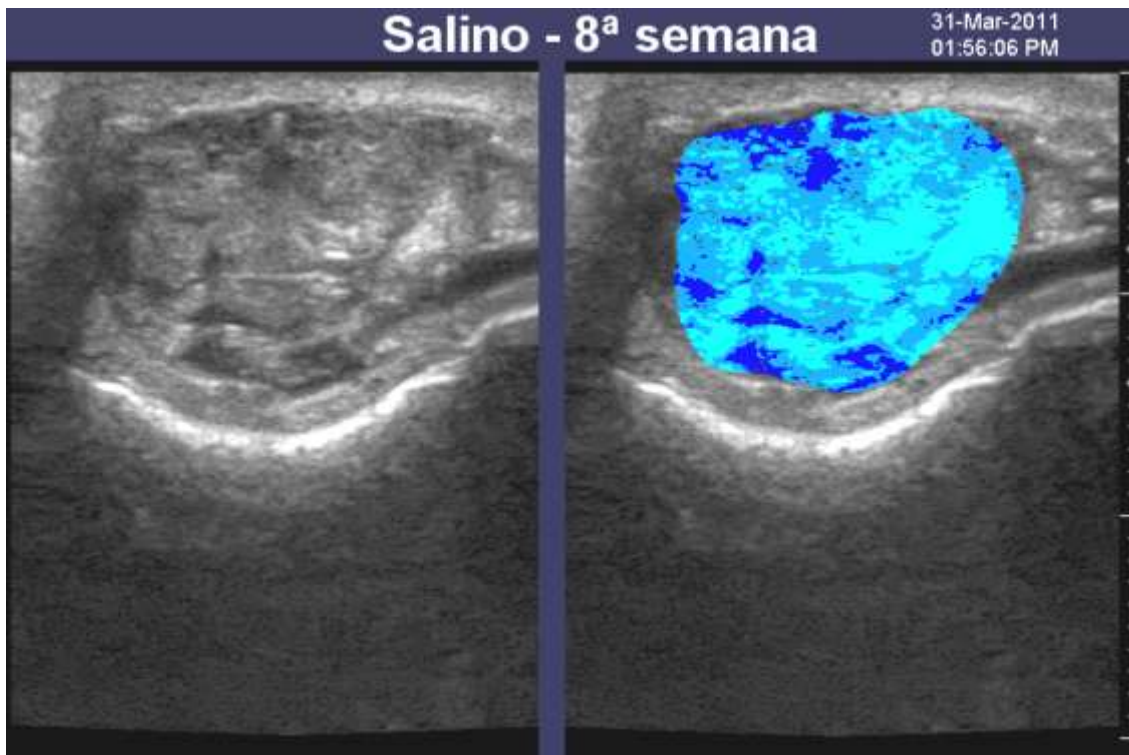


Fig. 106. Patrones de ecogenicidad en la 8ª semana de un tendón infiltrado con solución salina.



A continuación se muestran las imágenes del **grupo PRGF**:

Fig. 107. Patrones de ecogenicidad en el examen basal de un tendón del grupo PRGF.

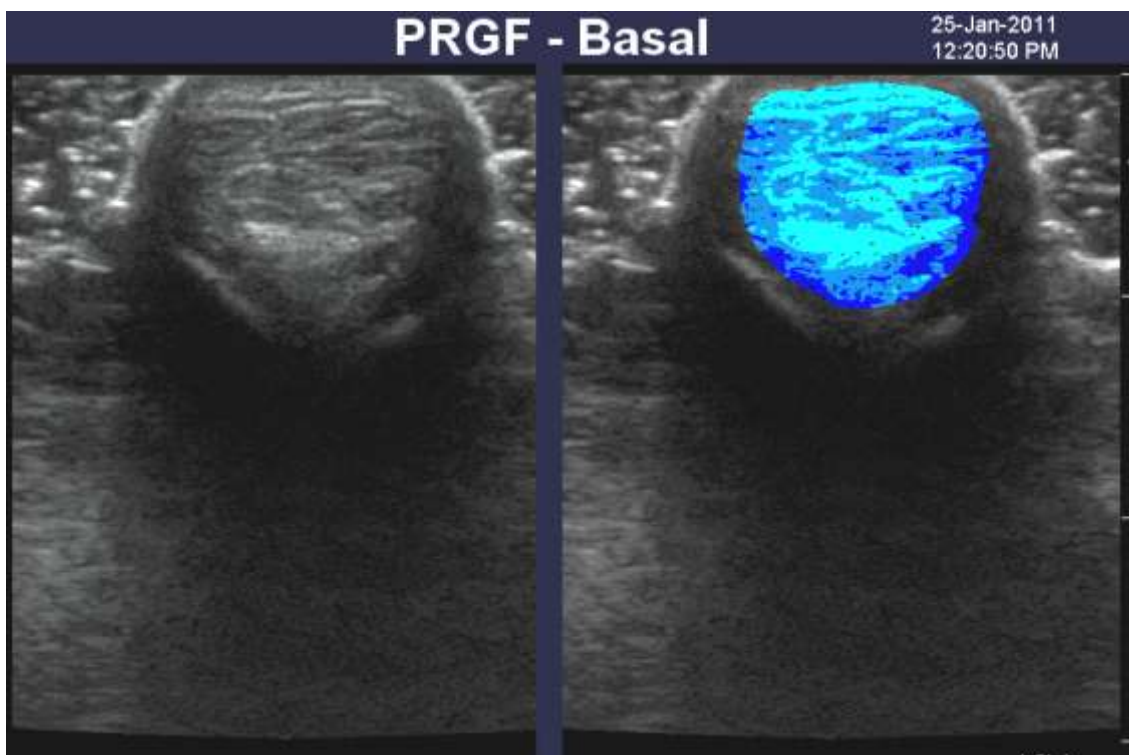


Fig. 108. Patrones de ecogenicidad en la 1ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

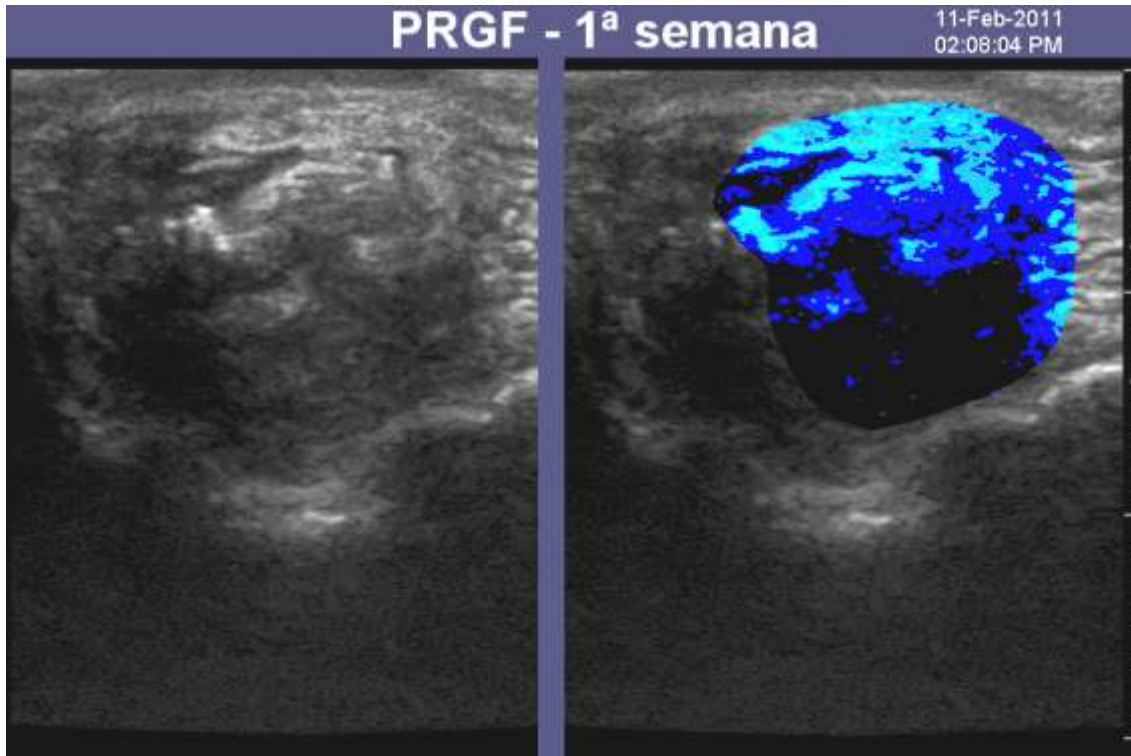


Fig. 109. Patrones de ecogenicidad en la 2ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

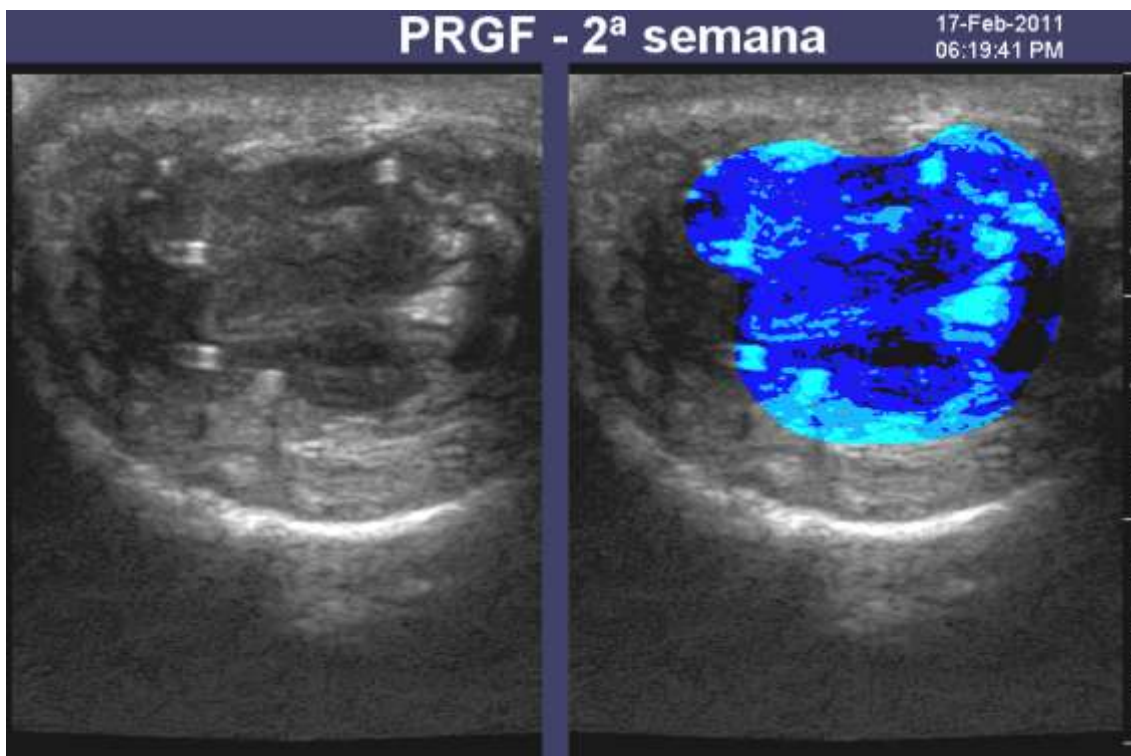


Fig. 110. Patrones de ecogenicidad en la 3ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

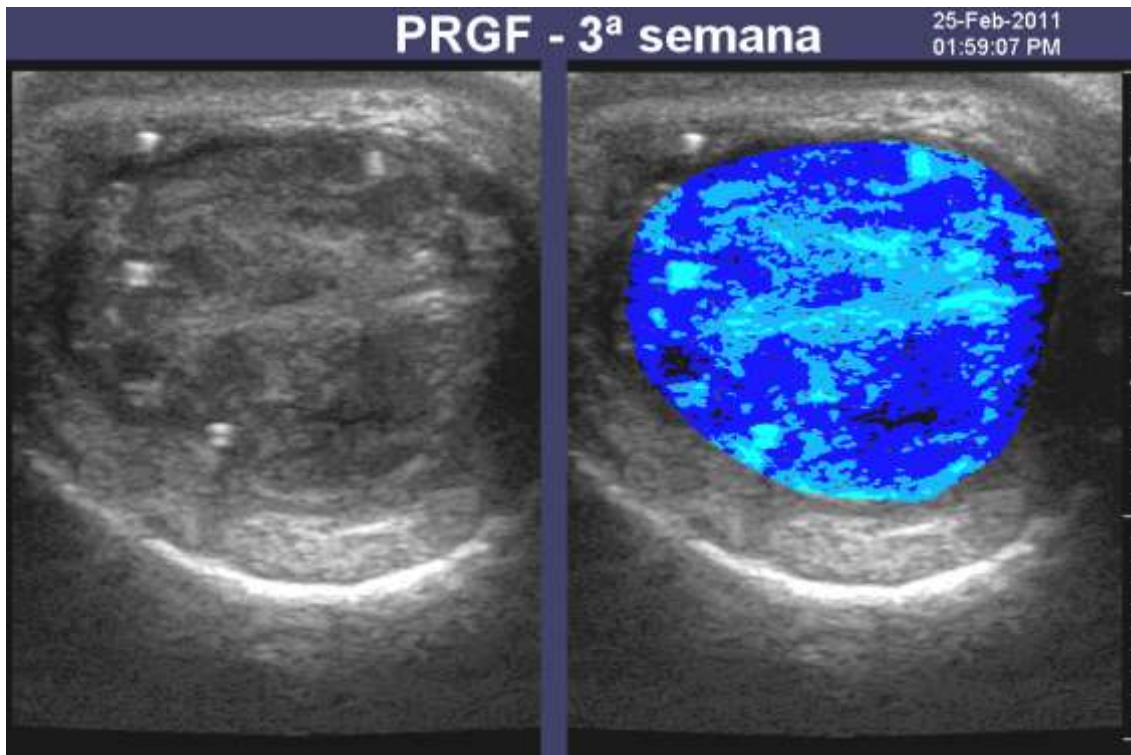


Fig. 111. Patrones de ecogenicidad en la 4ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

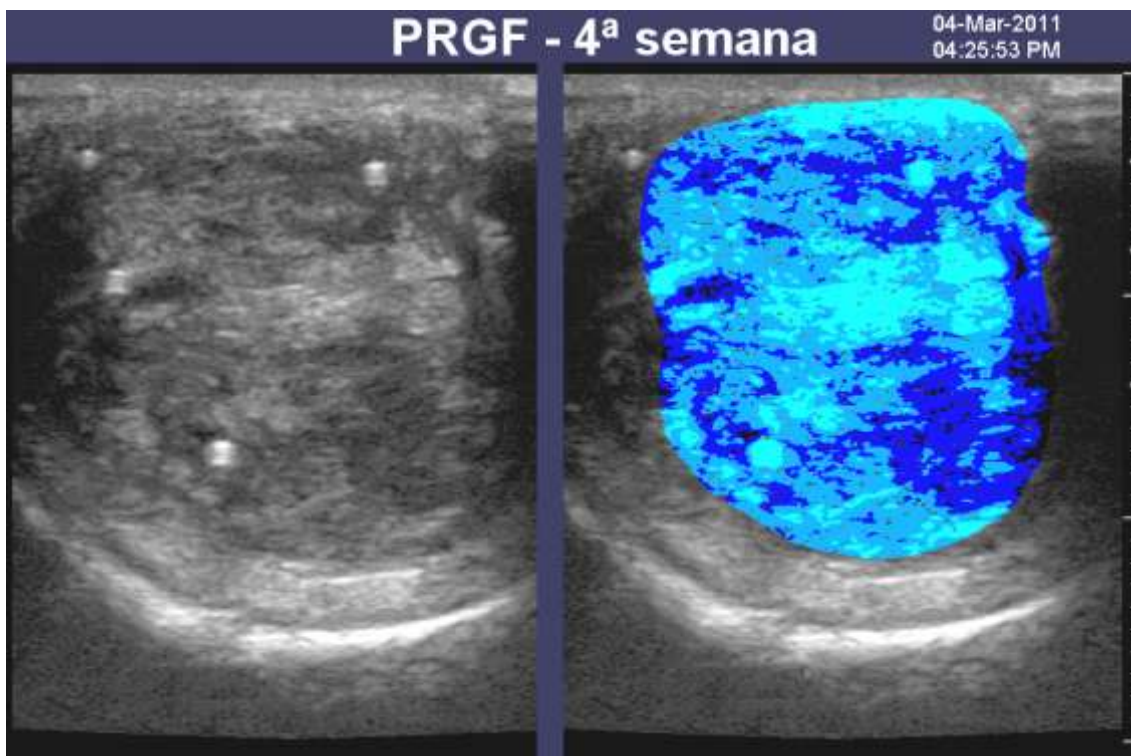


Fig. 112. Patrones de ecogenicidad en la 5ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

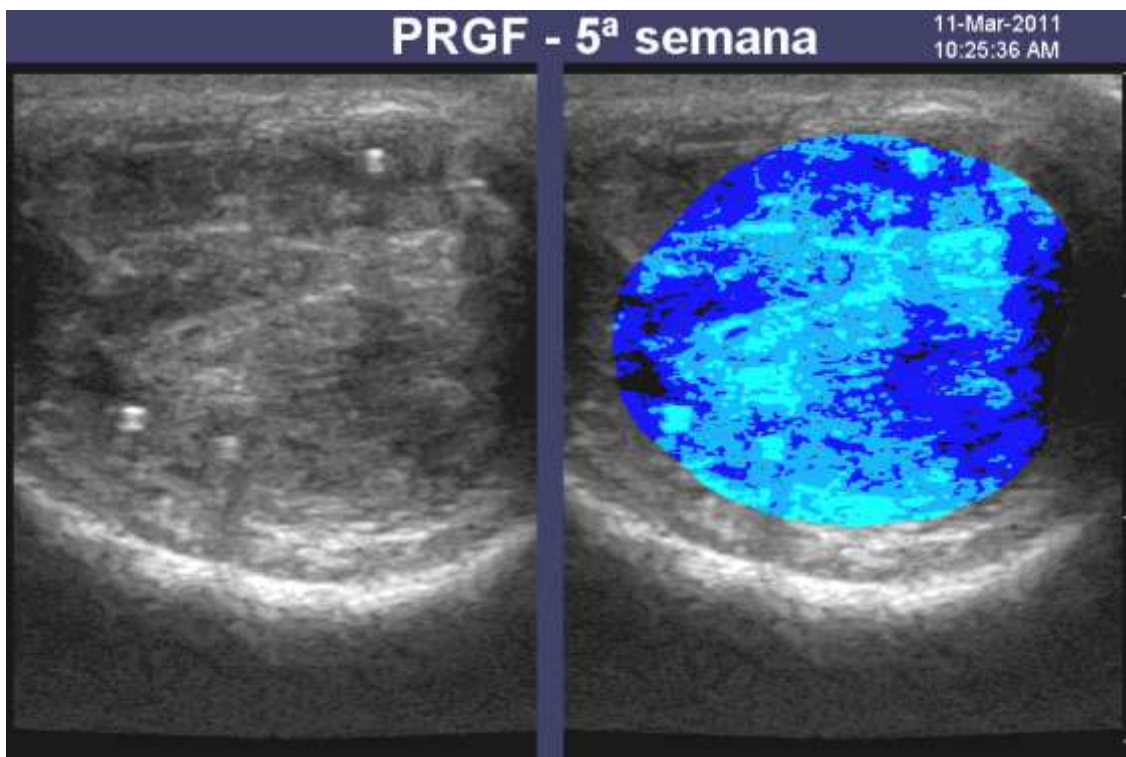


Fig. 113. Patrones de ecogenicidad en la 6ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

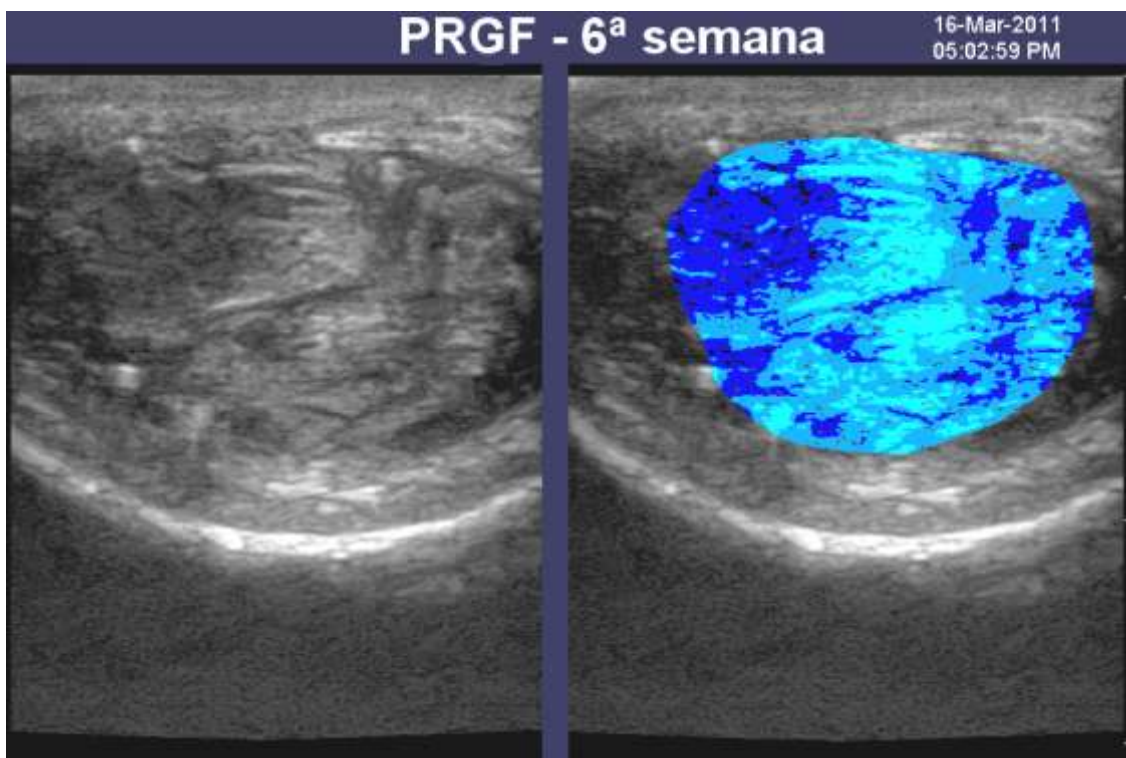


Fig. 114. Patrones de ecogenicidad en la 7ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

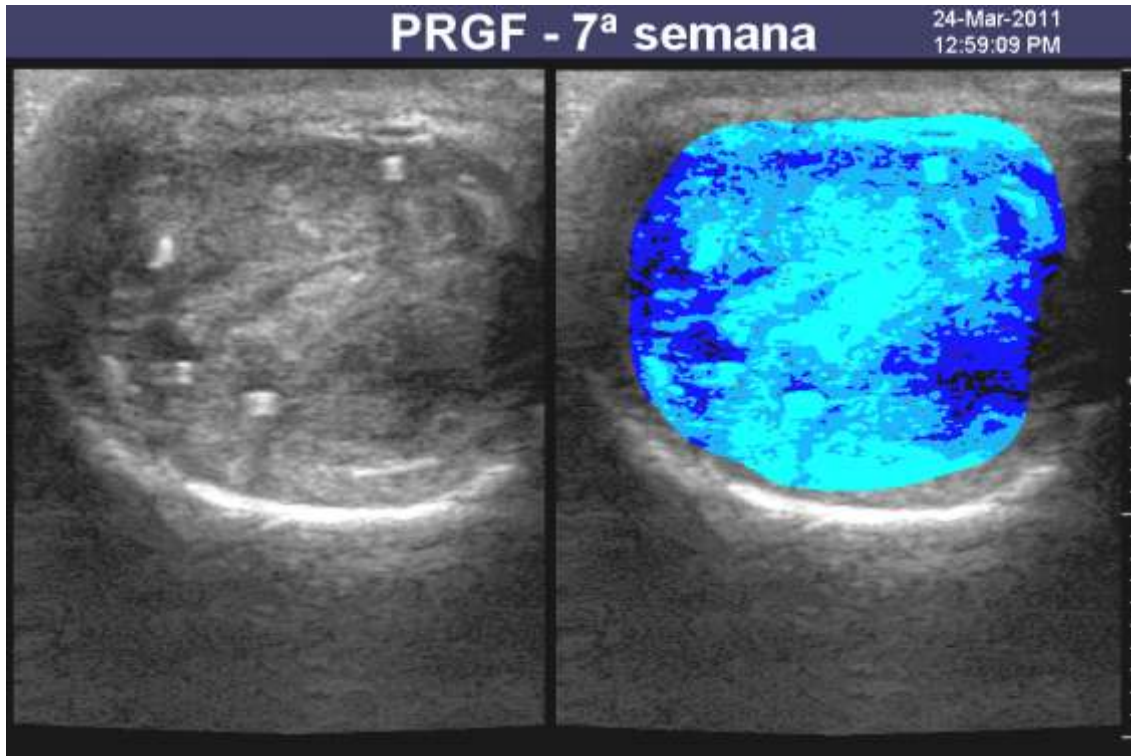


Fig. 115. Patrones de ecogenicidad en la 8ª semana de un tendón infiltrado con PRGF.

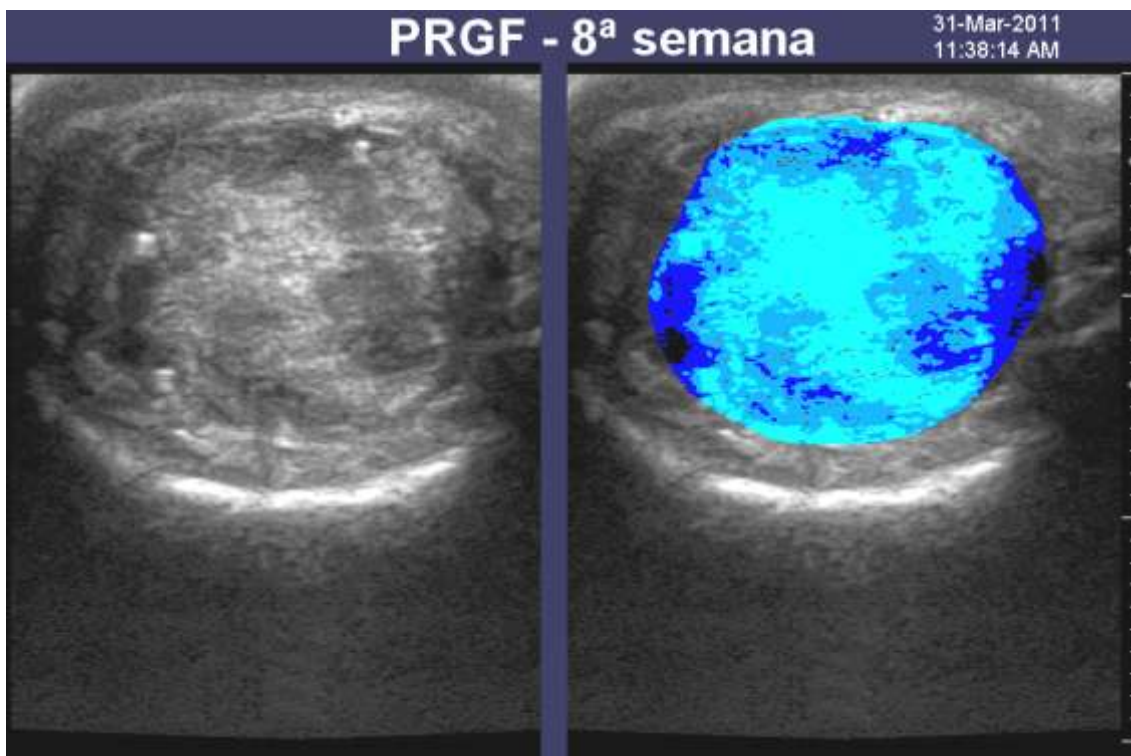
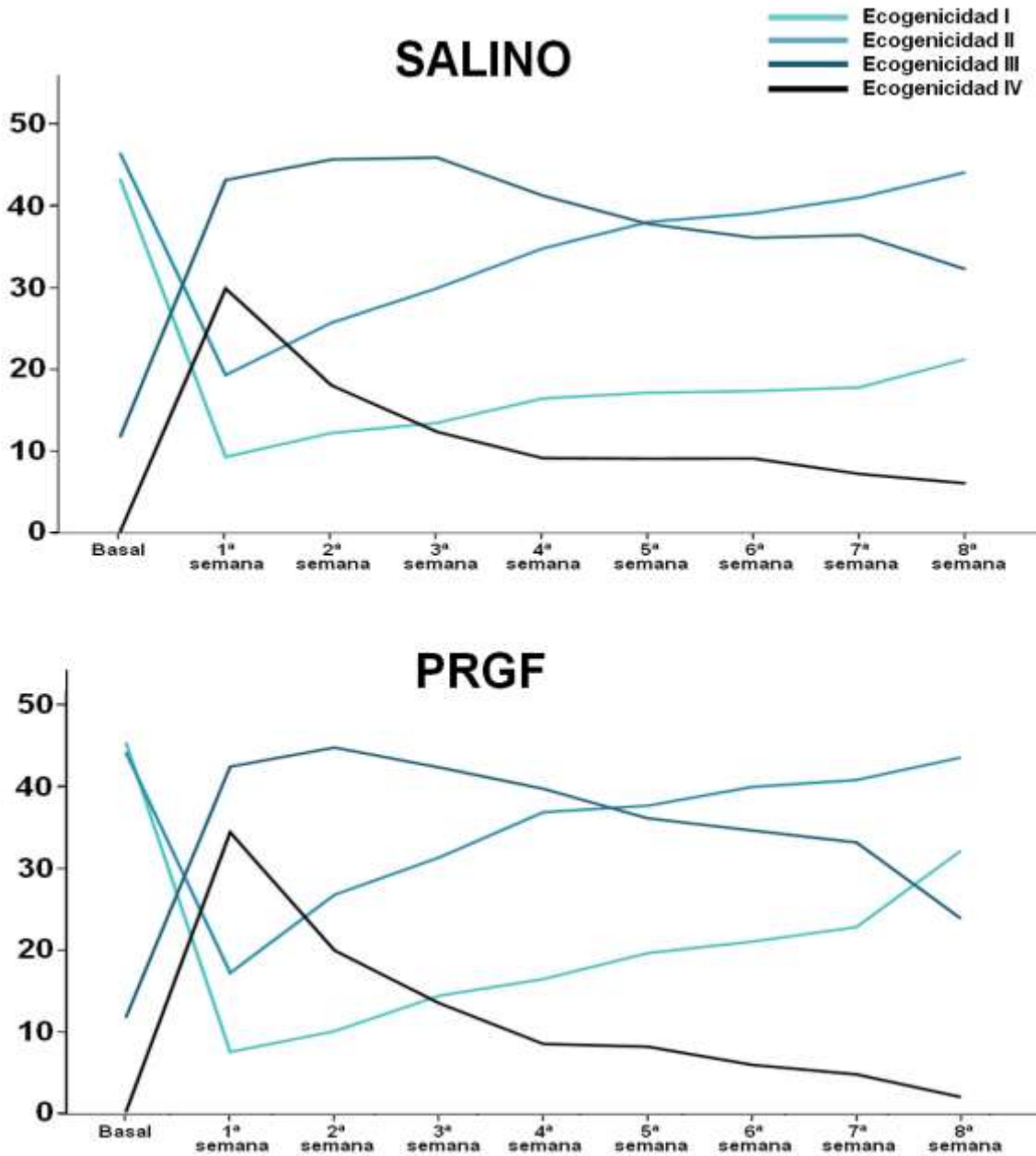


Tabla 15. Tabla comparativa del porcentaje de cada una de las diferentes ecogenicidades existentes en el tendón de Aquiles a lo largo del estudio. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

		SALINO	PRGF	<i>p</i>
Basal	I	42.61 ± 8.04	44.69 ± 12.13	0.66
	II	45.71 ± 4.90	43.50 ± 6.94	0.42
	III	11.54 ± 5.27	11.59 ± 7.22	0.98
	IV	0.14 ± 0.18	0.22 ± 0.25	0.45
1ª semana	I	9.16 ± 1.81	7.46 ± 2.93	0.13
	II	19.00 ± 3.86	16.95 ± 3.00	0.20
	III	42.43 ± 4.60	41.74 ± 3.48	0.70
	IV	29.40 ± 7.89	33.85 ± 6.57	0.19
2ª semana	I	12.05 ± 3.96	9.96 ± 3.02	0.20
	II	25.28 ± 5.64	26.35 ± 4.58	0.65
	III	44.89 ± 2.53	44.03 ± 4.45	0.60
	IV	17.78 ± 8.55	19.65 ± 6.56	0.59
3ª semana	I	13.25 ± 3.09	14.21 ± 2.87	0.48
	II	29.44 ± 4.23	30.81 ± 5.72	0.55
	III	45.13 ± 3.01	41.64 ± 3.25	0.02
	IV	12.18 ± 4.73	13.33 ± 6.34	0.65
4ª semana	I	16.20 ± 5.14	16.22 ± 3.26	0.99
	II	34.21 ± 5.69	36.26 ± 5.59	0.43
	III	4.56 ± 5.66	39.08 ± 4.39	0.52
	IV	9.03 ± 4.30	8.43 ± 3.54	0.74
5ª semana	I	16.89 ± 1.49	19.33 ± 1.88	0.06
	II	37.39 ± 2.85	37.04 ± 3.53	0.87
	III	37.16 ± 1.64	35.53 ± 4.84	0.51
	IV	8.96 ± 2.33	8.09 ± 1.47	0.50
6ª semana	I	17.08 ± 4.09	20.71 ± 5.18	0.25
	II	38.44 ± 2.74	39.30 ± 4.93	0.74
	III	35.49 ± 3.73	34.07 ± 5.86	0.66
	IV	8.98 ± 3.13	5.91 ± 2.29	0.11
7ª semana	I	17.53 ± 3.48	22.47 ± 1.79	0.03
	II	40.33 ± 5.45	40.13 ± 4.77	0.95
	III	34.82 ± 5.64	32.63 ± 4.17	0.34
	IV	7.12 ± 3.27	4.77 ± 2.47	0.23
8ª semana	I	20.92 ± 3.37	31.63 ± 4.74	0.003
	II	43.36 ± 3.67	42.83 ± 3.27	0.82
	III	31.72 ± 3.56	23.49 ± 1.48	0.001
	IV	6.00 ± 1.81	2.05 ± 1.45	0.005

Los valores del porcentaje de cada tipo de ecogenicidad en cada uno de los exámenes semanales, tanto del grupo salino como del grupo PRGF, quedan registrados en la Tabla 15; y su evolución a lo largo del tiempo queda reflejada en el Gráfico 11.

Gráfico 11. Evolución de los diferentes tipos de ecogenicidad a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino y en el grupo PRGF.



A continuación vamos a describir de manera más detallada la evolución de cada uno de los tipos de ecogenicidad a lo largo del tiempo de estudio, tanto en el grupo salino como en el grupo PRGF.

La ecogenicidad de tipo I (que se corresponde con la observada en áreas de ecogenicidad moderada con punteado hiperecoico, con un rango de grises que va desde 255 – 80) y la ecogenicidad de tipo II (que se corresponde con áreas de ecogenicidad moderada a hiperecoica, con un rango de grises que va desde 79 – 52) son los tipos de ecogenicidad predominante en el tendón sano. Estos tipos de ecogenicidad son los que se encontraron en mayor proporción en el examen basal de los tendones, tanto en el grupo salino como en el grupo PRGF, sin que se encontrasen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio en este tiempo basal (Tabla 15).

La ecogenicidad de tipo I descendió significativamente en ambos grupos de estudio en el examen realizado una semana tras la cirugía, alcanzado en este momento su valor más bajo. A continuación, esta ecogenicidad de tipo I fue creciendo progresivamente sin que se detectasen diferencias significativas entre ambos grupos experimentales hasta la 7ª semana. En esta 7ª semana, el porcentaje de áreas con ecogenicidad de tipo I en el grupo PRGF fue significativamente mayor que en el grupo salino ($p = 0.03$). En el último examen ecográfico, llevado a cabo a la 8ª semana de la cirugía, también se observó un incremento significativo de la ecogenicidad de tipo I en los tendones del grupo PRGF ($p = 0.003$) (Gráficos 12, 13 y 14).

Gráfico 12. Evolución de la ecogenicidad de tipo I a lo largo del periodo de estudio. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

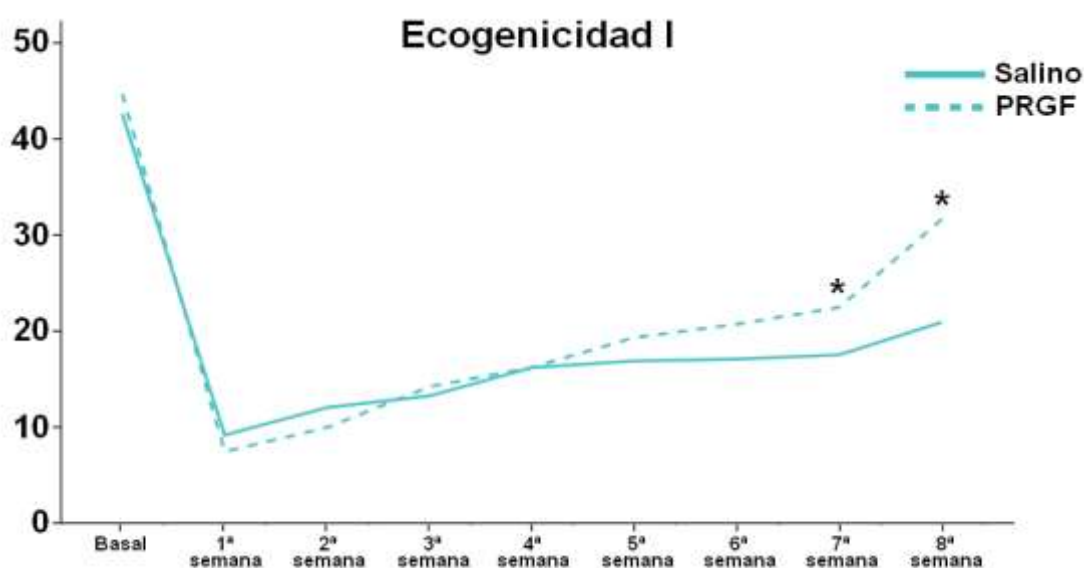


Gráfico 13. Evolución de la ecogenicidad de tipo I a lo largo del periodo de estudio en el **grupo Salino**.

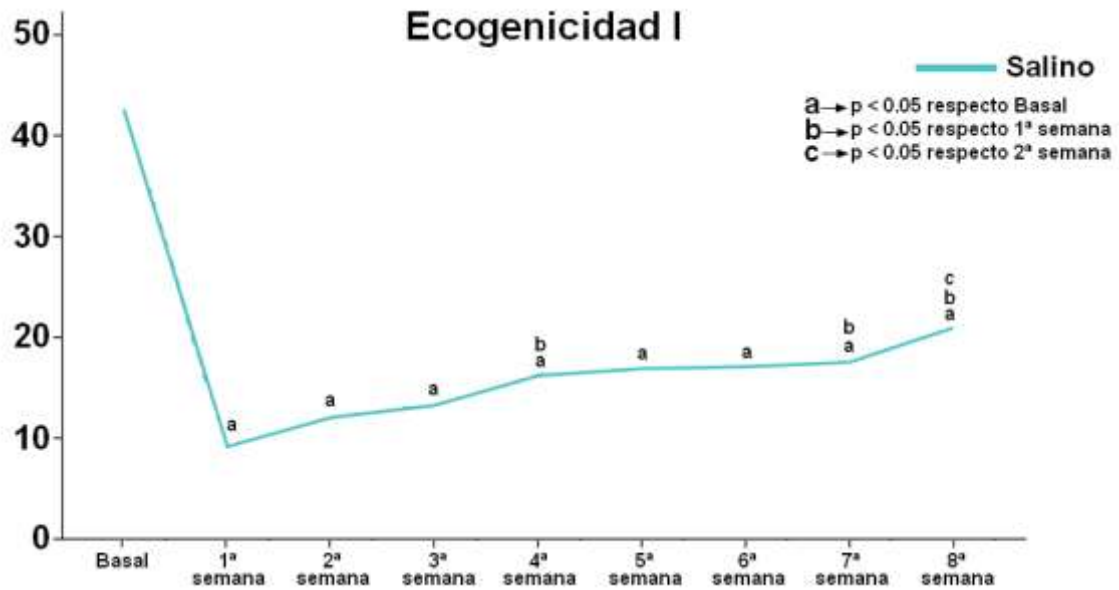
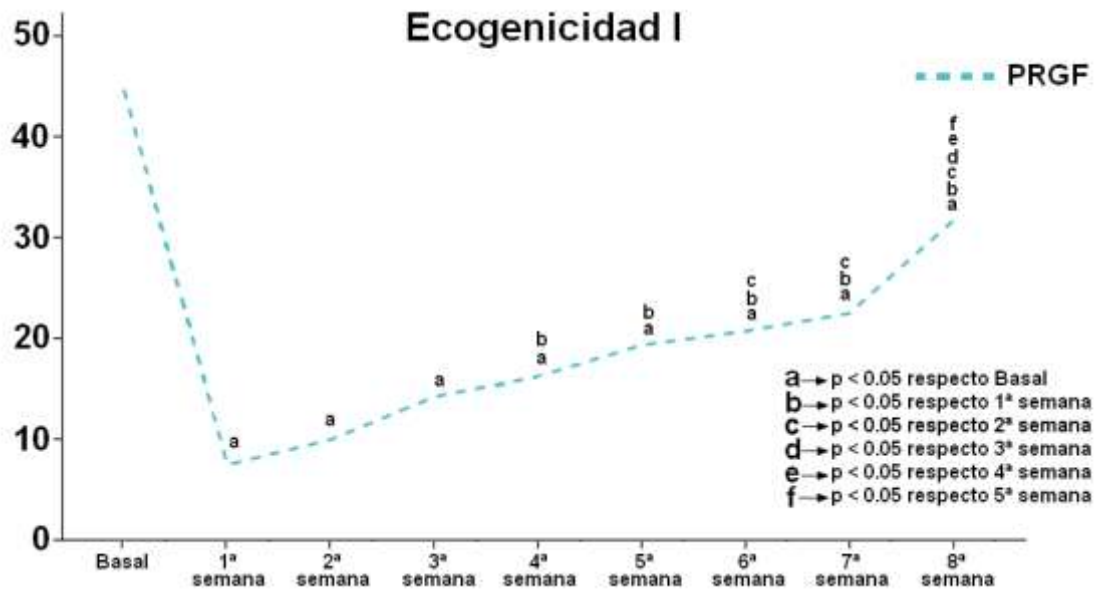


Gráfico 14. Evolución de la ecogenicidad de tipo I a lo largo del periodo de estudio en el **grupo PRGF**.



La ecogenicidad de tipo II, al igual que la de tipo I, experimentó un descenso significativo tras la cirugía en ambos grupos experimentales, registrándose los valores más bajos en el examen realizado a la 1ª semana de la cirugía. A partir de esta primera semana y hasta el final del estudio, se observó un incremento progresivo en la

ecogenicidad de tipo II. Esta evolución fue muy similar en ambos grupos experimentales, sin que se observasen diferencias significativas en ninguno de los puntos de estudio entre los animales infiltrados con PRGF y los tratados con salino. A partir de la 4ª semana en los animales infiltrados con PRGF, y la 5ª semana en los animales infiltrados con solución salina, la ecogenicidad de tipo II no manifestó diferencias significativas con respecto al valor basal (Gráfico 15, 16 y 17).

Gráfico 15. Evolución de la ecogenicidad de tipo II a lo largo del periodo de estudio.

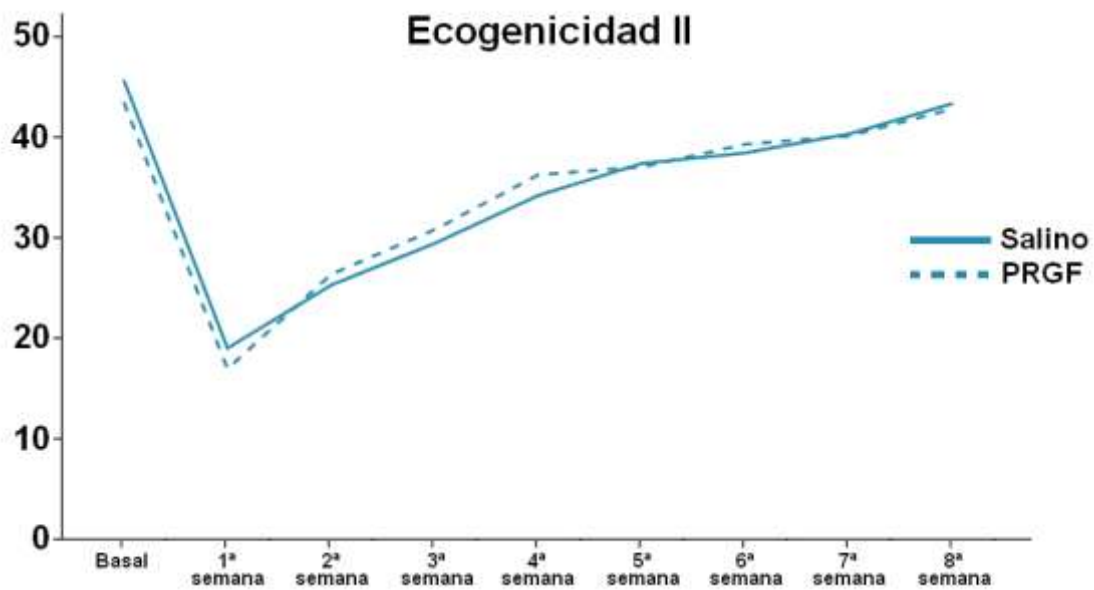


Gráfico 16. Evolución de la ecogenicidad de tipo II a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

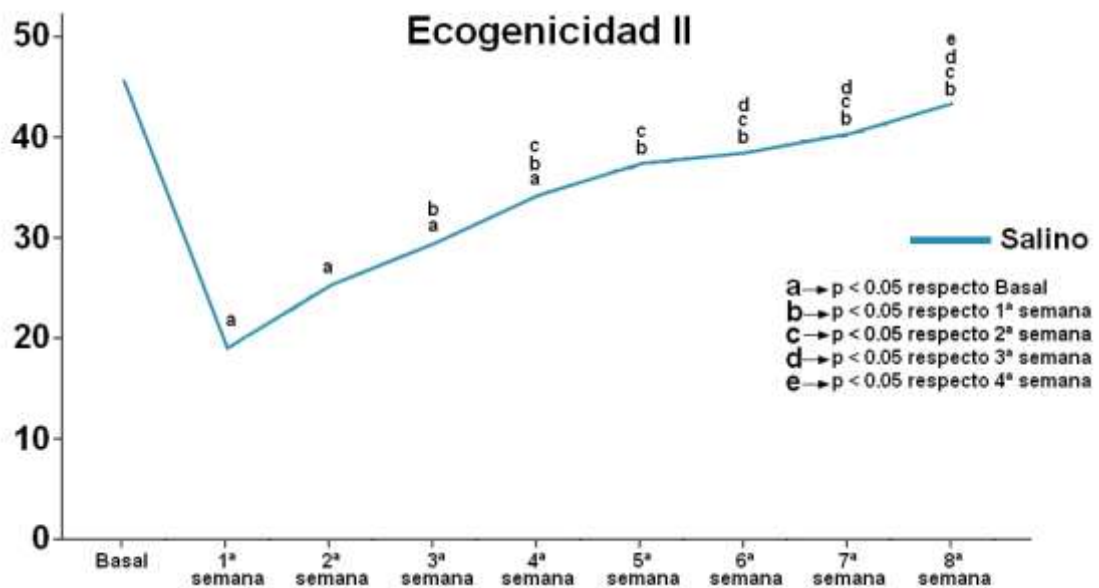
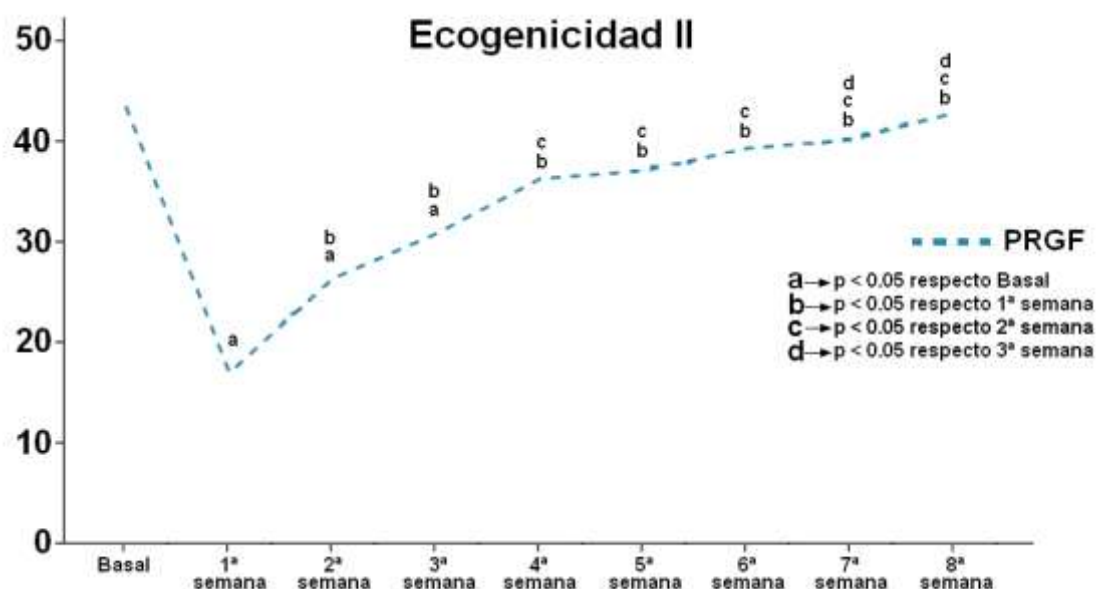


Gráfico 17. Evolución de la ecogenicidad de tipo II a lo largo del periodo de estudio en el grupo PRGF.



La ecogenicidad de tipo III (que se corresponde con la observada en áreas de hipoecoicas a anecoicas, con un rango de grises que va desde 51 – 25) y la ecogenicidad de tipo IV (que se corresponde con áreas anecoicas, con un rango de grises que va desde 24 – 0) son dos tipos de ecogenicidad que no se suele observar en el tendón sano, y son más propias del tendón patológico o en proceso de curación. La ecogenicidad de tipo III se observó en una proporción de 11.54 ± 5.27 % en el examen basal de los tendones del grupo salino, y de 11.59 ± 7.22 % en el examen basal de los tendones del grupo PRGF. La ecogenicidad de tipo IV representó menos del 0.25 % en los exámenes basales de los tendones. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales a este tiempo basal (Tabla 15).

La ecogenicidad de tipo III se incrementó de manera significativa en el primer examen ecográfico tras la cirugía en ambos grupos de estudio. En el grupo salino, la ecogenicidad de tipo III siguió incrementándose de manera ligera hasta la 3ª semana, cuando se alcanzó el pico máximo para este tipo de ecogenicidad. En el caso del grupo PRGF, el pico máximo para la ecogenicidad de tipo III se alcanzó a la 2ª semana. En el examen ecográfico llevado a cabo a la 3ª semana de la cirugía, los animales del grupo salino manifestaron una proporción significativamente mayor de áreas con ecogenicidad de tipo III que en los animales del grupo PRGF ($p = 0.02$). A partir de la 2ª semana en el grupo PRGF y de la 3ª semana en el grupo salino, se observó un descenso progresivo en

la proporción de áreas con ecogenicidad de tipo III, sin que se registrasen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales hasta la 8ª semana. En esta 8ª semana, los animales del grupo PRGF presentaron una menor proporción de áreas con ecogenicidad de tipo III que los animales infiltrados con salino ($p = 0.001$) (Gráfico 18, 19 y 20).

Gráfico 18. Evolución de la ecogenicidad de tipo III a lo largo del periodo de estudio. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

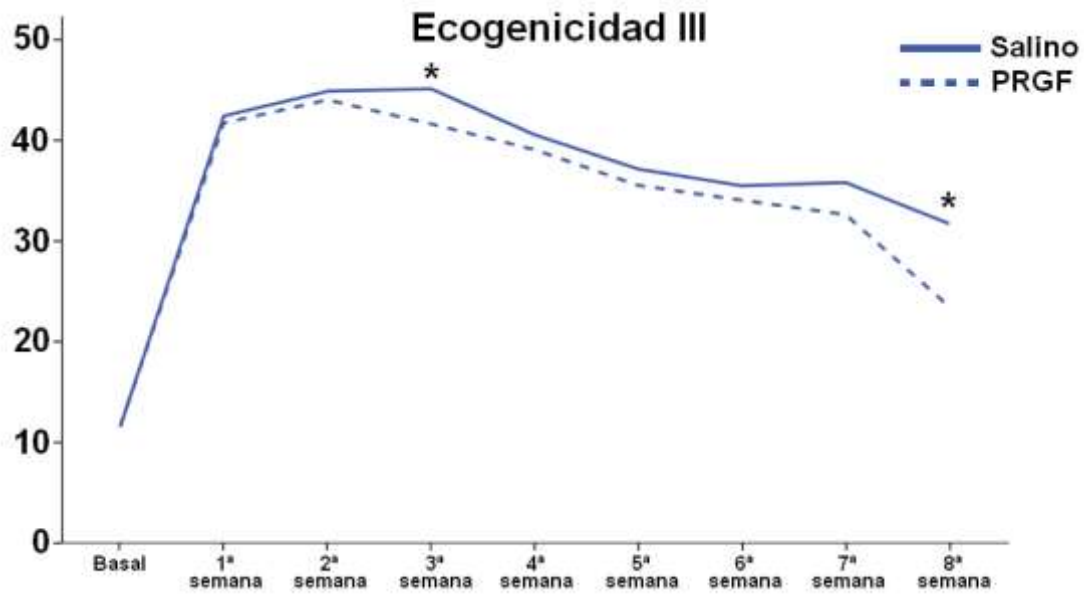


Gráfico 19. Evolución de la ecogenicidad de tipo III a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

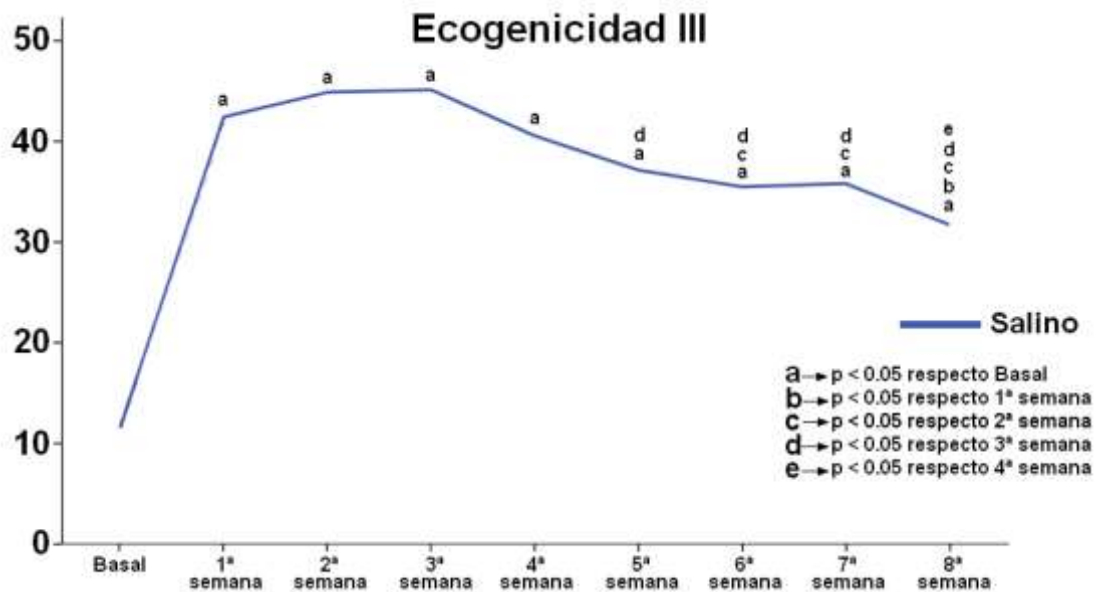
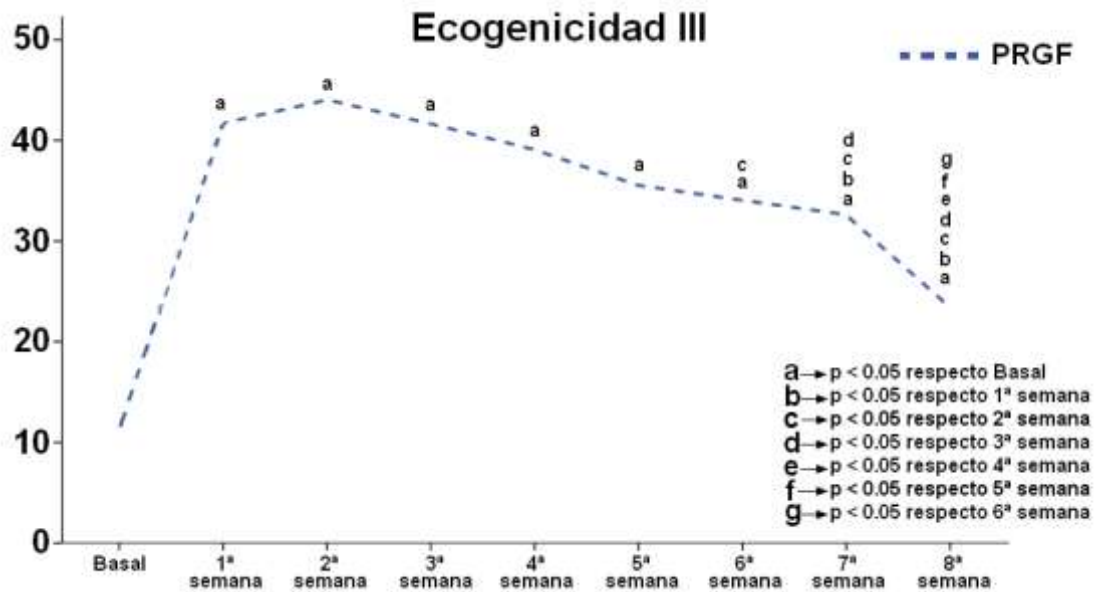


Gráfico 20. Evolución de la ecogenicidad de tipo II a lo largo del periodo de estudio en el grupo PRGF.



Con respecto a la ecogenicidad de tipo IV, al igual que ocurrió con la ecogenicidad de tipo III, se observó un brusco incremento tras la cirugía en ambos grupos experimentales, con valores máximos a la semana de la cirugía. El grupo de tendones infiltrados con PRGF presentó una mayor proporción de áreas con ecogenicidad de tipo IV que el grupo salino en este primer examen postoperatorio, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.19$). A partir de esta primera semana tras la cirugía, en ambos grupos experimentales se observó un descenso progresivo en las áreas con ecogenicidad de tipo IV, sin que se detectasen diferencias estadísticamente significativas hasta la 8ª semana. En esta 8ª semana, los animales infiltrados con PRGF presentaron una proporción significativamente menor de áreas con ecogenicidad de tipo IV que los tendones infiltrados con salino ($p = 0.005$). A partir de la 5ª semana de estudio, la proporción de áreas con ecogenicidad de tipo IV no fue estadísticamente diferente de la proporción observada en el examen basal en ninguno de los grupos experimentales (Gráfico 21, 22 y 23).

Gráfico 21. Evolución de la ecogenicidad de tipo VI a lo largo del periodo de estudio. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($p < 0.05$).

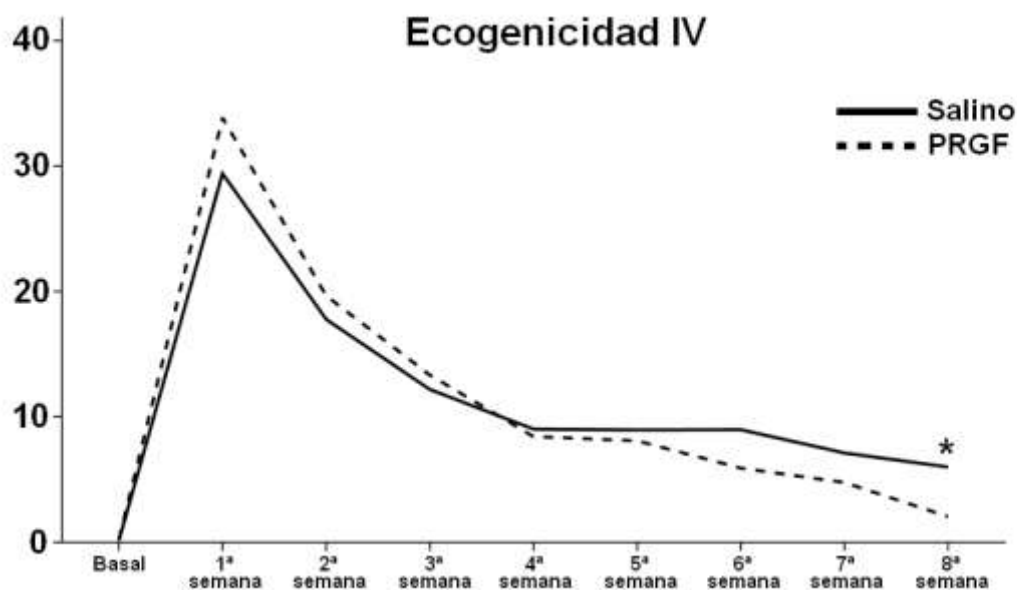


Gráfico 22. Evolución de la ecogenicidad de tipo VI a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

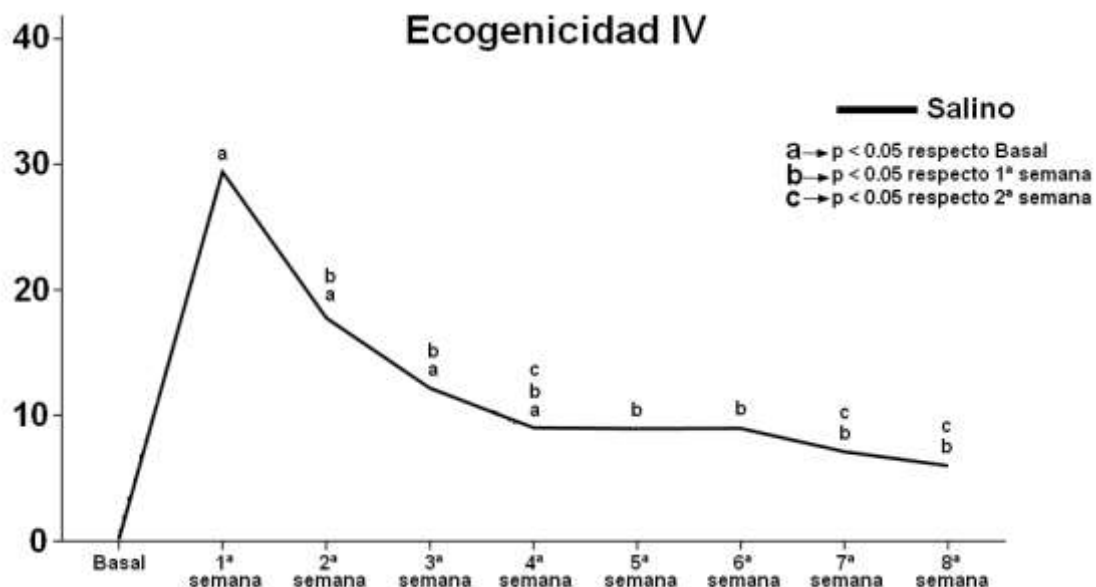
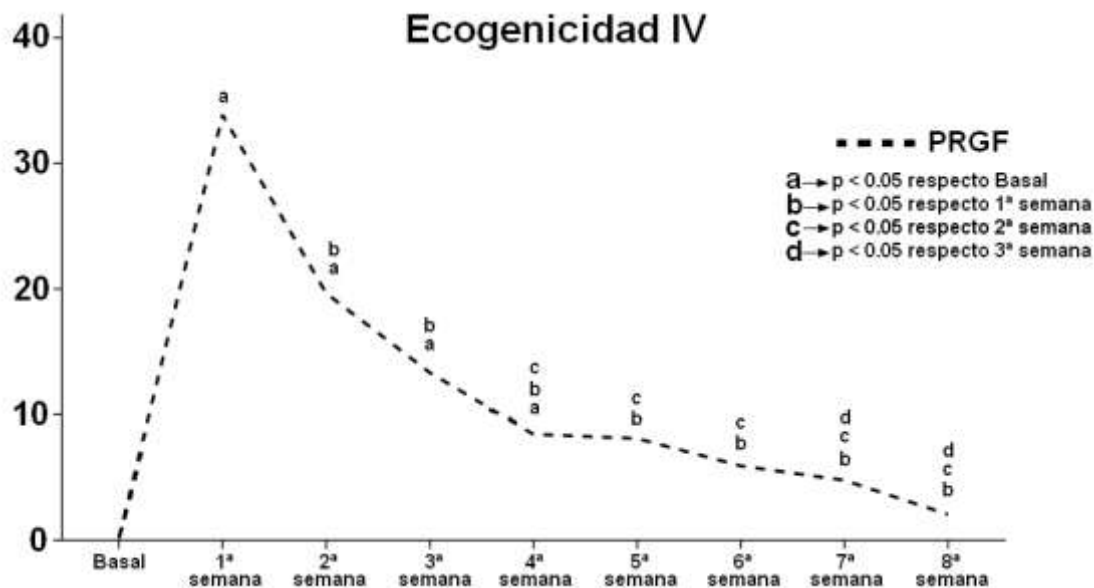


Gráfico 23. Evolución de la ecogenicidad de tipo VI a lo largo del periodo de estudio en el grupo PRGF.



3.3. Valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica

Con ayuda del programa informático Image Pro Plus[®] versión 6.0 se determinó el valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica transversal del tendón. Este parámetro podía tomar un valor comprendido entre 255 (blanco) y 0 (negro). Los datos tanto del grupo salino como del grupo PRGF en los diferentes tiempos de estudio quedan reflejados en la Tabla 16.

Tabla 16. Tabla comparativa del valor medio de la escala de grises en la imagen ecográfica del tendón de Aquiles a lo largo del estudio.

	SALINO	PRGF	P
Basal	78.07 ± 4.40	78.73 ± 6.97	0.80
1ª semana	41.42 ± 4.13	37.36 ± 4.84	0.06
2ª semana	48.07 ± 5.98	44.69 ± 5.27	0.20
3ª semana	51.39 ± 3.98	50.56 ± 4.73	0.67
4ª semana	55.43 ± 7.13	54.93 ± 4.27	0.85
5ª semana	54.58 ± 3.41	56.49 ± 3.03	0.37
6ª semana	56.87 ± 4.95	58.25 ± 6.33	0.71
7ª semana	58.55 ± 5.26	60.33 ± 4.12	0.57
8ª semana	62.29 ± 7.34	67.40 ± 4.66	0.22

El examen ecográfico llevado a cabo en la primera semana tras la cirugía mostró un descenso drástico y significativo del valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica. Este descenso fue similar en ambos grupos de estudio, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la administración del PRGF o la infiltración con salino. En los posteriores exámenes ecográficos, ambos grupos de estudio mostraron un incremento progresivo en este parámetro, sin que se detectasen diferencias significativas entre grupos en ninguno de los exámenes semanales. El valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica al final del estudio (8ª semana) fue significativamente inferior al valor obtenido en el examen basal (Gráfico 24, 25 y 26).

Gráfico 24. Evolución del valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica del tendón a lo largo del periodo de estudio.

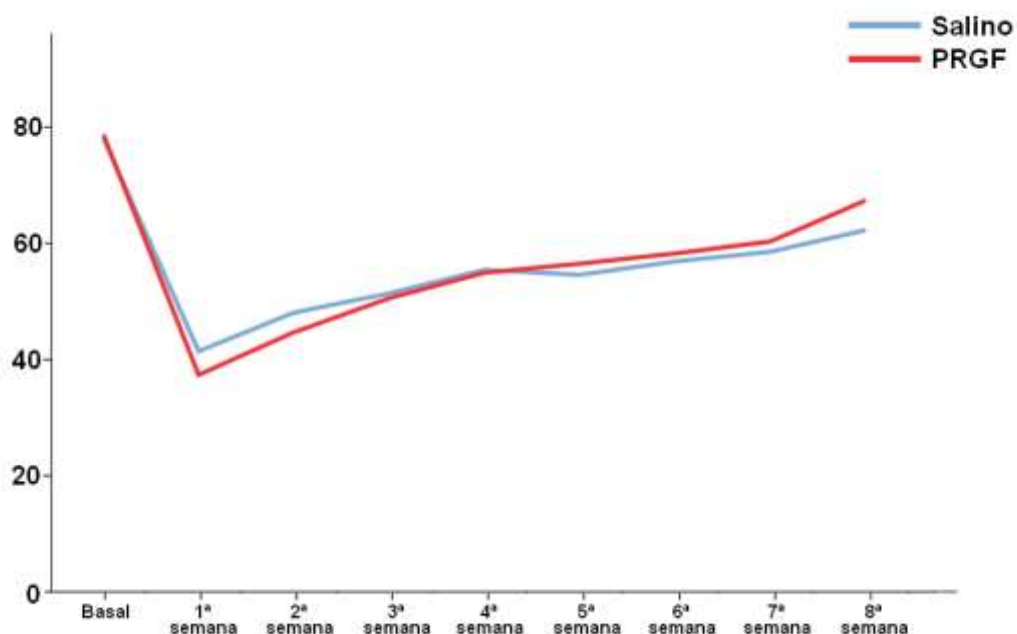


Gráfico 25. Evolución del valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica del tendón a lo largo del periodo de estudio en el **grupo Salino**.

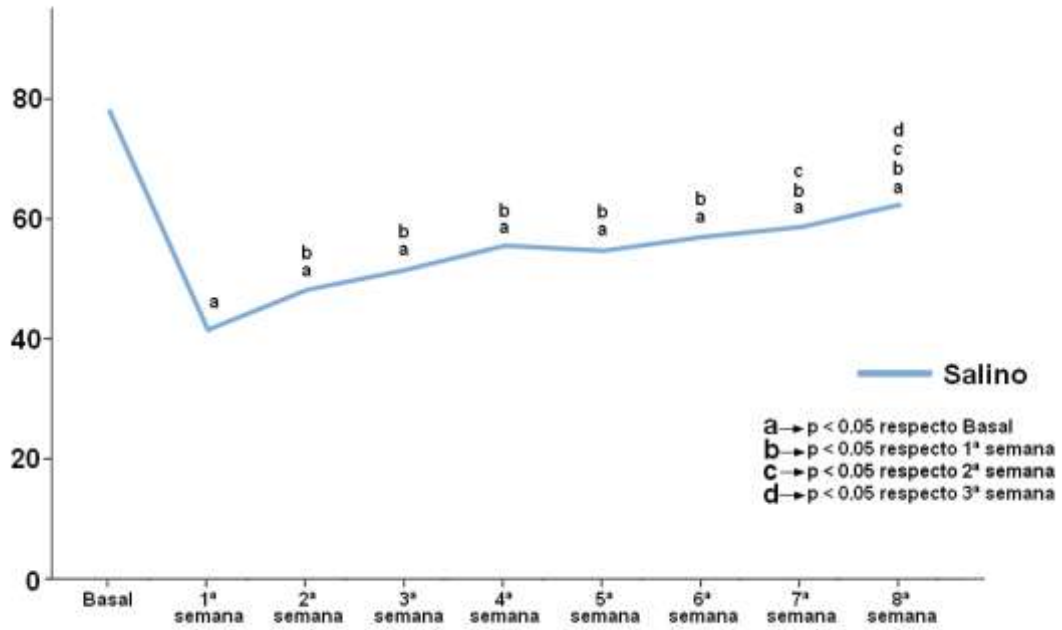
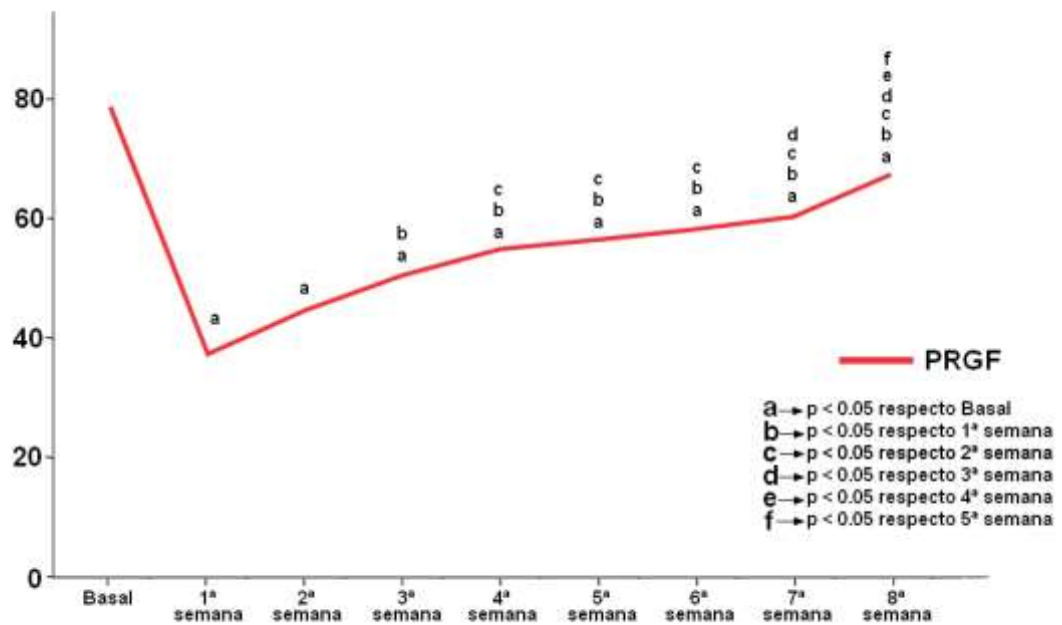


Gráfico 26. Evolución del valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica del tendón a lo largo del periodo de estudio en el **grupo PRGF**.



3.4. Diámetro del tendón de Aquiles

El diámetro del tendón de Aquiles fue determinado en la imagen ecográfica durante cada uno de los exámenes semanales. El tendón de Aquiles normal de la oveja tuvo un diámetro de 10.60 ± 0.73 mm. Tras la cirugía, el diámetro del tendón se fue incrementando progresivamente en ambos grupos de estudio de manera significativa. Tanto en el grupo de tendones tratados con PRGF como en los infiltrados con solución salina se alcanzó un diámetro máximo del tendón a las 5 semanas de la cirugía (Tabla 17). El diámetro del tendón de Aquiles en ambos grupos experimentales siguió una evolución muy parecida, y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con PRGF o salino en ninguno de los exámenes ecográficos semanales (Gráfico 27, 28 y 29).

Tabla 17. Tabla comparativa del diámetro del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del estudio, medido mediante ecografía.

	SALINO	PRGF	<i>p</i>
Basal	9.79 ± 0.66	10.33 ± 0.73	0.10
1ª semana	13.47 ± 1.09	13.78 ± 1.13	0.54
2ª semana	14.06 ± 1.44	14.30 ± 1.15	0.69
3ª semana	15.00 ± 2.13	15.55 ± 1.89	0.55
4ª semana	15.80 ± 2.11	16.85 ± 2.02	0.27
5ª semana	16.39 ± 0.96	16.93 ± 1.22	0.46
6ª semana	16.25 ± 0.22	15.65 ± 1.13	0.28
7ª semana	15.46 ± 1.24	15.51 ± 1.69	0.96
8ª semana	14.56 ± 0.87	14.90 ± 0.86	0.55

Gráfico 27. Evolución del diámetro del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio.

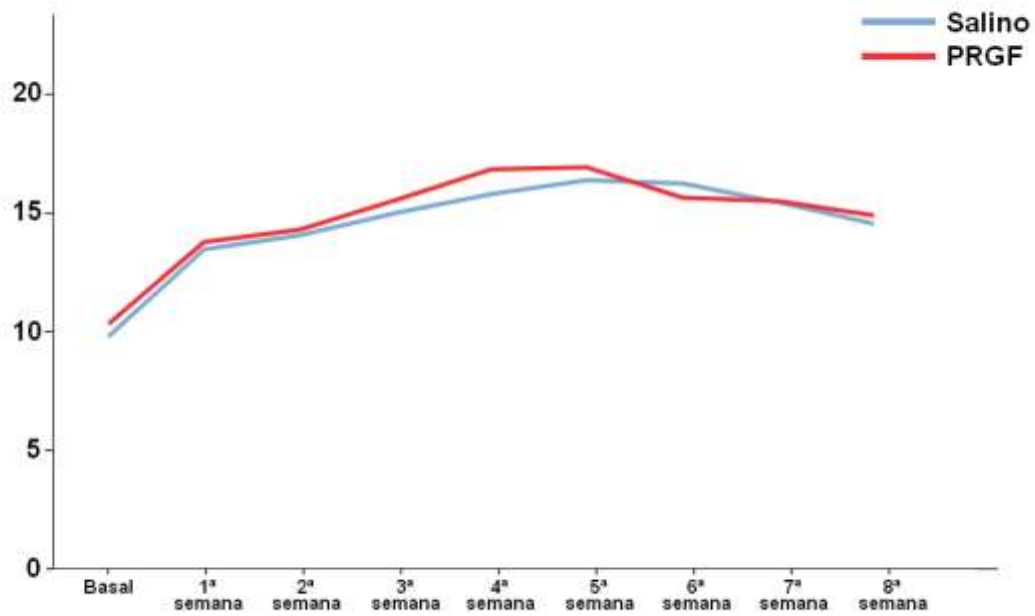


Gráfico 28. Evolución del diámetro del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio en el grupo Salino.

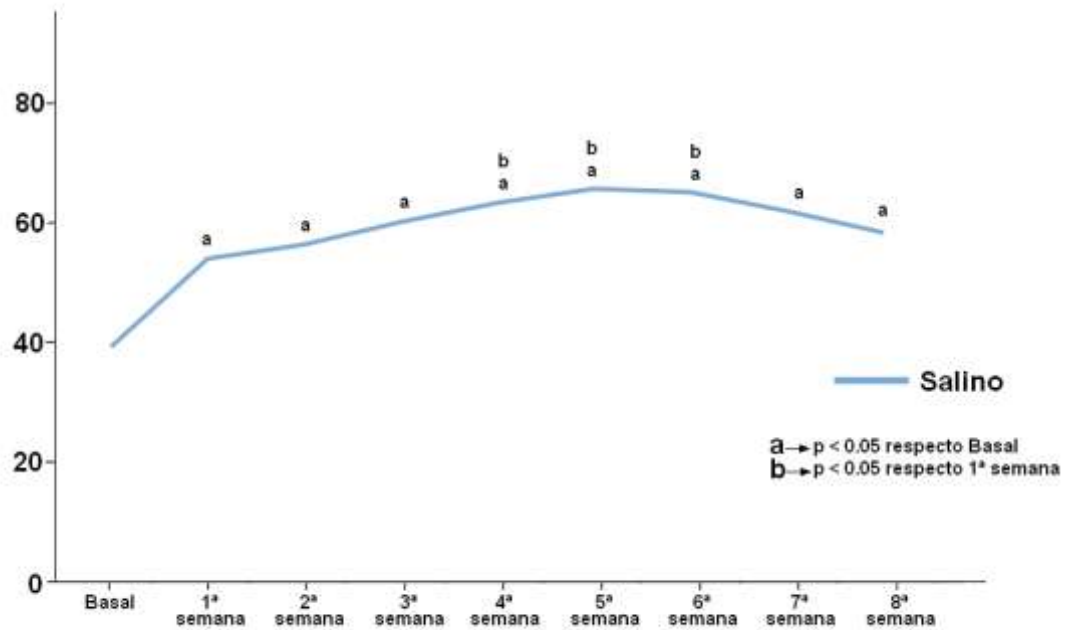
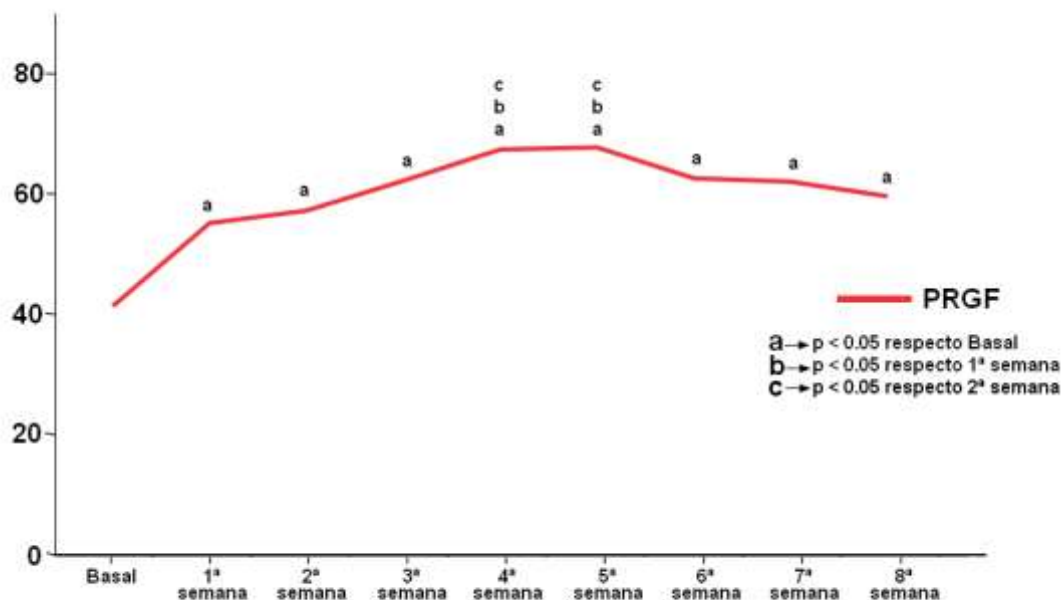


Gráfico 29. Evolución del diámetro del tendón de Aquiles (mm) a lo largo del periodo de estudio en el grupo PRGF.



3.5. Área de corte transversal de la imagen ecográfica

El área de corte transversal del tendón de Aquiles fue determinada en la imagen ecográfica durante cada uno de los exámenes semanales. En condiciones normales, el tendón de Aquiles de la oveja presentó un área de corte transversal de 81.13 ± 11.40 mm². Tras la cirugía, este parámetro, al igual que ocurría con el diámetro del tendón, se fue incrementando progresivamente en ambos grupos de estudio de manera significativa. En el grupo de animales tratados con PRGF se alcanzó un pico máximo a las 4 semanas de la cirugía, mientras que en los animales infiltrados con salino, el pico máximo se observó a las 6 semanas de la cirugía (Tabla 18). El área de corte transversal del tendón de Aquiles en ambos grupos experimentales siguió una evolución muy parecida, y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con PRGF o salino en ninguno de los exámenes ecográficos semanales (Gráfico 30, 31 y 32).

Tabla 18. Tabla comparativa del área de corte transversal del tendón de Aquiles (mm^2) a lo largo del estudio.

	SALINO	PRGF	<i>p</i>
Basal	76.83 \pm 10.10	85.43 \pm 11.46	0.09
1ª semana	146.36 \pm 22.73	153.03 \pm 24.14	0.53
2ª semana	160.03 \pm 32.20	164.39 \pm 24.38	0.74
3ª semana	183.56 \pm 54.24	195.22 \pm 46.28	0.61
4ª semana	202.18 \pm 54.38	229.77 \pm 53.05	0.27
5ª semana	215.46 \pm 24.65	228.82 \pm 34.00	0.50
6ª semana	215.64 \pm 8.47	197.85 \pm 28.55	0.22
7ª semana	192.79 \pm 31.21	196.02 \pm 41.35	0.89
8ª semana	171.68 \pm 22.22	176.51 \pm 20.21	0.73

Gráfico 30. Evolución del área de corte transversal del tendón de Aquiles (mm^2) a lo largo del periodo de estudio.

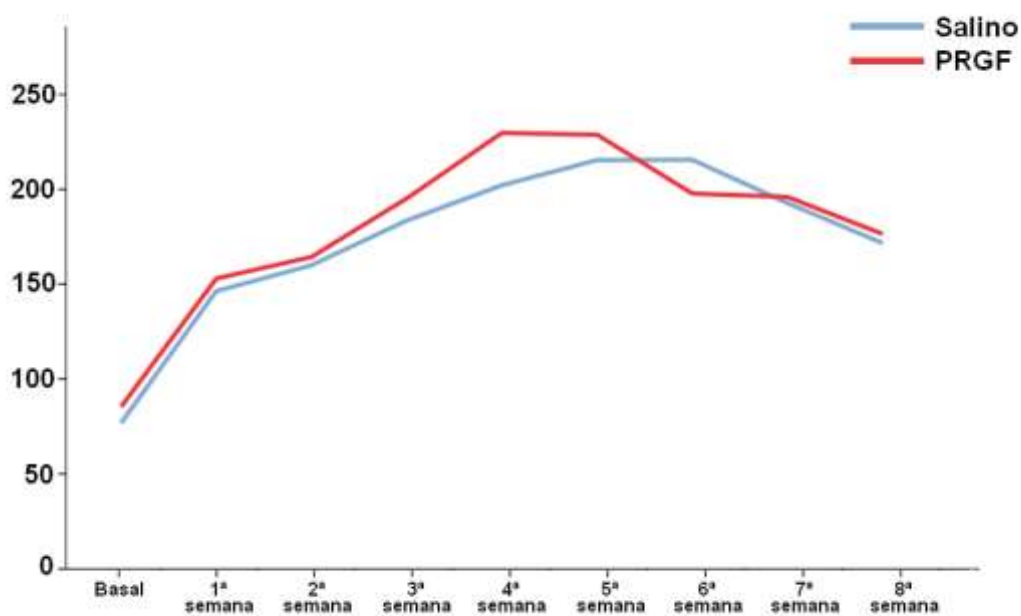


Gráfico 31. Evolución del área de corte transversal del tendón de Aquiles (mm^2) a lo largo del periodo de estudio en el **grupo Salino**.

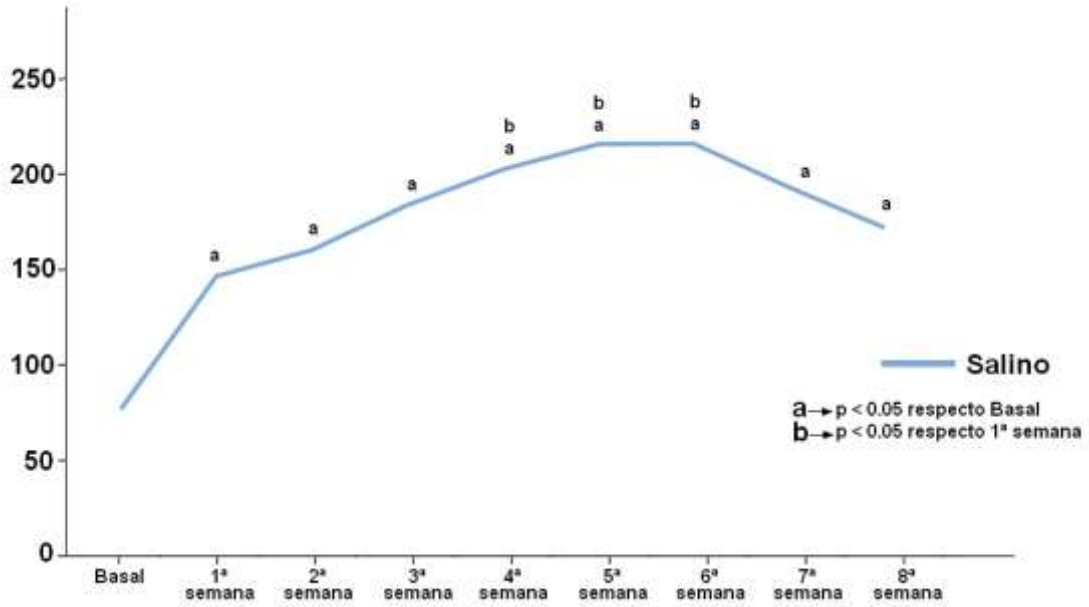
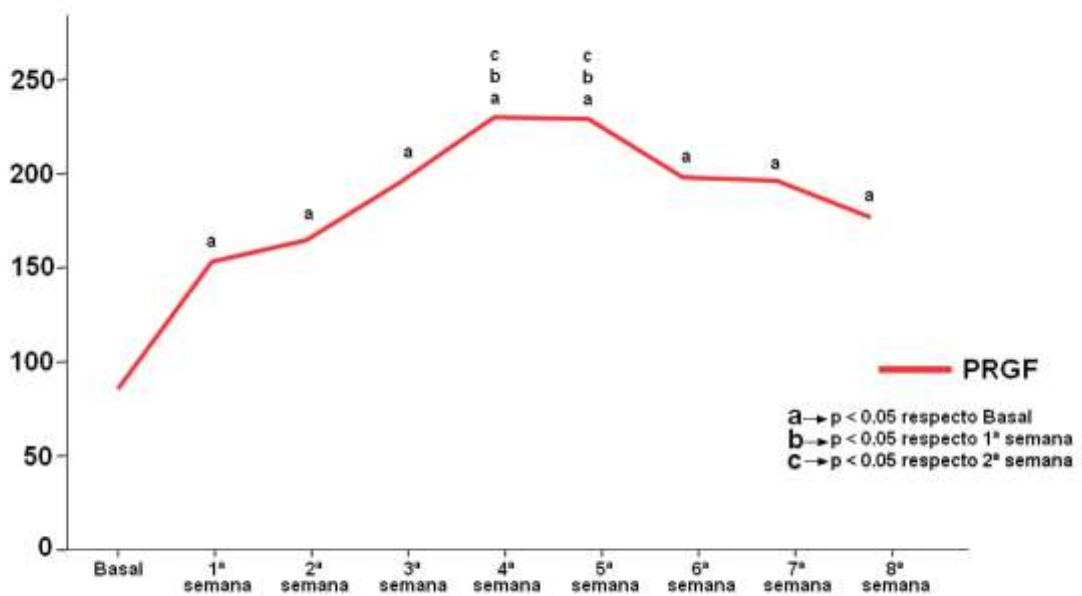


Gráfico 32. Evolución del área de corte transversal del tendón de Aquiles (mm^2) a lo largo del periodo de estudio en el **grupo PRGF**.



4. Estudio anatomopatológico del tendón de Aquiles

4.1. Evaluación macroscópica

Tras la eutanasia de los animales y la extracción de los tendones de Aquiles, se llevó a cabo una evaluación macroscópica de la zona de reparación del tendón. Esta evaluación se realizó empleando una escala de valoración semicuantitativa que consideraba las siguientes características: grado de adherencias entre la zona de reparación y los tejidos adyacentes, grosor de la zona de reparación (en comparación con el grosor del tendón contralateral), grado de unión de los bordes tendinosos, y apariencia del tejido de reparación. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 19 y en la Tabla 20.

Tabla 19. Tabla comparativa de los datos de la evaluación macroscópica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles, usando una escala de valoración semicuantitativa. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

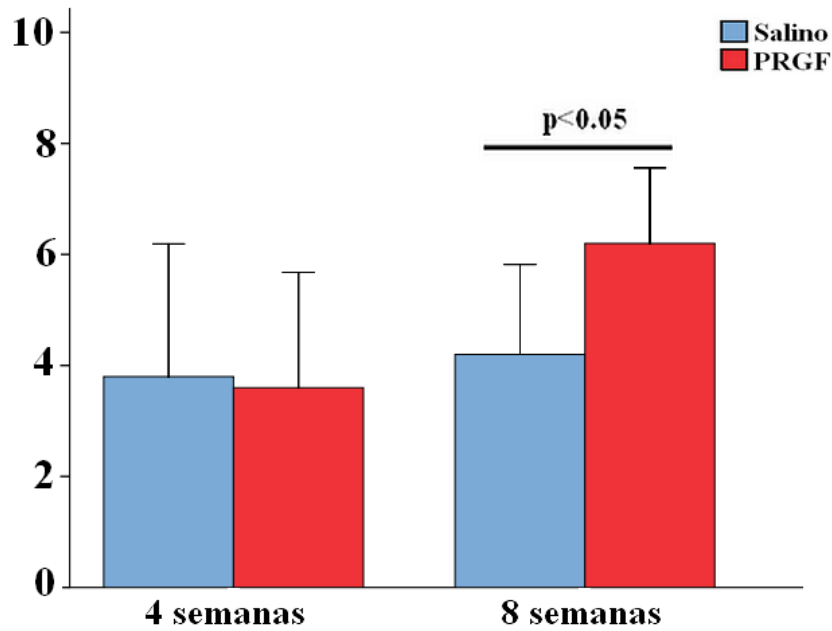
	Grado adherencias (0-3)	Grosor tendón (0-3)	Unión bordes tendinosos (0-2)	Apariencia tejido reparación (0-2)
Grupo SALINO 4 semanas	0.80 ± 0.84	0.40 ± 0.55	1.80 ± 0.45	0.80 ± 0.45
Grupo PRGF 4 semanas	0.60 ± 0.55	0.60 ± 0.55	1.80 ± 0.45	0.60 ± 0.55
<i>P</i>	0.84	0.69	1.00	0.69
Grupo SALINO 8 semanas	0.80 ± 0.84	1.20 ± 0.45	1.60 ± 0.55	0.60 ± 0.55
Grupo PRGF 8 semanas	1.40 ± 0.54	1.20 ± 0.45	2.00 ± 0.00	1.60 ± 0.55
<i>P</i>	0.31	1.00	0.31	0.05

Tabla 20. Tabla comparativa del sumatorio de los cuatro subapartados que constituyen la evaluación macroscópica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

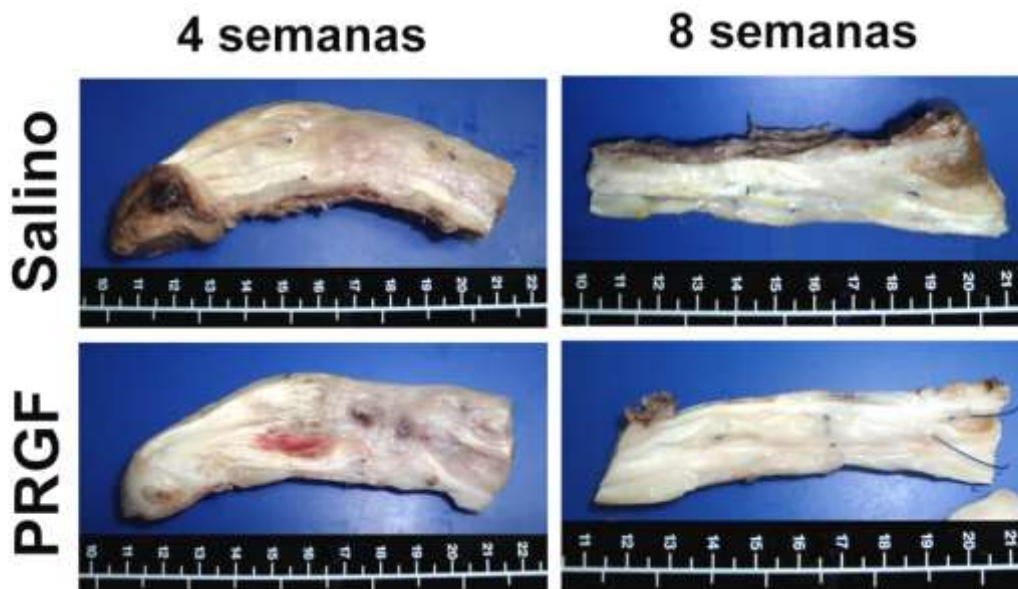
	Valoración Total Evaluación macroscópica del tendón (0-10)
Grupo SALINO 4 semanas	3.80 ± 1.92
Grupo PRGF 4 semanas	3.60 ± 1.67
<i>P</i>	0.84
Grupo SALINO 8 semanas	4.20 ± 1.30
Grupo PRGF 8 semanas	6.20 ± 1.09
<i>P</i>	0.05

El examen macroscópico de la zona de reparación tendinosa evidenció que los animales tratados con PRGF presentaban valoración total significativamente mayor que los tendones infiltrados con solución salina a las 8 semanas de la cirugía ($p = 0.05$). A las 4 semanas de la cirugía no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en esta valoración macroscópica entre los dos grupos de estudio (Gráfico 33). Si analizamos individualmente cada uno de los subapartados que constituyen esta escala de valoración macroscópica, observamos que a las 8 semanas de la cirugía los animales tratados con PRGF también manifestaron una mejoría significativa con respecto al subapartado “Apariencia del tejido de reparación” ($p = 0.05$). Sin embargo, a las 4 semanas de la cirugía no se observaron diferencias con respecto a este subapartado entre los dos grupos de estudio. Con respecto a los otros tres subapartados; “Grado de adherencias”, “Grosor del tendón” y “Unión de los bordes tendinosos”, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tendones tratados con PRGF o infiltrados con salino, ni en el grupo de animales eutanasiados a las 4 semanas, ni en el grupo sacrificado a las 8 semanas de la cirugía.

Gráfico 33. Estudio comparativo de la evaluación macroscópica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles en los diferentes grupos experimentales.



En la Figura 116 se muestran una serie de imágenes macroscópicas representativas de los tendones de Aquiles de cada uno de los grupos experimentales:



4.2. Exámenes microscópicos mediante técnicas histoquímicas

La zona de reparación tendinosa fue evaluada histológicamente mediante la tinción histoquímica Hematoxilina-Eosina y con la técnica Tricrómico de Masson, tal y como se ha descrito en la sección “Material y Método”. En los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina se evaluaron los siguientes parámetros: morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, respuesta vascular, e infiltración inflamatoria. La tinción con la técnica Tricrómico de Masson se empleó para evaluar la organización de las fibras de colágeno (grado de compactación y orientación de las fibras de colágeno).

4.2.1. Morfometría del núcleo de los fibroblastos

Con ayuda del programa informático Image Pro Plus[®] versión 6.0 se determinaron los siguientes parámetros relacionados con la morfometría del núcleo de los fibroblastos: Aspecto nuclear, Orientación nuclear, Eje mayor, Eje menor, Factor forma, Área, y Perímetro.

Los resultados de la morfometría del núcleo de los fibroblastos en cada uno de los grupos experimentales se muestran en la Tabla 21 (para los animales eutanasiados a las 4 semanas de la cirugía), y en la Tabla 22 (para los animales eutanasiados a las 8 semanas de la cirugía).

Tabla 21. Tabla comparativa de los datos morfométricos de los núcleos de los fibroblastos en los animales eutanasiados a las 4 semanas.

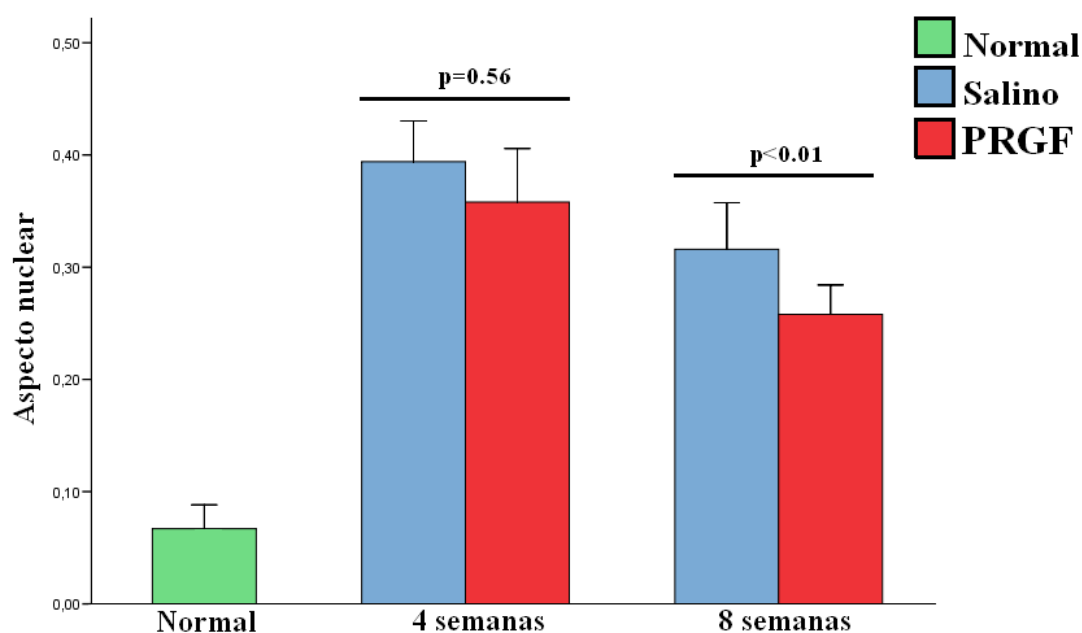
	Normal	Grupo SALINO 4 semanas	Grupo PRGF 4 semanas	P
Aspecto Nuclear	0.07 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.056
Orientación nuclear (°)	2.74 ± 0.90	15.96 ± 2.80	12.32 ± 1.10	0.095
Eje mayor (µm)	31.11 ± 4.16	11.53 ± 0.98	12.37 ± 0.41	0.22
Eje menor (µm)	1.93 ± 0.28	4.06 ± 0.33	4.05 ± 0.16	1.00
Factor Forma	7.44 ± 0.84	1.71 ± 0.05	1.76 ± 0.06	0.22
Área (µm²)	44.80 ± 11.92	36.53 ± 6.05	38.95 ± 2.55	0.55
Perímetro (µm)	62.35 ± 7.64	27.32 ± 2.22	28.79 ± 0.90	0.42

Tabla 22. Tabla comparativa de los datos morfométricos de los núcleos de los fibroblastos en los animales eutanasiados a las 8 semanas. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	Normal	Grupo SALINO 8 semanas	Grupo PRGF 8 semanas	P
Aspecto Nuclear	0.07 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.008
Orientación nuclear (°)	2.74 ± 0.90	12.23 ± 1.70	9.25 ± 0.90	0.016
Eje mayor (µm)	31.11 ± 4.16	13.00 ± 0.33	14.55 ± 0.56	0.008
Eje menor (µm)	1.93 ± 0.28	3.69 ± 0.22	3.40 ± 0.07	0.056
Factor Forma	7.44 ± 0.84	2.02 ± 0.11	2.34 ± 0.07	0.008
Área (µm²)	44.80 ± 11.92	36.55 ± 2.54	37.55 ± 2.01	0.69
Perímetro (µm)	62.35 ± 7.64	29.79 ± 0.76	32.41 ± 1.05	0.008

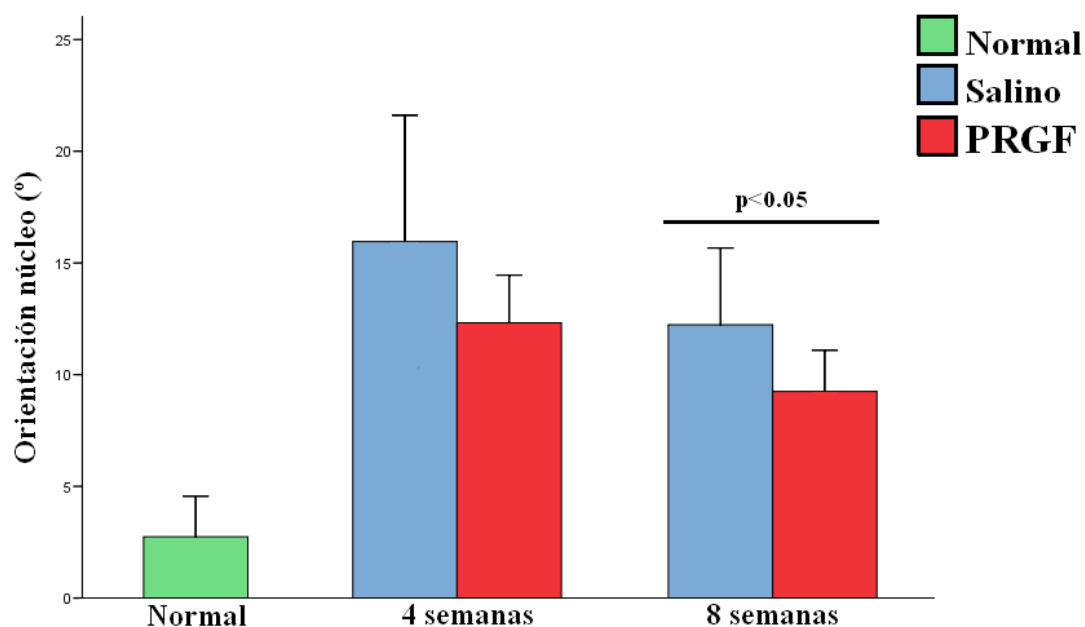
El aspecto nuclear de los fibroblastos (relación existente entre eje menor y eje mayor del núcleo del fibroblasto) en el tendón normal fue 0.07 ± 0.01 , lo que nos indica una morfología fusiforme y alargada. Tras la cirugía, este parámetro se incrementó significativamente en todos los grupos de estudio. A las 4 semanas de la cirugía, los núcleos de los fibroblastos de los tendones que habían sido tratados con PRGF presentaron un menor valor de aspecto nuclear que los tendones infiltrados con solución salina ($p = 0.056$). En los grupos de animales eutanasiados a las 8 semanas se observó que los tendones tratados con PRGF presentaron un aspecto nuclear significativamente menor que los tendones del grupo salino ($p = 0.008$) (Gráfico 34). Esto nos indicaba que a las 8 semanas los núcleos de los fibroblastos de los tendones tratados con PRGF presentaban una morfología más alargada y fusiforme, y por tanto más parecida a la que se observaba en el tendón normal.

Gráfico 34. Aspecto nuclear de los fibroblastos del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



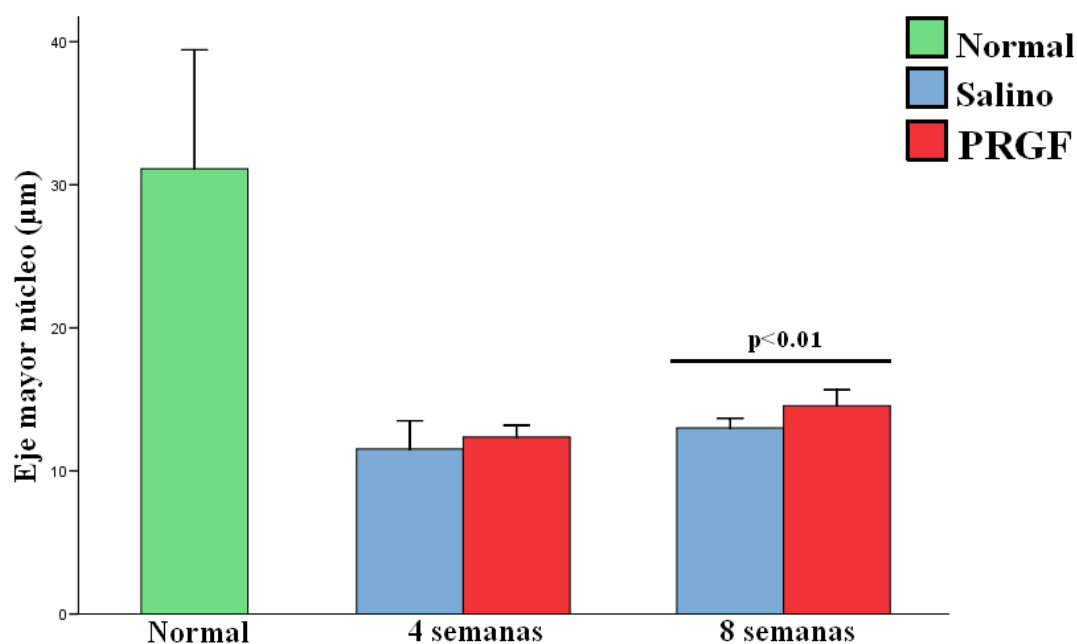
La orientación nuclear de los fibroblastos (ángulo entre el eje mayor del núcleo del fibroblasto y el eje longitudinal del tendón) en el tendón normal fue $2.74 \pm 0.90^\circ$, lo que nos indicaba que el núcleo de fibroblasto estaba prácticamente alineado con el eje longitudinal del tendón. De manera similar a lo observado con respecto al aspecto nuclear, tras la cirugía se incrementó de manera significativa el valor de la orientación nuclear en todos los grupos de estudio. En los animales eutanasiados a las 4 semanas, el valor de orientación nuclear fue menor en los tendones tratados con PRGF, pero no se alcanzaron diferencias significativas con respecto a los tendones del grupo salino ($p = 0.095$). Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía, los tendones infiltrados con PRGF presentaron un valor de orientación nuclear significativamente menor que los tendones del grupo salino ($p = 0.016$), lo que nos indicaba que a este tiempo los núcleos de los fibroblastos en los tendones tratados con PRGF presentaban una mejor orientación con respecto al eje longitudinal del tendón (Gráfico 35).

Gráfico 35. Orientación nuclear de los fibroblastos ($^\circ$) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



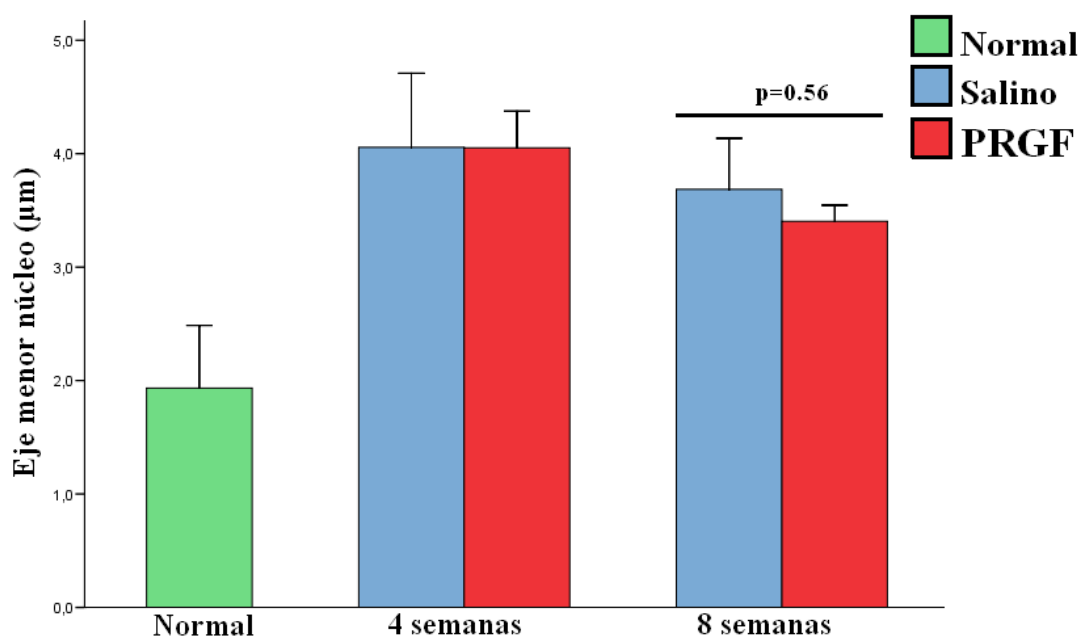
El núcleo de los fibroblastos de los tendones normales presentó un eje mayor de $31.11 \pm 4.16 \mu\text{m}$. Tras la cirugía, esta longitud disminuyó de manera significativa en todos los grupos de estudio. A las 4 semanas de la cirugía, los núcleos de los fibroblastos de los tendones del grupo PRGF presentaron un eje mayor ligeramente mayor que el observado en el grupo salino, sin que se observasen diferencias significativas ($p = 0.22$). A las 8 semanas de la cirugía esta diferencia se incrementó, de modo que se observó un eje mayor significativamente mayor en los núcleos de los fibroblastos de los tendones que habían sido infiltrados con PRGF en comparación con los tendones del grupo salino ($p = 0.008$) (Gráfico 36).

Gráfico 36. Eje mayor del núcleo de los fibroblastos (μm) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



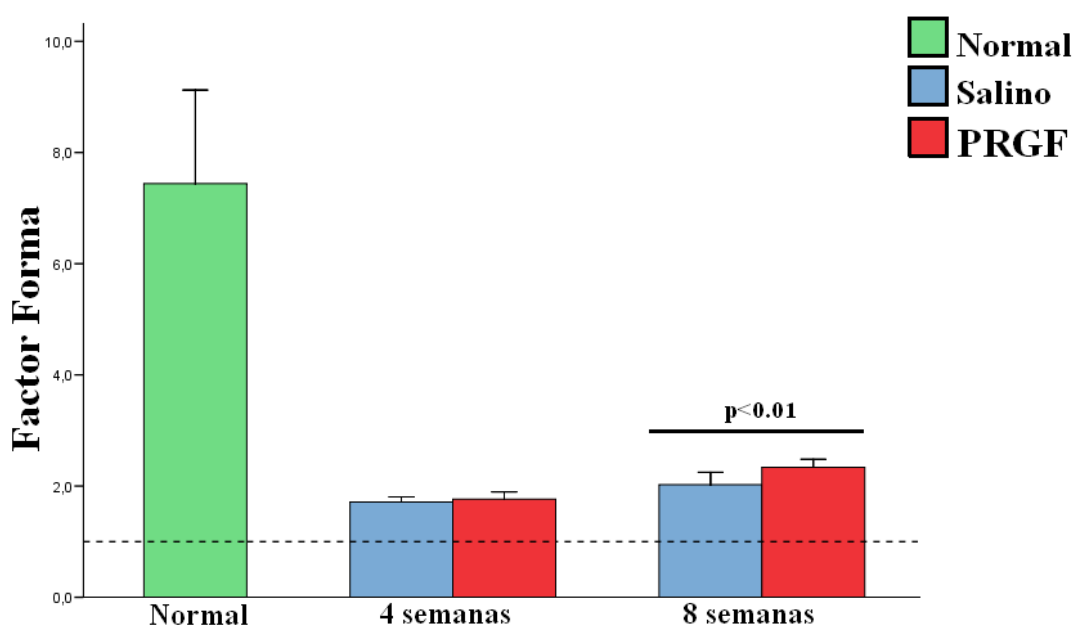
El núcleo de los fibroblastos de los tendones normales presentó un eje menor de $1.93 \pm 0.28 \mu\text{m}$. Tras la cirugía, al contrario de lo observado con respecto al eje mayor, el eje menor se incrementó de manera significativa en todos los grupos de estudio. A las 4 semanas de la cirugía, los núcleos de los fibroblastos de los tendones del grupo PRGF y del grupo salino presentaron un eje menor muy similar, sin que se observasen diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía en los núcleos de los fibroblastos de los tendones que habían sido infiltrados con PRGF se observó un eje menor más pequeño que en los tendones del grupo salino, aunque tampoco se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p = 0.056$) (Gráfico 37).

Gráfico 37. Eje menor del núcleo de los fibroblastos (μm) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



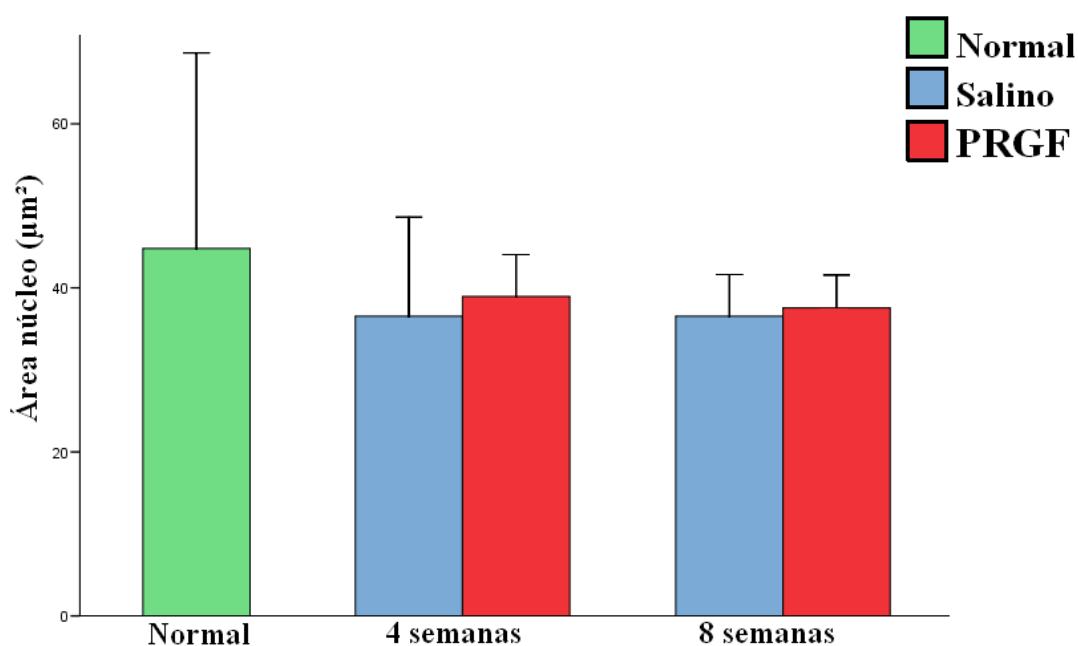
El factor forma (o redondez) es un parámetro morfométrico que nos indica como de parecida era la forma de un determinado objeto con respecto a un círculo. Cuanto más cercano a 1.00 sea este valor, más parecida será la forma de un objeto a un círculo. Los núcleos de los fibroblastos en los tendones normales mostraron un factor forma de 7.44 ± 0.84 , lo que nos indica una morfología alejada de la forma circular. En todos los grupos experimentales se observó un descenso significativo de este parámetro tras la cirugía. A las 4 semanas de la cirugía, el factor forma en los núcleos de los fibroblastos de los tendones del grupo PRGF y del grupo salino fue muy similar, sin que se observasen diferencias significativas entre ellos. A las 8 semanas sin embargo, los núcleos de los fibroblastos en los tendones tratados con PRGF presentaron un factor forma significativamente mayor que en los tendones del grupo salino ($p = 0.008$). Esto nos indicaba que la morfología del núcleo de estos fibroblastos expuestos al PRGF presentaba una morfología alejada de la forma circular, que es lo que se observó en los fibroblastos del tendón normal (Gráfico 38).

Gráfico 38. Factor forma del núcleo de los fibroblastos del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio. La línea discontinua indica el valor 1.00 (forma circular).



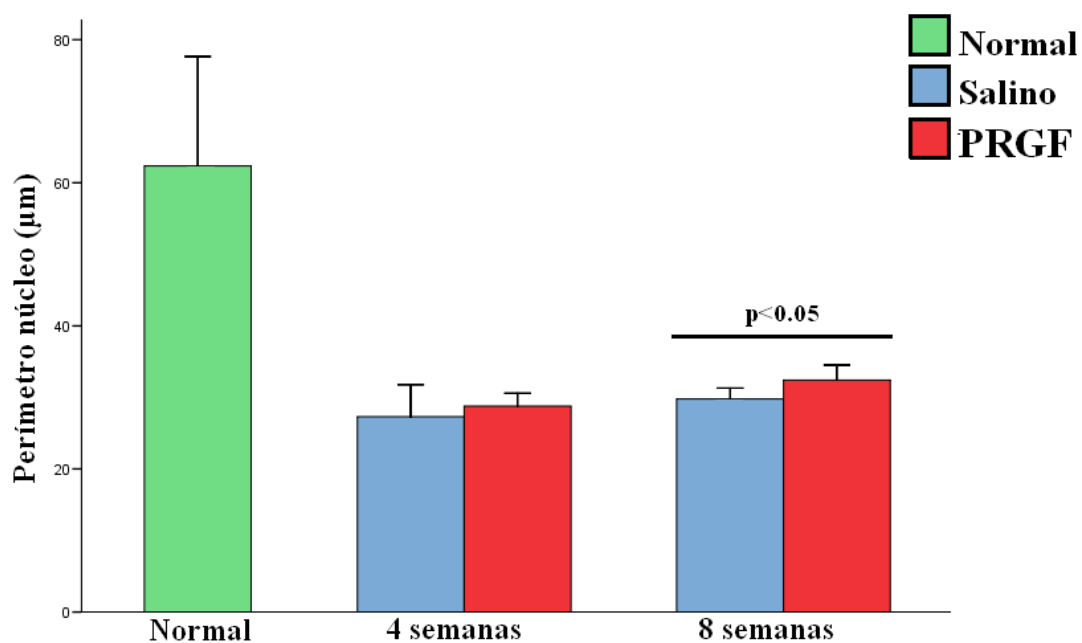
El área del núcleo de los fibroblastos en el tendón de Aquiles normal de la oveja fue $44.80 \pm 11.92 \mu\text{m}^2$. Este parámetro experimentó un ligero descenso en todos los grupos de estudio tras la cirugía, pero este descenso no resultó ser estadísticamente significativo. A las 4 semanas de la cirugía, tanto los núcleos de los fibroblastos el grupo PRGF como el grupo salino presentaron un área similar, sin que se detectasen diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. A las 8 semanas se observó algo similar, y tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el área del núcleo de los fibroblastos de ambos grupos experimentales (Gráfico 39).

Gráfico 39. Área del núcleo de los fibroblastos (μm^2) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



El perímetro del núcleo de los fibroblastos en los tendones normales fue $62.35 \pm 7.64 \mu\text{m}$. Tras la cirugía se observó un descenso estadísticamente significativo de este parámetro morfométrico en todos los grupos de estudio. En los animales eutanasiados a las 4 semanas, el perímetro del núcleo de los fibroblastos de los tendones tratados con PRGF fue similar al de los tendones infiltrados con solución salina, y no se observaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía en los núcleos de los fibroblastos de los tendones que habían sido infiltrados con PRGF se observó un perímetro significativamente mayor que en los tendones del grupo salino ($p = 0.008$) (Gráfico 37).

Gráfico 40. Perímetro del núcleo de los fibroblastos (μm) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



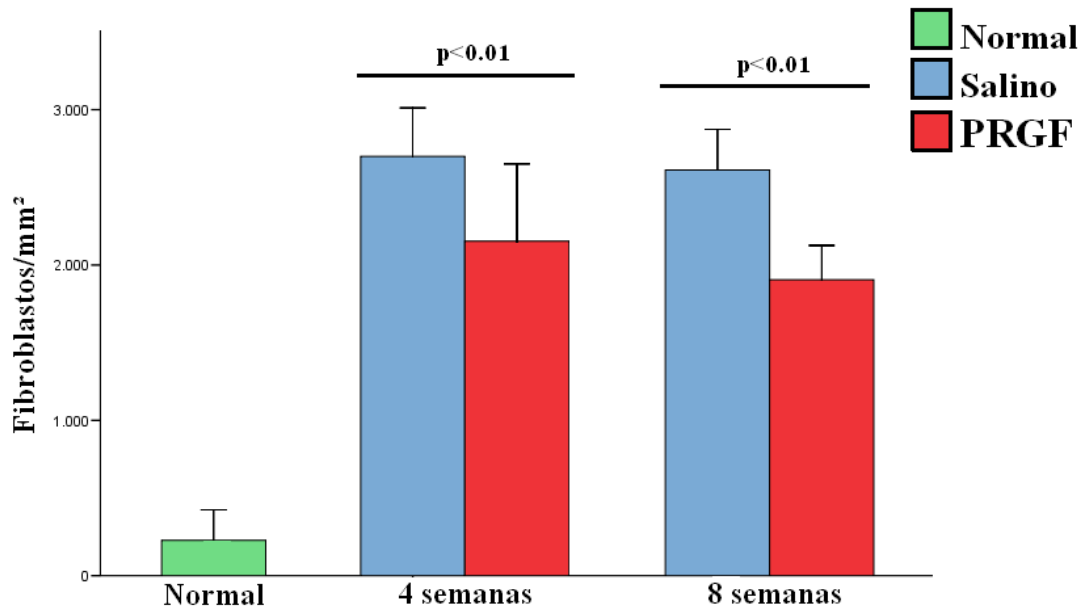
4.2.2. Densidad de fibroblastos

El tendón es un tejido con una baja celularidad en condiciones normales, y en los tendones de Aquiles sanos se observó una densidad de fibroblastos de 227.78 ± 97.81 fibroblastos/mm². Tras la creación del daño quirúrgico en el tendón, en todos los grupos experimentales se observó un incremento significativo en la densidad de fibroblastos, que llegaba incluso a ser 10 veces superior a la densidad basal (Tabla 23). A las 4 semanas de la cirugía se observó que en los tendones infiltrados con PRGF existía un descenso estadísticamente significativo de la densidad de fibroblastos en comparación con los tendones del grupo salino a este mismo tiempo ($p = 0.008$). Este mismo hallazgo se encontró de nuevo en los tendones de los animales sacrificados a las 8 semanas de la cirugía, de modo que a este tiempo más avanzado los tendones infiltrados con PRGF seguían presentando una densidad de fibroblastos significativamente menor que los tendones del grupo salino ($p = 0.008$) (Gráfico 41).

Tabla 23. Tabla comparativa de los datos de la densidad de fibroblastos (fibroblastos/mm²) en los diferentes grupos de estudio. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	Densidad Fibroblastos (fibroblastos/mm ²)
NORMAL	227.78 ± 97.81
Grupo SALINO 4 semanas	2699.08 ± 156.45
Grupo PRGF 4 semanas	2153.70 ± 248.61
<i>P</i>	0.008
Grupo SALINO 8 semanas	2612.04 ± 130.59
Grupo PRGF 8 semanas	1905.55 ± 110.17
<i>P</i>	0.008

Gráfico 41. Densidad de fibroblastos (fibroblastos/mm²) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



En la imagen 117 se presentan una serie de imágenes microscópicas para ilustrar la densidad de fibroblastos de cada uno de los grupos de estudio.

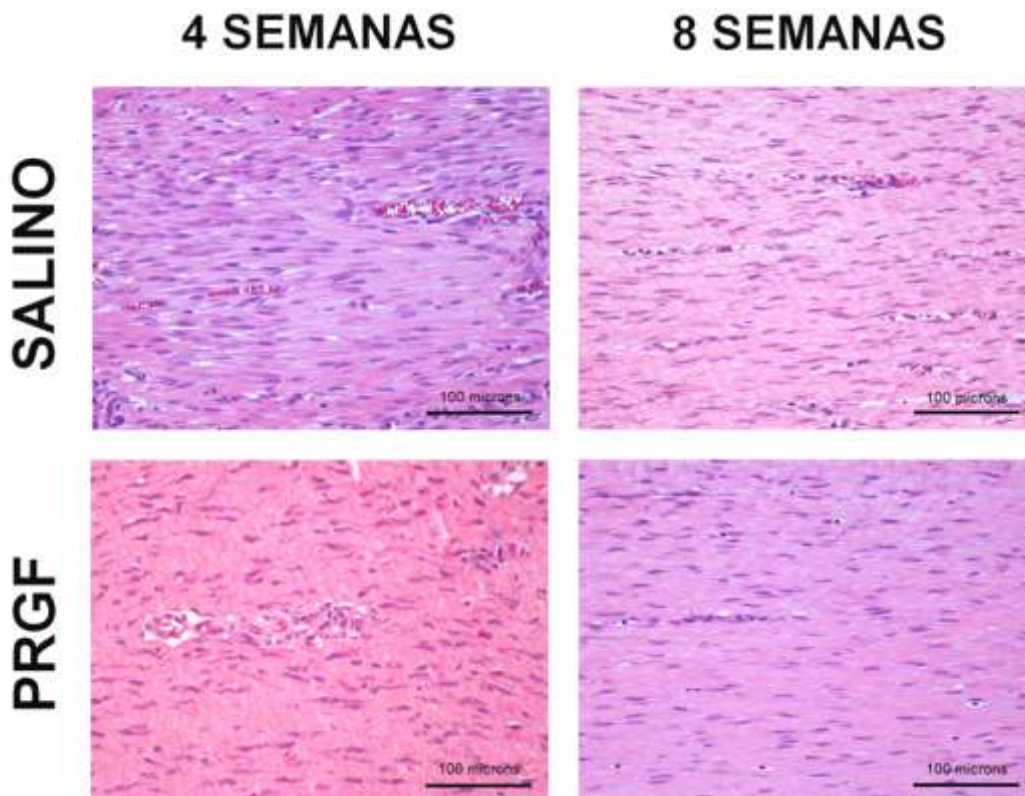


Fig. 117. Imágenes representativas de la densidad de fibroblastos en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x200. Tinción Hematoxilina-Eosina. Barra = 100 µm.

4.2.3. Respuesta vascular

Con respecto a la respuesta vascular en el área de cicatrización del tendón se evaluaron dos parámetros desde el punto de vista histopatológico: densidad vascular y diámetro de los vasos sanguíneos. Ambos parámetros fueron cuantificados con ayuda del programa informático de análisis de la imagen microscópica Image Pro Plus® versión 6.0. Los datos de densidad vascular y diámetro de los vasos sanguíneos obtenidos tras el análisis histológico de las muestras de los diferentes grupos experimentales quedan reflejados en la Tabla 24.

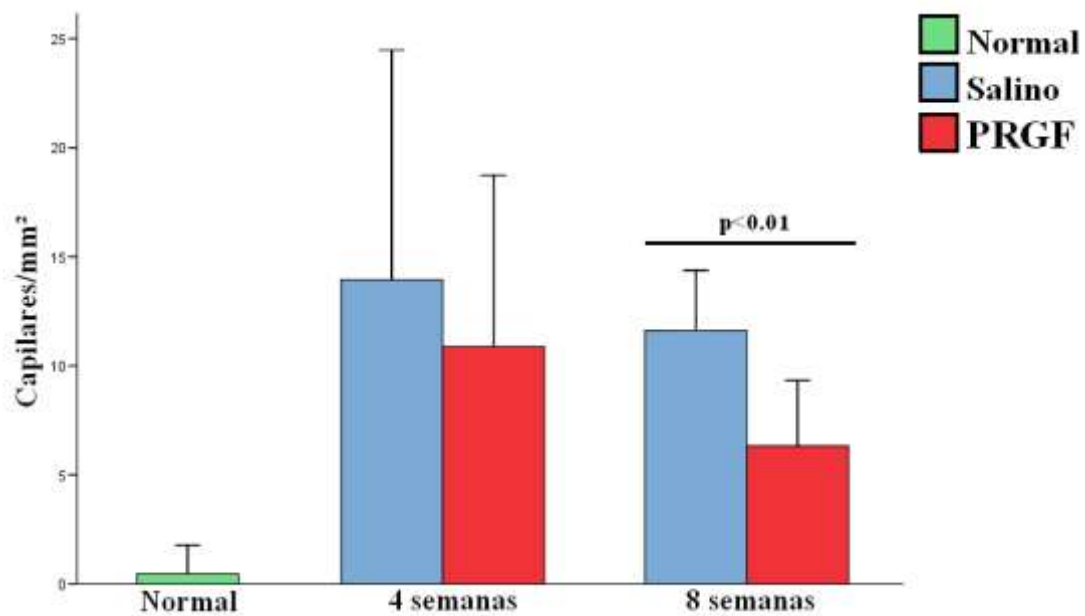
Tabla 24. Tabla comparativa de los datos de la densidad vascular (vasos sanguíneos/mm²) y del diámetro de los capilares sanguíneos en los diferentes grupos de estudio. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	Densidad Vascular (capilares/mm ²)	Diámetro capilares (μm)
NORMAL	0.47 ± 0.66	5.50 ± 1.13
Grupo SALINO 4 semanas	13.95 ± 5.26	14.05 ± 1.58
Grupo PRGF 4 semanas	10.88 ± 3.92	15.88 ± 3.93
<i>P</i>	0.421	0.55
Grupo SALINO 8 semanas	11.62 ± 1.37	11.78 ± 1.29
Grupo PRGF 8 semanas	6.39 ± 1.50	9.59 ± 1.01
<i>P</i>	0.008	0.03

El tendón es un tejido que, en condiciones normales, presenta una baja vascularización. En nuestro estudio hemos determinado que la densidad de vasos sanguíneos en el tendón normal es 0.47 ± 0.66 capilares/mm². Tras la tenotomía, y posterior reparación quirúrgica, la densidad vascular se incrementó de manera notable y significativa en todos los grupos de estudio, alcanzándose niveles incluso por encima de

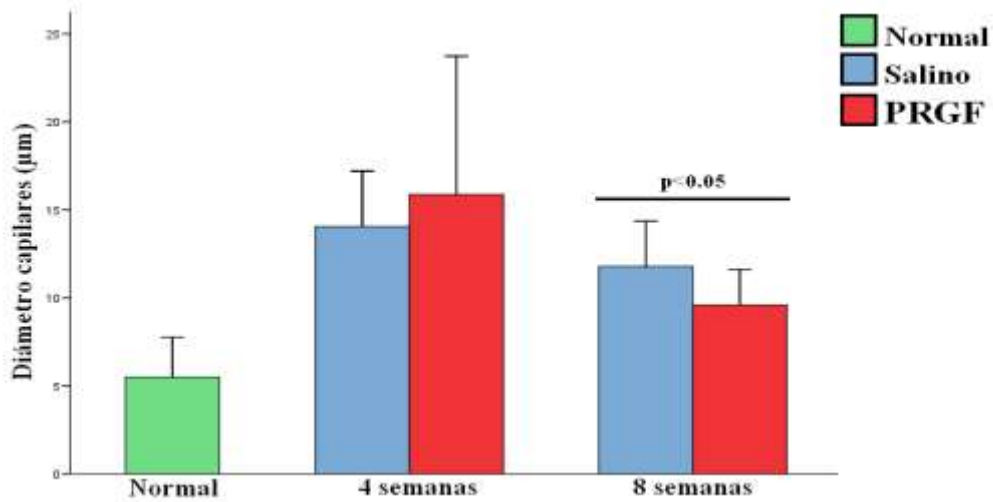
las 20 veces en comparación con los tendones normales (Tabla 24). Cuatro semanas después de la cirugía, los tendones de los animales del grupo PRGF presentaron una menor densidad vascular, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa con respecto a los tendones infiltrados con solución salina en este momento de estudio ($p = 0.42$). Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía, la densidad de capilares sanguíneos de los tendones infiltrados con PRGF alcanzó ya niveles significativamente inferiores a la densidad vascular observada en los tendones del grupo salino ($p = 0.008$) (Gráfico 42).

Gráfico 42. Densidad vascular (capilares/mm²) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



El diámetro medio de los escasos vasos sanguíneos observados en los tendones sanos fue $5.50 \pm 1.13 \mu\text{m}$. Tras la cirugía, el diámetro de los vasos sanguíneos tendió a incrementarse en todos los grupos experimentales. A las cuatro semanas de la cirugía el diámetro medio de los vasos sanguíneos de los tendones infiltrados con PRGF fue mayor que el diámetro de los tendones del grupo salino, si bien esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0.55$). A las 8 semanas de la cirugía se observó un importante descenso en el diámetro de los vasos sanguíneos en los tendones infiltrados con PRGF, e incluso se observó un diámetro significativamente menor que el existente en los tendones del grupo salino ($p = 0.03$) (Gráfico 43).

Gráfico 43. Diámetro de los capilares sanguíneos (μm) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.



En la imagen 118 se presentan una serie de imágenes microscópicas para ilustrar la respuesta vascular en cada uno de los grupos de estudio.

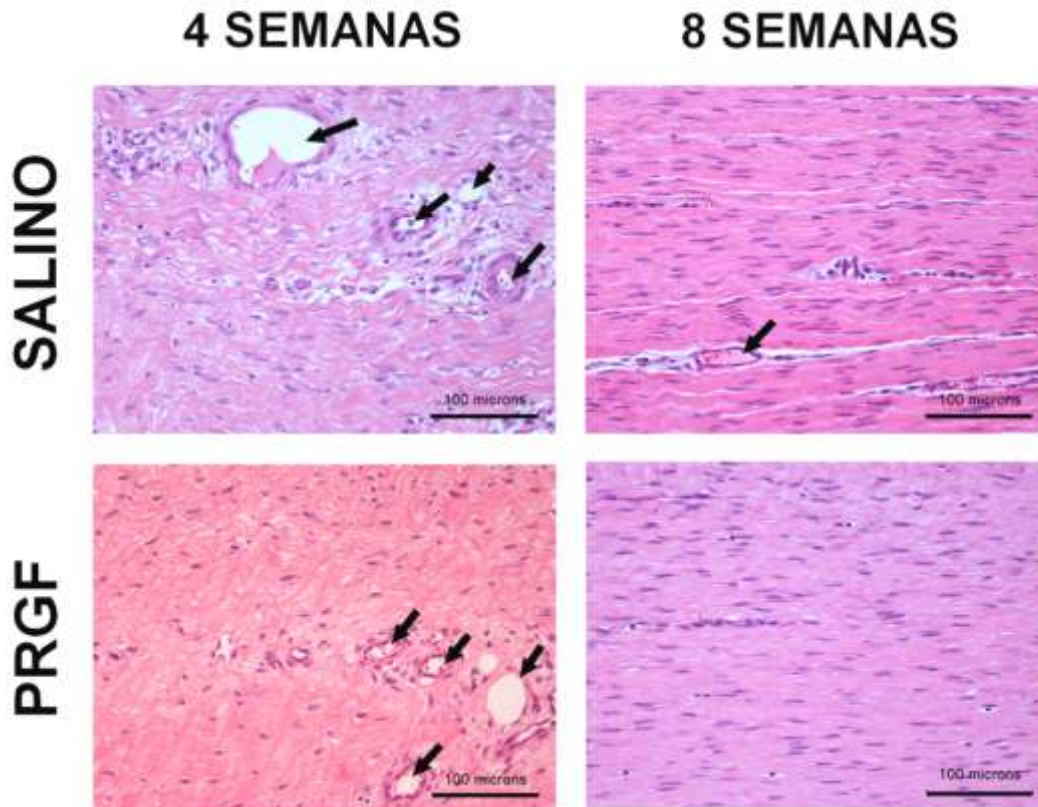


Fig. 118. Imágenes representativas de la respuesta vascular en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación $\times 200$. Tinción Hematoxilina-Eosina. Barra = $100 \mu\text{m}$. La flecha negra señala los vasos sanguíneos.

4.2.4. Infiltración inflamatoria

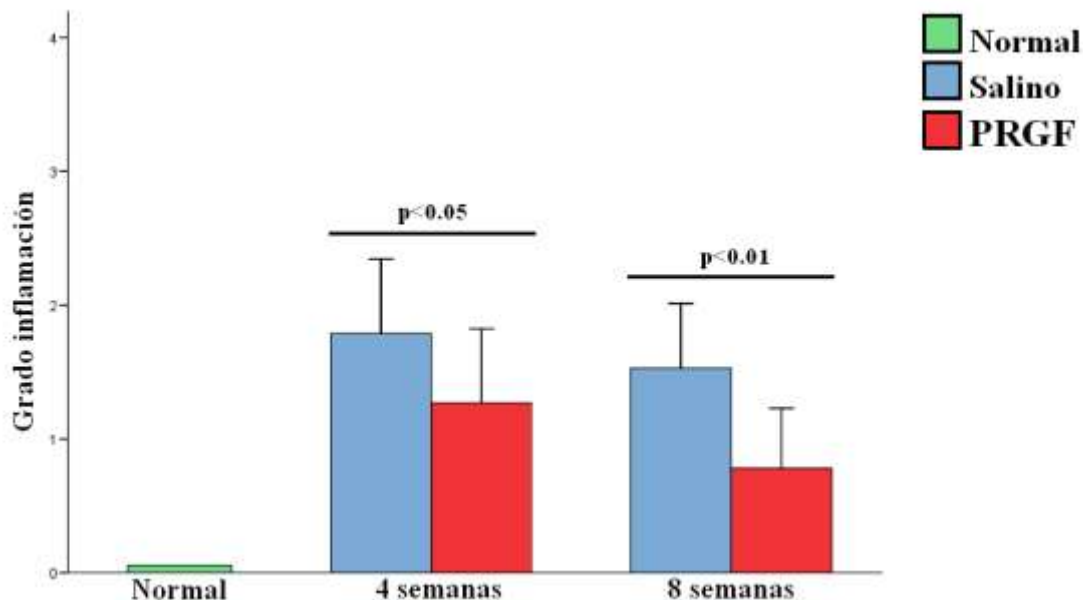
La infiltración inflamatoria en la zona de reparación tendinosa fue evaluada mediante una escala de valoración semicuantitativa de 5 puntos, donde a la imagen histológica con un máximo grado de infiltración inflamatoria se le otorgaba un valor de 4, y a la ausencia de inflamación se le asignaba un valor de 0.

Durante el estudio microscópico de los tendones normales no se apreció presencia de infiltrado inflamatorio en ninguna de las imágenes histológicas. Tras la cirugía, en todos los tendones se incrementó de manera significativa el grado de infiltración inflamatoria, tanto en el grupo salino como en el grupo PRGF. A las 4 semanas de la cirugía, los tendones tratados con PRGF mostraron un menor grado de infiltración inflamatoria que los tendones del grupo salino, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0.03$). De manera similar, a las 8 semanas de la cirugía, los tendones tratados con PRGF seguían presentando un grado de infiltración inflamatoria significativamente menor que los animales del grupo salino ($p = 0.008$) (Tabla 25) (Gráfico 44).

Tabla 25. Tabla comparativa de los datos semicuantitativos del grado de infiltración inflamatoria en los diferentes grupos de estudio. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	Grado de infiltración inflamatoria (0-4)
NORMAL	0.00 ± 0.00
Grupo SALINO 4 semanas	1.79 ± 0.28
Grupo PRGF 4 semanas	1.27 ± 0.28
<i>p</i>	0.03
Grupo SALINO 8 semanas	1.53 ± 0.24
Grupo PRGF 8 semanas	0.78 ± 0.22
<i>p</i>	0.008

Gráfico 44. Grado de infiltración inflamatoria según la escala de valoración semicuantitativa (0-4) del tendón de Aquiles en los diferentes grupos de estudio.

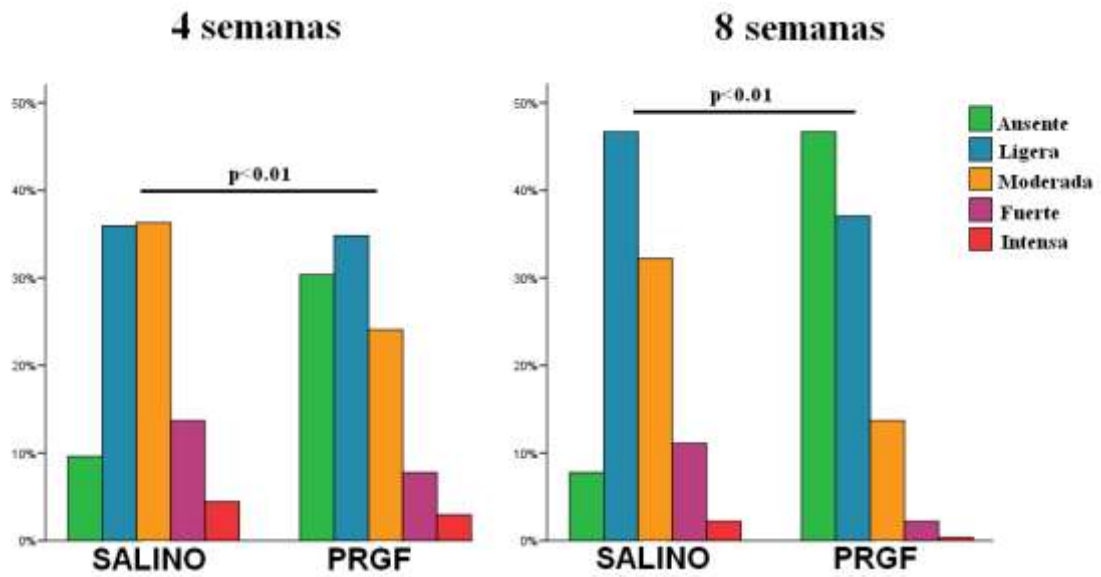


En la Tabla 26 y en el Gráfico 45 se pueden apreciar la distribución de frecuencias de cada uno de los valores relativos al grado de infiltración inflamatoria asignados a cada corte histológico en los diferentes grupos de estudio.

Tabla 26. Tabla de la distribución de frecuencias de los valores de la escala de valoración semicuantitativa para la evaluación del grado de infiltración inflamatoria en los diferentes grupos de estudio. (Datos obtenidos a partir de las 54 capturas histológicas tomadas en cada tendón).

	Normal	SALINO 4 semanas	PRGF 4 semanas	SALINO 8 semanas	PRGF 8 semanas
Severa (4)	-----	4.4%	3.0%	2.2%	0.4%
Fuerte (3)	-----	13.7%	7.8%	11.1%	2.2%
Moderada (2)	-----	36.3%	24.1%	32.2%	13.7%
Ligera (1)	-----	35.9%	34.8%	46.7%	37.0%
Ausencia (0)	100%	9.6%	30.4%	7.8%	46.7%

Gráfico 45. Gráfico de distribución de frecuencias de los valores de la escala de valoración semicuantitativa para la evaluación del grado de infiltración inflamatoria en los diferentes grupos de estudio.



En la imagen 119 se presentan una serie de imágenes microscópicas para ilustrar el grado de infiltración inflamatoria en cada uno de los grupos de estudio.

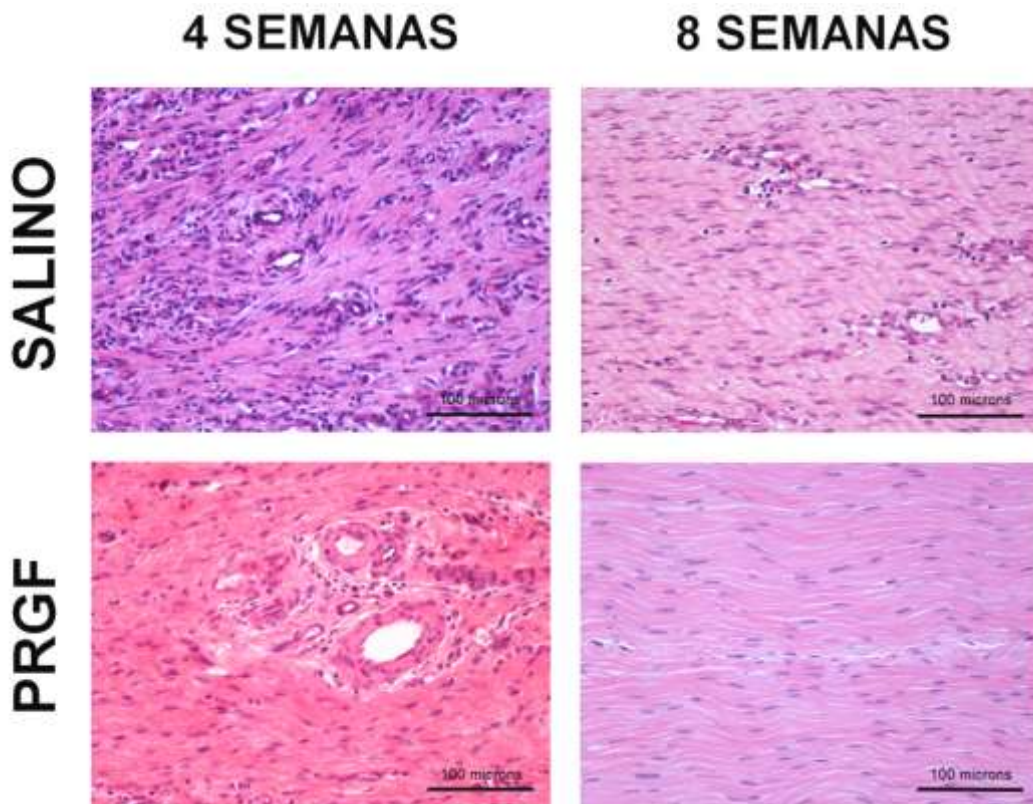


Fig. 119. Imágenes representativas del grado de infiltración inflamatoria en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x200. Tinción Hematoxilina-Eosina. Barra = 100 μ m.

4.2.5. Organización de las fibras de colágeno

La organización de las fibras de colágeno se evaluó en los cortes histológicos teñidos con la técnica Tricrómico de Masson. Fueron dos los parámetros estudiados con respecto a la organización de las fibras de colágeno: compactación de los haces de colágeno y orientación de estos haces con respecto al eje longitudinal del tendón. Para evaluar cada uno de estos parámetros se empleó una escala de valoración semicuantitativa de 6 puntos, en la cual se otorgaba el valor 5 a las imágenes histológicas similares a las observadas en el tendón normal, y el valor 0 cuando no se apreciaba formación de haces de colágeno.

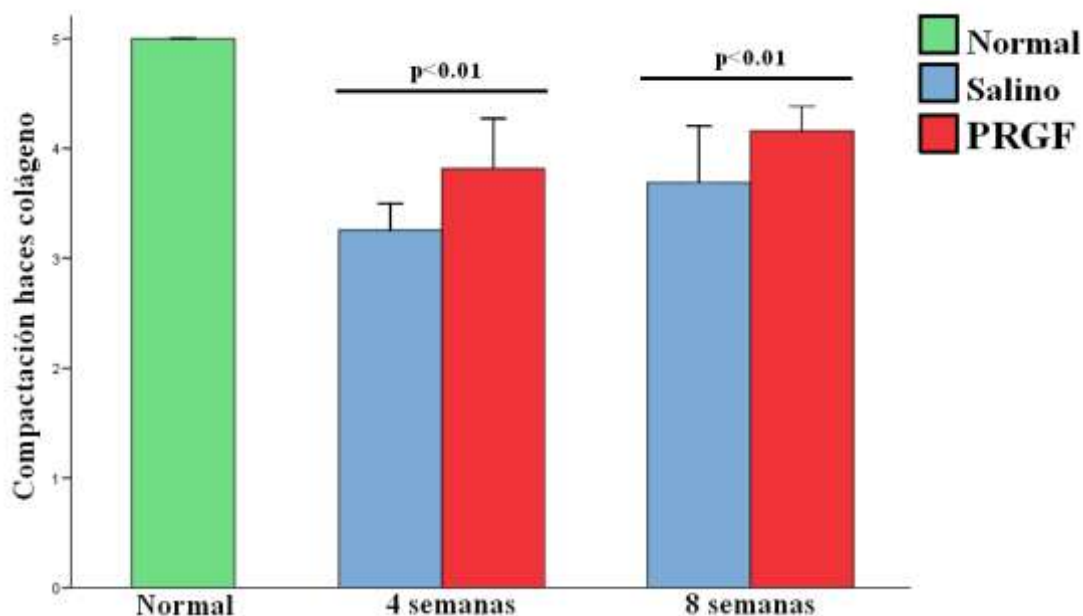
Los datos relativos a la organización de las fibras de colágeno obtenidos tras el análisis histológico de las muestras de los diferentes grupos experimentales quedan reflejados en la Tabla 27.

Tabla 27. Tabla comparativa de los datos semicuantitativos del grado de compactación y orientación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio. En rojo se indican las diferencias estadísticamente significativas.

	Compactación de los haces de colágeno (0-5)	Orientación de los haces de colágeno (0-5)
NORMAL	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
Grupo SALINO 4 semanas	3.26 ± 0.56	3.20 ± 0.70
Grupo PRGF 4 semanas	3.82 ± 0.51	3.64 ± 0.63
<i>P</i>	0.008	0.008
Grupo SALINO 8 semanas	3.70 ± 0.55	3.63 ± 0.62
Grupo PRGF 8 semanas	4.16 ± 0.49	4.21 ± 0.51
<i>P</i>	0.008	0.008

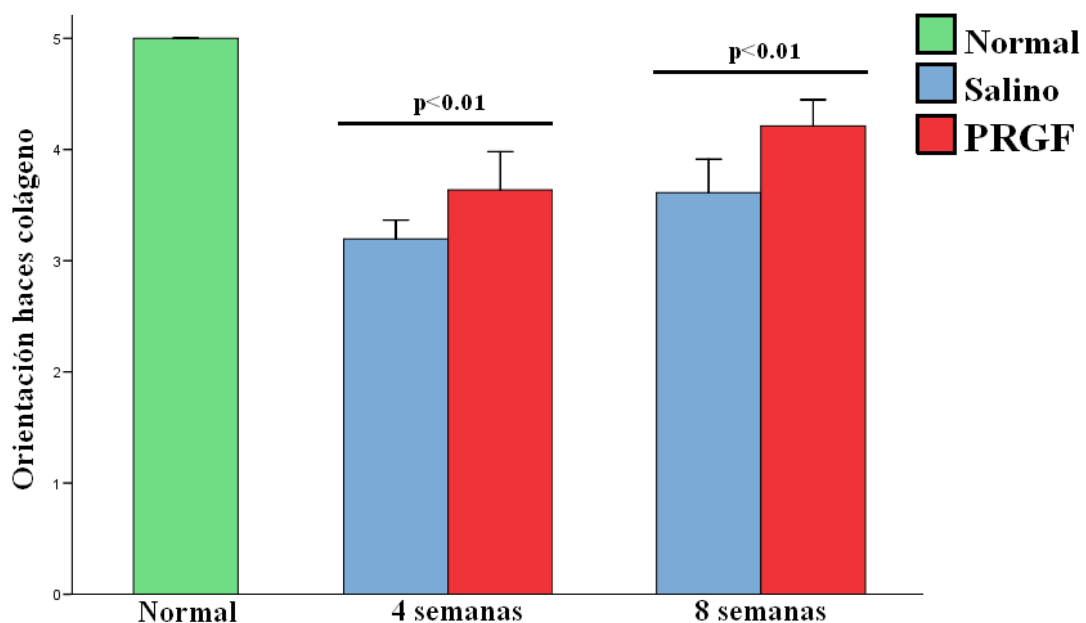
En los tendones normales se observó una formación homogénea de haces de colágeno altamente empaquetados, y recibieron la puntuación máxima de 5. Tras la cirugía, el grado de compactación disminuyó de manera significativa en todos los grupos experimentales. A las 4 semanas, los tendones infiltrados con PRGF mostraron un grado de compactación de los haces de colágeno significativamente mejor que los tendones del grupo salino ($p = 0.008$). De manera similar, en los animales eutanasiados a las 8 semanas de la cirugía, se observó que los haces de colágeno de los tendones del grupo PRGF presentaban un grado de compactación significativamente mayor que los tendones infiltrados con solución salina ($p = 0.008$) (Gráfica 46).

Gráfico 46. Grado de compactación de los haces de colágeno del tendón de Aquiles según la escala de valoración semicuantitativa (0-5) en los diferentes grupos de estudio.



Con respecto a la orientación de las fibras de colágeno, en los tendones normales se observó una formación de haces de colágeno paralelos al eje del tendón, y por tanto se les asignó el valor máximo de 5. Tras la cirugía, en la zona de reparación tendinosa se observó un empeoramiento significativo de la orientación de los haces de colágeno en todos los grupos experimentales. A las 4 semanas de la cirugía, se observó que los tendones tratados con PRGF presentaban una orientación de los haces de colágeno significativamente mejor que la observada en los tendones del grupo salino ($p = 0.008$). De manera similar, a las 8 semanas de la cirugía, el grupo PRGF también presentó una orientación de las fibras de colágeno significativamente más elevada de los tendones infiltrados con solución salina ($p = 0.008$) (Gráfico 47).

Gráfico 47. Orientación de los haces de colágeno del tendón de Aquiles según la escala de valoración semicuantitativa (0-5) en los diferentes grupos de estudio.



En la Tabla 28, y en los Gráficos 48 y 49 se pueden apreciar la distribución de frecuencias de cada uno de los valores relativos al grado de compactación y orientación de los haces de colágeno asignados a cada corte histológico en los diferentes grupos de estudio.

Tabla 28. Tabla de la distribución de frecuencias de los valores de la escala de valoración semicuantitativa para la evaluación de la compactación y la orientación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio. (Datos obtenidos a partir de las 54 capturas histológicas tomadas en cada tendón).

	Normal	SALINO 4 semanas	PRGF 4 semanas	SALINO 8 semanas	PRGF 8 semanas
Compactación haces colágeno					
5	100%	-----	5.6%	4.4%	21.1%
4	-----	31.9%	70.7%	61.1%	73.7%
3	-----	62.2%	23.7%	34.1%	5.2%
2	-----	5.9%	-----	0.4%	-----
1	-----	-----	-----	-----	-----
0	-----	-----	-----	-----	-----
Orientación haces colágeno					
5	100%	0.4%	3.7%	2.6%	25.9%
4	-----	34.1%	60.7%	63.3%	69.3%
3	-----	51.5%	31.1%	28.9%	4.8%
2	-----	13.0%	4.4%	5.2%	-----
1	-----	1.1%	-----	-----	-----
0	-----	-----	-----	-----	-----

Gráfico 48. Gráfico de distribución de frecuencias de los valores de la escala de valoración semicuantitativa para la evaluación del grado de compactación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio.

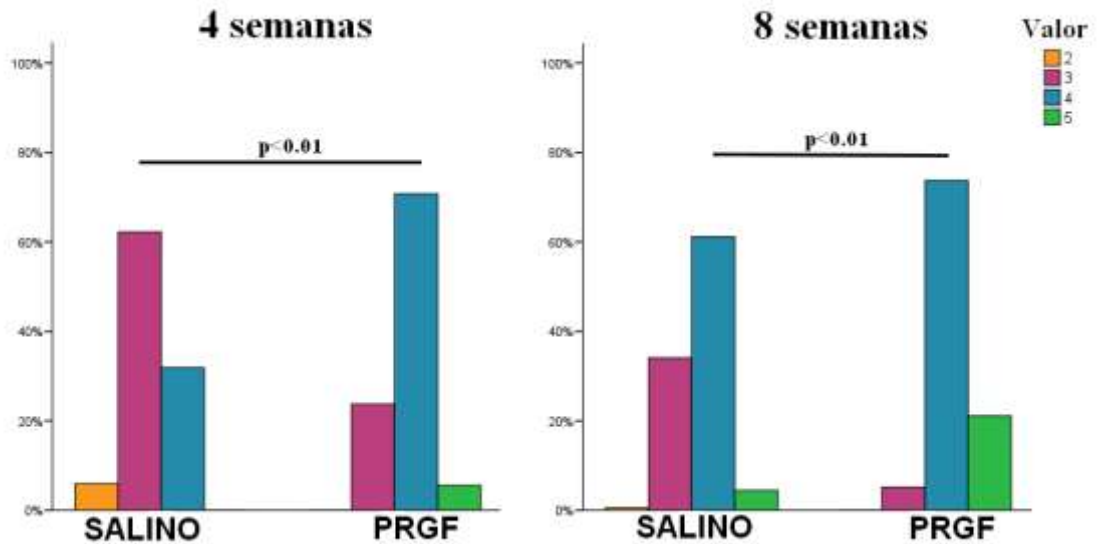
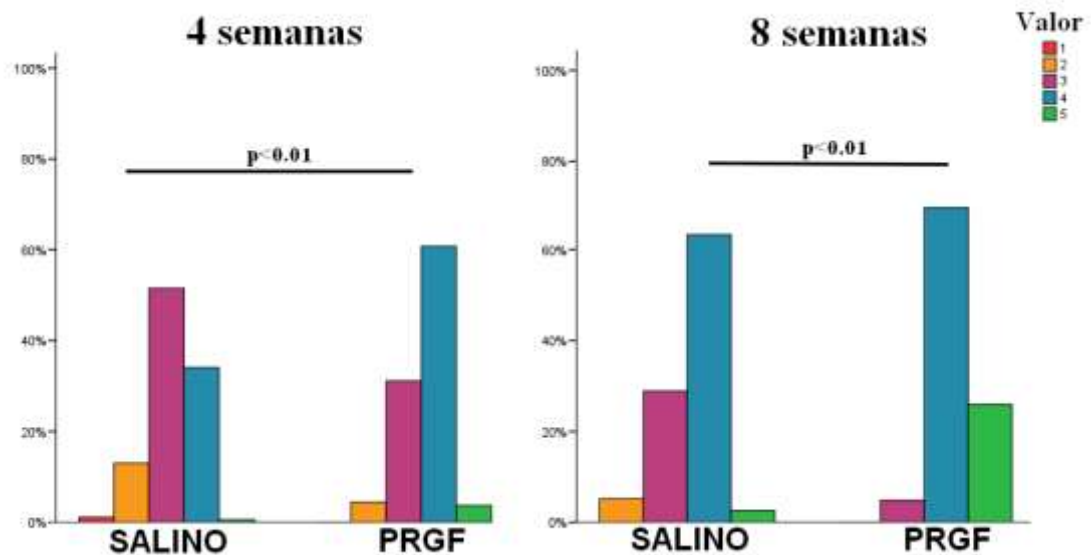


Gráfico 49. Gráfico de distribución de frecuencias de los valores de la escala de valoración semicuantitativa para la evaluación de la orientación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio.



A las 4 semanas de la cirugía, el 76.3% de las imágenes histológicas evaluadas en los tendones del grupo PRGF presentaron una formación de haces de colágeno altamente empaquetados o con una compactación densa, mientras que esta descripción

histológica tan solo se encontró en el 31.9% de las imágenes histológicas del grupo salino a este mismo tiempo. A las 8 semanas, el 21.1 % de las capturas histológicas de los tendones del grupo PRGF recibieron la máxima puntuación con respecto a la compactación de los haces de colágeno, mientras en el grupo salino sólo se le otorgó la máxima calificación con respecto a este parámetro al 4.4% de la capturas histológicas.

En cuanto a la orientación de las fibras de colágeno, a las 4 semanas de la cirugía el 64.4% de las capturas recibieron una puntuación de 4 ó 5, mientras que en el grupo salino esta cifra fue tan solo del 34.5%. A las 8 semanas, el 25.9% de las capturas en los tendones tratados con PRGF presentaron una formación de haces de colágeno paralela al eje longitudinal del tendón, mientras que en el grupo salino esta cifra tan solo alcanzó el 2.6% (Tabla 28).

A continuación se presentan una serie de imágenes microscópicas representativas del grado de compactación (Fig. 120) y de la orientación de las fibras de colágeno (Fig. 121) en cada uno de los grupos de estudio.

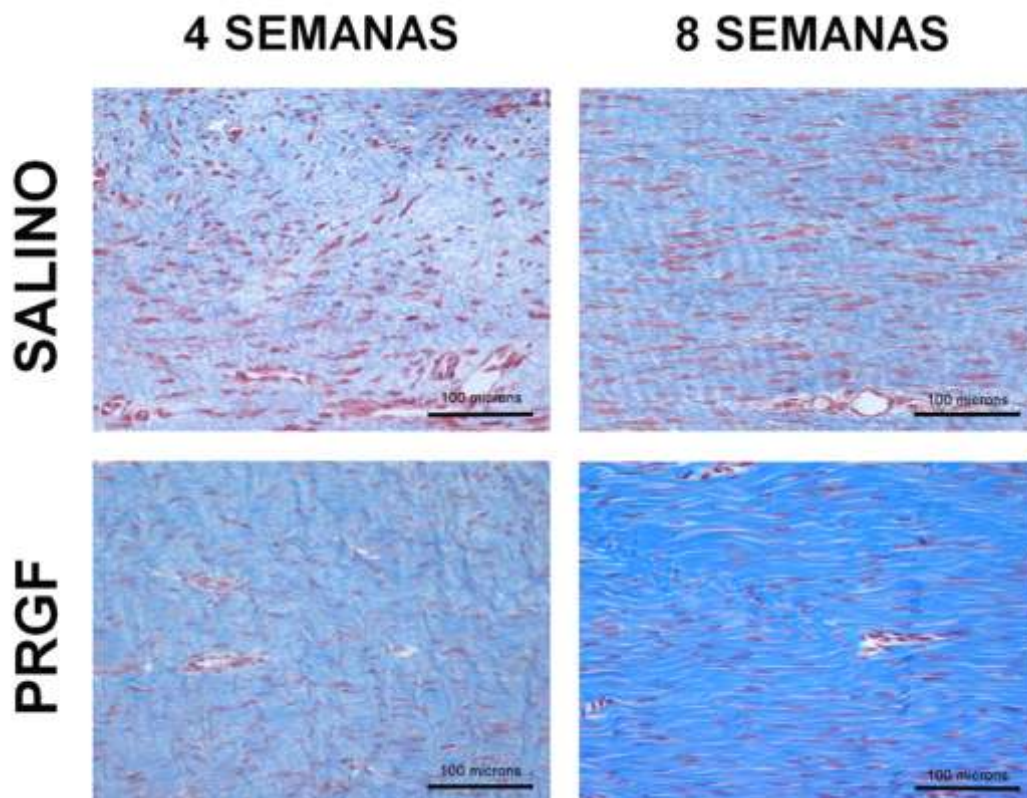


Fig. 120. Imágenes representativas del grado de compactación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x200. Tinción Tricrómico de Masson. Barra = 100 μ m.

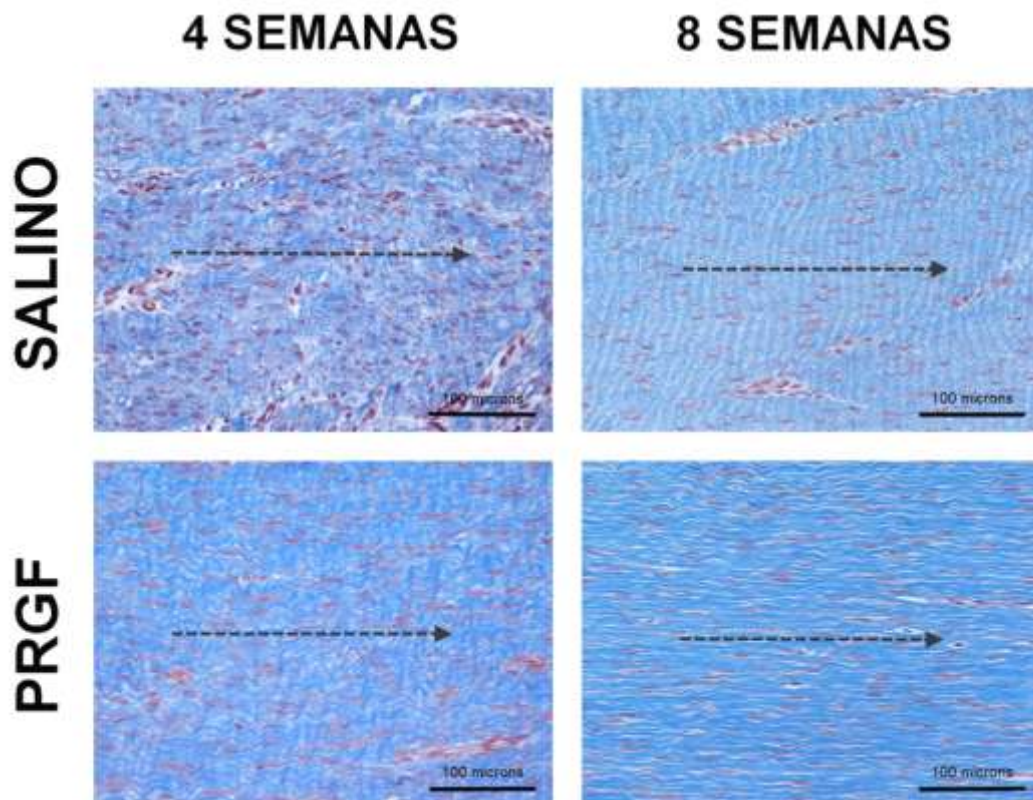


Fig. 121. Imágenes representativas de la orientación de los haces de colágeno en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x200. Tinción Tricrómico de Masson. Barra = 100 μ m. Las flechas discontinuas indican la dirección del eje longitudinal del tendón de Aquiles.

4.3. Exámenes microscópicos mediante técnicas inmunohistoquímicas

El tipo de colágeno presente en los cortes histológicos de la zona de reparación tendinosa se identificó mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas frente al colágeno de tipo I y frente al colágeno de tipo III. La evaluación de los cortes teñidos con técnicas inmunohistoquímicas se llevó a cabo mediante una escala de valoración semicuantitativa, donde se evaluaban dos subapartados: intensidad, y extensión de la reacción inmunohistoquímica a lo largo de la preparación histológica. Cada uno de estos subapartados podía tomar un valor máximo de 3, y el sumatorio de ambos subapartados constituía el valor final de la evaluación inmunohistoquímica.

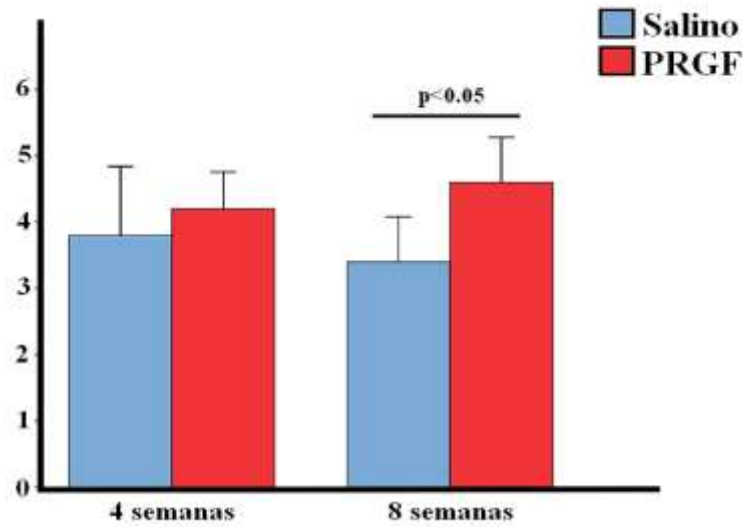
4.3.1. Colágeno de tipo I

El colágeno de tipo I conforma prácticamente la totalidad de la matriz extracelular del tejido tendinoso en condiciones normales. En nuestro estudio experimental observamos como a las 4 semanas de la cirugía, la valoración del colágeno tipo I fue similar tanto en los tendones tratados con PRGF como en los tendones del grupo salino. Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía, en los tendones infiltrados con PRGF se observó una valoración significativamente mayor con respecto al colágeno tipo I que en los tendones del grupo salino ($p = 0.03$). Esta diferencia fue debida principalmente a que la intensidad de la reacción inmunohistoquímica en los tendones tratados con PRGF fue mayor que en los tendones tratados con solución salina, ya que con respecto a la extensión de la reacción inmunohistoquímica con se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Tabla 29) (Gráfico 50).

Tabla 29. Tabla comparativa de la valoración semicuantitativa de la extensión e intensidad de la reacción inmunohistoquímica para la detección de colágeno tipo I.

	Extensión	Intensidad	Total – Colágeno tipo I
Grupo SALINO 4 semanas	2.00 ± 0.71	1.80 ± 0.45	3.80 ± 0.84
Grupo PRGF 4 semanas	2.00 ± 0.00	2.20 ± 0.45	4.20 ± 0.45
<i>P</i>	1.00	0.42	0.42
Grupo SALINO 8 semanas	2.00 ± 0.00	1.40 ± 0.55	3.40 ± 0.55
Grupo PRGF 8 semanas	2.00 ± 0.00	2.60 ± 0.55	4.60 ± 0.55
<i>P</i>	1.00	0.03	0.03

Gráfico 50. Valoración del colágeno de tipo I en el tendón de Aquiles según la escala de valoración semicuantitativa (0-6) en los diferentes grupos de estudio.



A continuación se presentan una serie de imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica para la detección de colágeno de tipo I en cada uno de los grupos de estudio (Fig. 122).

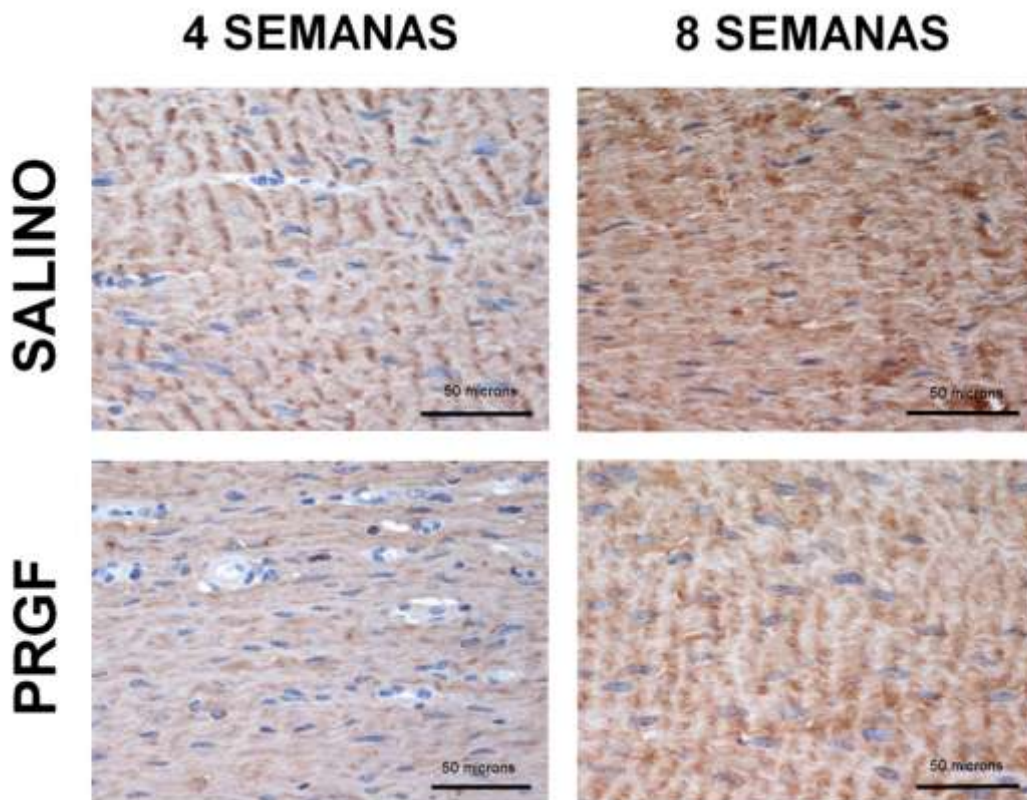


Fig. 122. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para la detección de colágeno tipo I en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x400. Barra = 50 μ m.

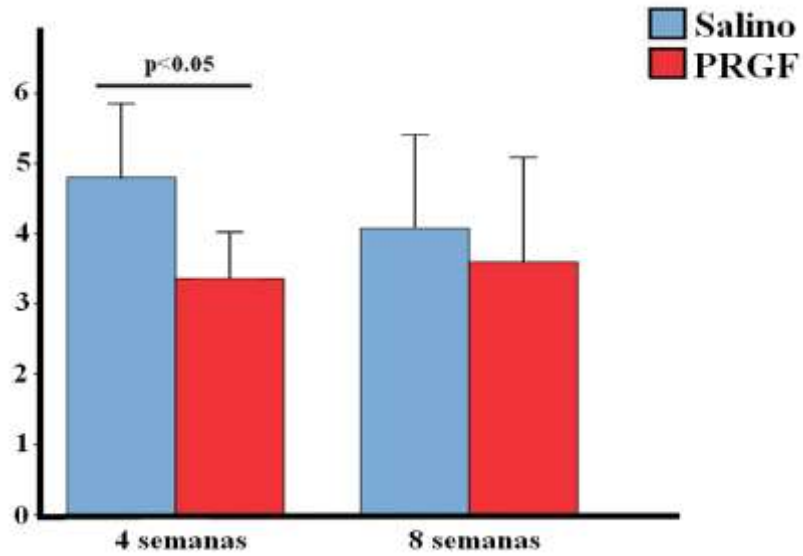
4.3.2. Colágeno de tipo III

El colágeno de tipo III es el que se encuentra predominantemente en los primeros estadios del proceso de cicatrización tendinosa, y en determinados casos de patologías del tendón. En nuestro estudio experimental observamos como a las 4 semanas de la cirugía, la valoración del colágeno tipo III fue significativamente mayor en los tendones del grupo salino en comparación con los tendones infiltrados con PRGF ($p = 0.03$). Esta diferencia fue debida a que la reacción inmunohistoquímica en los tendones infiltrados con solución salina estaba más extendida por la preparación histológica que en los tendones tratados con PRGF. Con respecto a la intensidad de la reacción inmunohistoquímica no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio a las 4 semanas. A las 8 semanas de la cirugía, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la valoración de la reacción inmunohistoquímica del colágeno tipo III entre ambos grupos de estudio (Tabla 30) (Gráfico 51).

Tabla 30. Tabla comparativa de la valoración semicuantitativa de la extensión e intensidad de la reacción inmunohistoquímica para la detección de colágeno tipo III.

	Extensión	Intensidad	Total – Colágeno tipo III
Grupo SALINO 4 semanas	2.20 ± 0.45	1.80 ± 0.45	4.00 ± 0.71
Grupo PRGF 4 semanas	1.20 ± 0.45	1.60 ± 0.55	2.80 ± 0.45
<i>P</i>	0.03	0.69	0.03
Grupo SALINO 8 semanas	1.80 ± 0.45	1.60 ± 0.55	3.40 ± 0.89
Grupo PRGF 8 semanas	1.40 ± 0.55	1.60 ± 0.55	3.00 ± 1.00
<i>P</i>	0.31	1.00	0.55

Gráfico 50. Valoración del colágeno de tipo III en el tendón de Aquiles según la escala de valoración semicuantitativa (0-6) en los diferentes grupos de estudio.



A continuación se presentan una serie de imágenes microscópicas representativas de la tinción inmunohistoquímica para la detección de colágeno de tipo III en cada uno de los grupos de estudio (Fig. 123).

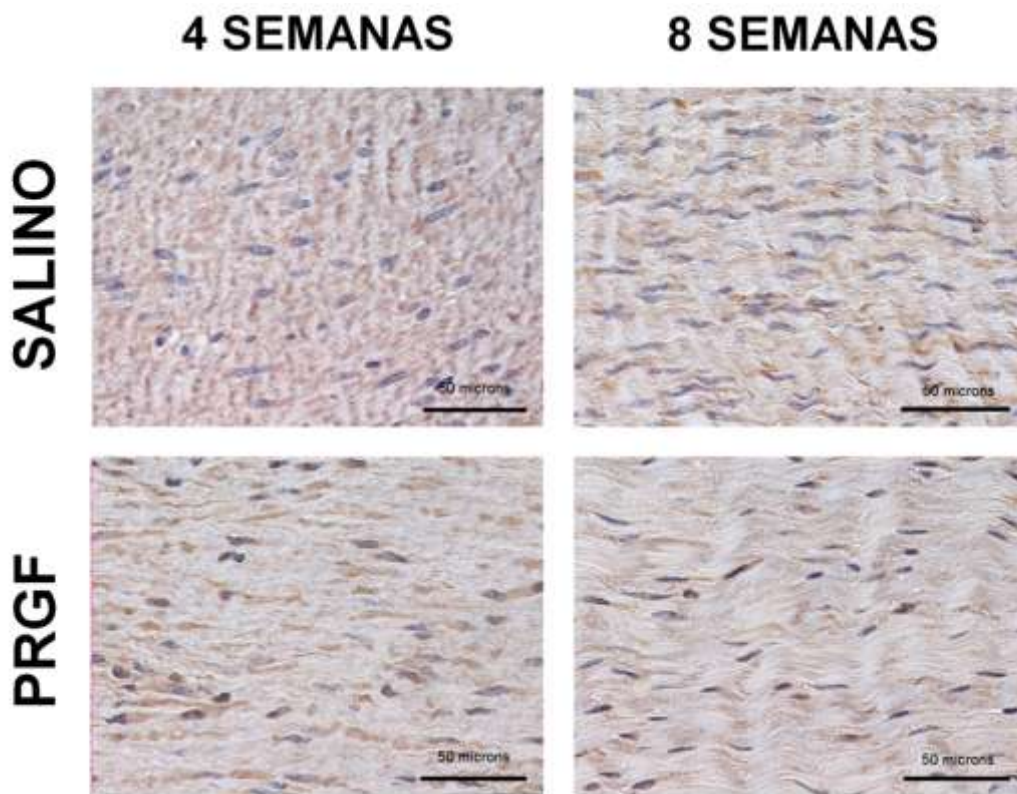


Fig. 43. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para la detección de colágeno tipo III en los diferentes grupos de estudio. Imagen tomada con una magnificación x400. Barra = 50 μ m.

Discusión

1. Modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina

1.1. Elección de la especie ovina

En nuestra Tesis Doctoral se ha elegido la especie ovina como modelo experimental para llevar a cabo nuestros estudios. La especie ovina se ha considerado como un buen modelo animal para la experimentación en ortopedia (Martini et al., 2001; Pearce et al., 2007). Cuando se pretende evaluar la reparación del tendón tras su ruptura, es necesario elegir un modelo animal en el cual la estructura ósea, muscular, tendinosa y ligamentosa se asemeje lo más posible a la del ser humano. La intención de esto es recrear de una manera lo más fidedigna posible las diversas cargas biomecánicas que se desencadenan en la anatomía del modelo, y que puedan ser extrapoladas a los seres humanos con el menor número de limitaciones posible (Martini et al., 2001; Pearce et al., 2007).

Modelos animales como la rata, ratón, cobaya y conejo son baratos y fáciles de manipular. Estos modelos animales son adecuados para realizar investigación básica en ortopedia. Sin embargo, cuando el objetivo del estudio es plantear un modelo de ruptura y posterior reparación tendinosa es necesario recurrir a otras especies mayores en las cuales la respuesta tisular a las cargas mecánicas y el tamaño de las estructuras anatómicas sea lo más parecido posible a la especie humana. Estas especies a las que nos referimos son los primates no-humanos, perro, cerdo, oveja y cabra. En los últimos años, la tendencia en experimentación ortopédica tiende a disminuir los modelos primates no-humanos, perro y cerdo en favor de los modelos oveja y cabra (Martini et al., 2001).

Sin lugar a dudas, los primates no-humanos son el modelo experimental más parecido al humano, mientras que el modelo canino ha sido el más usado en las últimas

décadas en la experimentación ortopédica. A pesar de ello, el empleo de estos modelos experimentales está disminuyendo debido al impacto emocional que supone hacer investigación con ellos, y a los aspectos legales que rodean su empleo como animales de experimentación. Actualmente, la comunidad científica acepta que no existe razón ninguna para emplear el modelo canino en experimentación ortopédica cuando están disponibles los modelos ovino y caprino (Yuehuei y Freidman, 1998). El cerdo presenta algunos problemas para la investigación ortopédica. Estos problemas derivan del rápido crecimiento corporal que tiene esta especie y del carácter a largo plazo que suelen tener estos estudios, así como de la dificultad en el manejo de esta especie (Martini et al., 2001).

Las ovejas son animales tranquilos y que pueden ser manejados con relativa facilidad. Las publicaciones científicas indican que durante la última década las ovejas han sido utilizadas para el estudio de diversos problemas de carácter musculoesquelético, y se están convirtiendo en el modelo experimental más popular en experimentación ortopédica, como una alternativa al empleo del modelo canino (Martini et al., 2001; Pearce et al., 2007). Para nuestro estudio experimental sobre el tendón de Aquiles, el mayor tamaño de las estructuras anatómicas y las mayores cargas que actúan sobre la extremidad ovina hacen que este modelo sea el más similar al humano (si exceptuamos a los primates no-humanos). Sin embargo, existen limitaciones que hacen imposible la comparación directa de los resultados sobre modelo experimental con los resultados de estudios clínicos, especialmente si tenemos en cuenta los aspectos biomecánicos.

1.2. Elección del tendón de Aquiles

El término tendón de Aquiles o tendón calcáneo común hace referencia a las estructuras tendinosas que se insertan en la tuberosidad del hueso calcáneo. En el caso de los pequeños rumiantes, el tendón calcáneo común posee tres componentes principales. De un lado está el tendón accesorio, compuesto por las bandas tendinosas de los músculos semitendinoso, gracilis, semimembranoso y bíceps femoral. El principal componente del tendón calcáneo común de la oveja es el tendón del músculo gastrocnemio, que en el caso de los pequeños rumiantes tiene tres cabezas: lateral,

medial e intermedia. El tendón del músculo flexor digital superficial acompaña al tendón del gastrocnemio, y a nivel del la tuberosidad del calcáneo se hace más superficial, insertándose tan sólo parcialmente y continuando distalmente hasta insertarse en la superficie plantar de las segundas falanges (Getty, 1975; Habel, 1989).

El tendón de Aquiles desempeña un papel primordial a la hora de transmitir las fuerzas musculares que producen la extensión del tarso. En el caso de la oveja, el tendón de Aquiles entra a formar parte de lo que se conoce como “sistema de sostén pasivo” (Habel, 1989; Getty, 1975). Las cargas a la que se ve sometido este tendón durante las diferentes fases de la marcha pueden llegar a ser muy intensas. Debido a ello, se puede considerar al tendón de Aquiles como un exigente banco de pruebas a la hora de testar diferentes estrategias para mejorar el proceso de reparación tendinosa.

El tendón de Aquiles de la oveja es una estructura anatómica de muy fácil acceso desde el punto de vista quirúrgico. Tras una incisión cutánea sobre la piel que lo recubre tenemos acceso prácticamente a la totalidad de la longitud del tendón. Además, en el caso de la oveja, el tendón de Aquiles tiene una longitud y grosor muy similar a las dimensiones del tendón de Aquiles humano. Estas dimensiones facilitan la actuación quirúrgica sobre el tendón, y a la vez proporcionan material suficiente para una generosa toma de muestras.

1.3. Caracterización de la lesión tendinosa

El daño en el tendón es un modelo experimental de uso bastante común. Son diversos los modelos animales que estudian la cicatrización tendinosa. La mayoría de estos modelos animales se han empleado para evaluar la cicatrización del tendón en respuesta a una lesión como puede ser la ruptura total, la ruptura parcial, o la avulsión de la inserción ósea del tendón. Los procesos de tendinopatías también se han recreado en modelos animales (Carpenter et al., 1999). Los conejos, ratas, perros, cabras y ovejas son probablemente las especies más usadas como modelo de daño tendinoso (Carpenter et al., 2004).

En nuestra Tesis Doctoral hemos desarrollado un modelo experimental *in vivo* de ruptura total del tendón de Aquiles. La rata (Aspenberg y Virchenko, 2004;

Virchenko y Aspenberg, 2006; Yeung et al., 2006; Ma et al., 2007; Suckow et al., 2007; Bring et al., 2009) y el conejo (Kangas et al., 2001; Forslund y Aspenberg, 2003; Ilhami et al., 2004; Lyras et al., 2009b; Lyras et al., 2010b, Lyras et al., 2011) se han utilizado ampliamente como modelo experimental de ruptura del tendón de Aquiles. Como ya se ha comentado, estas especies presentan varias desventajas relacionadas con el tamaño de su sistema musculoesquelético cuando estamos tratando de recrear una lesión del tendón de Aquiles similar a la humana. El tendón de Aquiles de las ovejas permitió una fácil exposición quirúrgica y su tamaño contribuyó a crear una lesión más precisa, homogénea, repetible y estandarizada.

En la bibliografía, tan sólo existen cuatro artículos publicados que usan un modelo experimental ovino *in vivo* de sección completa del tendón de Aquiles (Bruns et al., 2000; Petersen et al., 2003; Virchenko et al., 2008; Sarrafian et al., 2010). En dos de estos artículos la sección del tendón de Aquiles se utilizó únicamente como método de inmovilización para reducir la actividad de los animales durante el periodo postoperatorio, por lo que el procedimiento quirúrgico de tenotomía del tendón de Aquiles se describió de manera muy somera (Bruns et al., 2000; Petersen et al., 2003). En otro de estos trabajos, el tendón se dejó sin suturar tras la tenotomía y no se empleó ningún sistema de inmovilización postoperatoria (Virchenko et al., 2008). Bajo estas condiciones, el defecto creado entre los bordes del tendón seccionado es poco predecible, y es difícil estandarizar la lesión durante el periodo postoperatorio si el animal trata de apoyar peso. Sarrafian y colaboradores (2010) utilizaron un modelo ovino para comprobar la cicatrización y las características mecánicas del refuerzo de la sutura primaria de una ruptura aguda del tendón de Aquiles con un parche dérmico acelular porcino, en comparación con la sutura de reparación primaria sola. Existen varias diferencias entre el modelo experimental que utilizaron estos autores y el modelo que hemos descrito en este trabajo. Estos autores emplearon un patrón de Kessler bloqueado para reparar la tenotomía, mientras que en nuestro modelo se utilizó un patrón en triple polea. Por otra parte, ellos no utilizaron ningún método de inmovilización postoperatoria y no monitorizaron las lesiones del tendinosas durante el período postoperatorio (Sarrafian et al., 2010), mientras que nosotros en nuestro estudio usamos un sistema de fijadores externos para proteger el tendón de Aquiles y llevamos a cabo exámenes ecográficos semanales para monitorizar el proceso de cicatrización del tendón.

1.4. Protección de la tenotomía en el periodo postoperatorio

Actualmente, la comunidad científica acepta que la movilización precoz y controlada del tobillo, junto con el apoyo progresivo de peso es crucial para una recuperación satisfactoria tras una ruptura del tendón de Aquiles (Mortensen et al., 1999; Kangas et al., 2003; Maffulli et al., 2003). Esta movilización activa precoz tras su reparación incrementa sus propiedades biomecánicas del tendón y disminuye las adherencias entre éste y el peritendón (Wada et al., 2001; Wang, 2006). La carga mecánica durante el proceso de cicatrización del tendón incrementa la reparación y la remodelación tendinosa, estimulando la actividad de los fibroblastos (Davidson et al., 1997). Estudios experimentales han puesto de manifiesto que tras la reparación del tendón, la movilización del mismo es fundamental para minimizar la formación de adherencias (Zhao et al., 2004; Boyer et al., 2005). Sin embargo, el movimiento sin restricción puede producir una separación entre los bordes del tendón reparado si las fuerzas generadas en la zona superan la resistencia de la sutura usada para reparar el tendón (Ma et al., 2007). En el caso de un modelo animal de rotura aguda del tendón de Aquiles, es muy complicado controlar la actividad postoperatoria de los animales. Además, las ovejas son animales asustadizos que pueden reaccionar de manera brusca ante determinados estímulos durante su estabulación. Por ello nos pareció imprudente no usar ningún sistema de inmovilización durante el periodo postoperatorio, y se empleó un fijador externo con el objetivo de minimizar los cambios de longitud en el foco de lesión y garantizar la homogeneidad del modelo experimental.

En nuestro modelo experimental, el sistema de inmovilización postoperatorio elegido fue una modificación de un fijador externo transarticular del tarso (T-TAESF). En un estudio piloto previo se probaron diferentes configuraciones de este sistema, y finalmente se observó que la configuración que describimos en la sección de “Material y Método” era la que mejor soportaba las fuerzas en el animal *in vivo* cuando apoyaba la extremidad. El empleo de fijadores externos transarticulares se ha empleado con éxito para manejar roturas agudas del tendón de Aquiles en medicina veterinaria (Carmichael, 1991; Lewis et al., 2001). Este sistema permite el reposo en la zona lesionada en aquellos pacientes en los que resulta imposible llevar a cabo un programa de

movilización controlada eficaz. En varios artículos de investigación ortopédica se ha empleado con éxito un sistema similar al aquí propuesto para conseguir bloquear la movilidad del tarso de la oveja (Skerry y Lanyon, 1993; Skerry y Lanyon, 1995; Pitsillides et al., 1999; Bruce et al., 2002). En un estudio experimental realizado sobre el tendón de Aquiles de ratas, para conseguir la inmovilidad del tendón y evitar que durante los primeros días del postoperatorio se produjese una separación de los bordes tendinosos como consecuencia de la contracción isométrica de las cabezas del músculo gastrocnemio y flexor digital superficial, se propuso el empleo de una inyección intramuscular de toxina botulínica tipo A en estos músculos. De esta manera se lograba paralizar esta musculatura y proteger así la zona de reparación (Ma et al., 2007). En otro estudio experimental sobre el tendón de Aquiles de oveja se realizó una tenotomía completa del tendón de Aquiles, y no se empleó ningún sistema de inmovilización tras la cirugía. Los autores comentan que fue necesario el uso de férulas de fibra de vidrio en algunos animales a los pocos días de la cirugía (Sarrafian et al., 2010).

1.5. Evaluación del modelo experimental

El modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles descrito en esta Tesis Doctoral fue fácilmente reproducible, y el daño tendinoso obtenido fue homogéneo entre todos los animales del estudio, como se pudo comprobar en los posteriores exámenes ecográficos. El hecho de que la oveja tenga un tendón de Aquiles de un grosor en torno a 10 mm, nos permitió manipularlo con facilidad y realizar la cirugía de manera precisa. El T-TAESF propuesto en este modelo experimental consiguió una buena protección del tendón de Aquiles frente a movimientos incontrolados del animal y soportó la carga de peso del animal sobre la extremidad operada sin que se rompiese a lo largo de todo el periodo de estudio. Además, este sistema de inmovilización impidió que se produjesen macromovimientos en el tendón de Aquiles recién reparado, que podrían comprometer la integridad de la sutura y producir una separación en los bordes tendinosos que hiciese fracasar el modelo experimental.

Las veinte ovejas que comenzaron el estudio llegaron al final del mismo sin que se registrase ninguna baja. Los exámenes físicos semanales mostraron un excelente estado de salud, sin que se registrasen picos de fiebre, ni apatía, ni anorexia, ni pérdidas

de peso significativas. Esto pone de manifiesto que las ovejas son unos animales resistentes y que toleran bien este tipo de intervenciones quirúrgicas con fines experimentales. Otros autores también han observado esta idoneidad de la oveja como animal de experimentación en procesos de cicatrización del tendón de Aquiles (Sarrafian et al., 2010).

A lo largo del periodo de estudio no se presentó ninguna complicación postoperatoria mayor. En cinco animales (25%) se observó una discreta secreción serosanguinolenta asociada al orificio por el cual pasaba alguna de las agujas del fijador externo. Esto fue considerado una complicación menor, que se resolvió en todos los casos con antibioterapia sistémica y curas locales. La infección asociada al sitio de entrada de las agujas es la principal complicación del uso de fijadores externos, tanto en medicina humana como veterinaria (Harari, 1992; Parameswaran et al., 2003). En algunos estudios la incidencia de este tipo de complicación puede incluso llegar al 30% (Parameswaran et al., 2003), por lo que podemos considerar dentro de la normalidad la tasa encontrada en nuestro modelo experimental.

En nuestro estudio, todos los animales presentaron un importante grado de cojera a lo largo de todo el periodo de estudio, sin que se observasen diferencias significativas entre los que habían sido tratados con PRGF o los del grupo salino. En otros estudios experimentales en los que se realizó una sección del tendón de Aquiles en la especie ovina, se informó que los animales lograban un apoyo de peso total en la extremidad operada entre las 6 y las 8 semanas (Bruns et al., 2000; Sarrafian et al., 2010). En nuestro modelo experimental, a diferencia de los modelos empleados en estos estudios previos, el T-TAESF permaneció colocado durante todo el periodo postoperatorio. El hecho de que el fijador externo permaneciese inmovilizando el tarso del animal durante todo este periodo de tiempo, y restringiese la movilidad normal de esta articulación podría explicar que los animales permaneciesen cojos durante todo el periodo de estudio. Esta inmovilidad prolongada de la extremidad operada también explica que los animales presentasen una disminución en el perímetro del muslo. La inmovilidad prolongada se asocia a una atrofia muscular por desuso, y esta atrofia muscular se refleja clínicamente como una disminución de la musculatura del muslo del animal.

En esta Tesis Doctoral hemos definido de manera precisa un protocolo para obtener un modelo experimental *in vivo* para el estudio del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles. Sin embargo, este modelo experimental presenta una serie de limitaciones que deben de ser consideradas. Una de las limitaciones está relacionada con el hecho de que este modelo experimental emplea tendones de Aquiles sanos, no patológicos, y se sabe que el proceso de cicatrización tendinosa presenta variaciones entre los tendones sanos y los tendones patológicos (Waterson et al., 1997). En la mayoría de los casos clínicos de rotura aguda del tendón de Aquiles en humanos, la ruptura se produce en un tendón que presentaba previamente un proceso de tendinopatía (Jozsa y Kannus, 1997a). Otra limitación a destacar de este modelo experimental es que cuando se produce una rotura espontánea del tendón de Aquiles, se produce un deshilachado de los bordes tendinosos. En nuestro modelo experimental, la rotura del tendón de Aquiles se realizó de manera quirúrgica, y los bordes de la tenotomía fueron limpios y netos, circunstancia que no suele observarse en un escenario clínico. En algunos modelos experimentales de rotura del tendón de Aquiles se ha simulado el deshilachado de los bordes tendinosos seccionados. Para ello se realizaban varios cortes a lo largo del eje longitudinal del tendón, y posteriormente se practicaba el corte transversal del mismo, asemejándose así al aspecto que presenta el tendón de Aquiles cuando se rompe de manera espontánea (Virchenko et al., 2008).

2. Aplicación de PRGF en la cicatrización del tendón

El tendón de Aquiles es el tendón de mayor tamaño y más fuerte del organismo, y al mismo tiempo es uno de los tendones que se lesionan con más frecuencia. La rotura aguda del tendón de Aquiles es sin duda la lesión más dramática que puede sufrir esta estructura, y supone un problema ortopédico de una relevancia creciente en los últimos años (Maffulli, 1999; Longo et al., 2009; Hess, 2010; Maffulli et al., 2011). En muchas ocasiones, esta grave lesión se asocia a la práctica de actividades deportivas, sobre todo en países desarrollados en los que una sociedad eminentemente sedentaria participa en

deportes recreacionales que exigen una preparación física adecuada (Maffulli, 1999; Longo et al., 2009). La rotura del tendón de Aquiles supone unos costes sanitarios importantes (Goel et al., 2009), y puede llegar a producir una disminución significativa del rendimiento deportivo de los atletas (Parekh et al., 2009).

El manejo terapéutico de las roturas tendinosas puede resultar complejo, debido sobre todo a que el tendón es una estructura anatómica con un bajo potencial de cicatrización. Este bajo potencial de cicatrización del tendón se debe a que es un tejido con una vascularización relativamente baja, y a que sus células residentes (tenocitos) son también escasas y con un metabolismo bajo (Fenwick et al., 2002; Kader et al., 2002). Recientemente, algunos autores han propuesto el empleo de factores de crecimiento como una alternativa para estimular el proceso cicatricial del tendón (Maffulli et al., 2002). Existen una serie de factores de crecimiento que desarrollan papeles clave en el proceso de cicatrización del tendón. Entre estos factores de crecimiento podríamos destacar al PDGF, TGF- β 1, VEGF, EGF, bFGF y IGF-I entre otros muchos (Molloy et al., 2003; Hsu y Chang, 2004). Aunque estos factores de crecimiento podrían utilizarse de manera individual para acelerar el proceso de cicatrización tendinosa, algunos autores han planteado que parece poco probable que la acción de un único factor de crecimiento produzca un efecto terapéutico importante y significativo en un escenario *in vivo* (Maffulli et al., 2002). La cicatrización del tendón es un proceso biológico muy complejo, y por tanto resulta más razonable pensar que para observar una verdadera mejoría en el cicatrización del tendón sería necesaria la participación de varios factores de crecimiento y otras moléculas, que se encontrasen en un equilibrio anabólico y catabólico, y que estuviesen disponibles en una concentración adecuada en el momento adecuado (Maffulli et al., 2002). Por desgracia, actualmente desconocemos buena parte de los procesos bioquímicos que tienen lugar en el tejido tendinoso durante el proceso de cicatrización (Andía et al., 2010).

El uso de terapias basadas en la aplicación de plasma autólogo, generalmente conocidas como Plasma Rico en Plaquetas (PRP), proporciona una fuente autóloga de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas (como el fibrinógeno, fibronectina o vitronectina), derivados de los gránulos alfa de las plaquetas (Anitua et al., 2004). Estas sustancias autólogas administradas en el foco de lesión tienen la ventaja de encontrarse en equilibrio biológico, y además, al ser autólogas, se eliminan los riesgos potenciales derivados de una reacción inmunológica adversa (Anitua et al,

2004). Como se ha detallado en la correspondiente sección de la “Revisión bibliográfica”, existen numerosos estudios experimentales que han puesto de manifiesto la eficacia de la aplicación de PRP para mejorar los procesos de cicatrización tendinosa (Aspenberg y Virchenko, 2004; Anitua et al., 2006b; Virchenko y Aspenberg, 2006, Virchenko et al., 2006; Kajikawa et al., 2008; Lyras et al. 2009a; Lyras et al., 2009b; Bosch et al. 2010; Lyras et al., 2010a; Lyras et al., 2010b; Lyras et al., 2010c; Sarrafian et al., 2010; Bosch et al., 2011a; Bosch et al., 2011b; Lyras et al., 2011). Estos resultados obtenidos sobre modelo experimental se han llevado al escenario clínico con éxito (Mishra y Pavelko, 2006; Sánchez et al., 2007; Randelli et al., 2008; Filardo et al., 2010; Gaweda et al., 2010; Peerbooms et al., 2010; Castricini et al., 2011). Sin embargo, en otros estudios clínicos no se ha podido evidenciar ningún efecto beneficioso de la aplicación de PRP para incrementar el proceso de cicatrización del tendón (de Vos et al., 2010; Schepull et al., 2011). Estos resultados contradictorios han hecho que exista actualmente una gran controversia acerca de la utilidad clínica real de estos productos biológicos para el manejo terapéutico de patologías del tendón (Andía et al., 2010; Engebretsen et al., 2010; Kon et al., 2011; Paoloni et al., 2011).

2.1. Uso de PRGF en nuestro modelo experimental

Actualmente, el término PRP (Platelet-Rich-Plasma) se ha convertido es un término genérico y poco preciso que se emplea para englobar a una gran cantidad de productos biológicos obtenidos a partir de la propia sangre del paciente, y que presentan una concentración plaquetaria por encima de los niveles basales (Dohan Ehrenfest et al., 2009). En los últimos años, la ausencia de una estandarización adecuada y una nomenclatura precisa de estos diferentes productos biológicos, denominados todos como PRPs, ha dado lugar a la aparición de una enorme variedad de nomenclaturas diferentes, creando confusión entre la comunidad médica y científica (Anitua et al., 2009). En muchos casos, el mismo término PRP es aplicado para referirse a preparaciones obtenidas utilizando metodologías muy diferentes, y que dan como resultado productos biológicos que difieren considerablemente desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo (Anitua et al., 2009). Existen una serie de características clave de la metodología de obtención del PRP que pueden hacer variar considerablemente su composición tanto celular como de factores de crecimiento. Es fácil entender que una

variación en el protocolo de centrifugado, el tipo de anticoagulante usado durante la extracción de sangre, el tipo de activador plaquetario empleado, o la metodología de aislamiento del PRP, entre otras, van a dar como resultado un producto biológico con diferencias considerables en la concentración plaquetaria, concentración de factores de crecimiento, y presencia o ausencia de leucocitos y/o hematíes (Anitua et al., 2009). Indudablemente, la composición final del PRP va a influenciar el efecto biológico del producto, y por tanto su eficacia clínica (Anitua et al., 2009).

En nuestra Tesis Doctoral hemos empleado un tipo de PRP denominado PRGF, cuya metodología de obtención ha sido definida por el Dr. Eduardo Anitua y su grupo de colaboradores en el BTI[®] Biotechnology Institute de Vitoria (España). El término PRGF fue empleado por primera vez por Anitua en 1999 (Anitua, 1999). Este autor definió al PRGF como una fracción de plasma autólogo con una concentración plaquetaria ligeramente superior a la basal, libre de leucocitos y eritrocitos, aislada mediante un proceso de centrifugación único y un posterior pipeteo fraccionado, y en la que se usa citrato sódico como anticoagulante y cloruro de calcio como activador plaquetario (Anitua et al., 2011a).

Una de las principales características del PRGF con respecto a otros PRPs es que el PRGF está libre de leucocitos, ya que durante el proceso de pipeteo se excluye el aspirado de la capa leucocitaria. Al no incluir los leucocitos, también se evitan los efectos proinflamatorios de las proteasas y citoquinas contenidas en el interior de los glóbulos blancos (Schnabel et al., 2007).

Otra de las características clave del PRGF es que presenta una concentración moderada de plaquetas, lo cual ha sido relacionado con un óptimo efecto biológico (Weibrich et al., 2004). En humanos, la metodología de obtención del PRGF produce una concentración plaquetaria de 3.6 veces los niveles basales y no contiene niveles detectables de leucocitos. Estos mismos autores también determinaron los niveles de una serie de factores de crecimiento en el PRGF (TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF, HGF, EGF, IGF-1 y trombospondina) mediante el empleo de kits ELISA, y encontraron que la concentración de factores de crecimiento en el PRGF era superior a la observada en el plasma (Anitua et al., 2011a). Estos niveles moderados de plaquetas diferencian el PRGF de otros PRPs en los cuales las concentraciones de plaquetas pueden llegar a ser incluso 7 – 9 veces la concentración encontrada en la sangre periférica (Appel et al.,

2002; Weibrich et al., 2002a; Weibrich et al., 2002b; Weibrich et al., 2003; Weibrich et al., 2005). Desafortunadamente, las concentraciones de plaquetas y factores de crecimiento en el PRGF de oveja no han sido publicadas a día de hoy, y en nuestro estudio experimental no se pudieron determinar.

El protocolo de centrifugado único y pipeteo fraccionado para el aislamiento del PRGF fue realizado siguiendo estrictamente la metodología de la casa comercial que definió el PRGF (PRGF-Endoret[®], BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, Spain). Esta misma metodología ya ha sido empleada previamente en otros estudios tanto clínicos como experimentales (Anitua et al., 2009; Sánchez et al., 2009a; Sánchez et al., 2010; Anitua et al., 2011a; Orcajo et al., 2011; Wang-Saegusa et al., 2011). En el caso de la especie humana, el protocolo de centrifugado es de 460G durante 8 minutos (Anitua et al., 2009c). Sin embargo, en la especie ovina el protocolo de centrifugado recomendado por Anitua y colaboradores es de 630G durante 8 minutos (Anitua et al., 2006b). Estos cambios en los parámetros del centrifugado se deben a las diferencias existentes entre la densidad de los componentes hemáticos de las diferentes especies.

La metodología de obtención del PRGF resultó sencilla, rápida, económica y fiable. Una de las principales preocupaciones que pueden surgir cuando se emplean protocolos de obtención de PRP abiertos es la contaminación bacteriana (Vasconcelos et al., 2003). Tal y como recomienda la casa comercial que desarrolló el PRGF, todos los procedimientos de pipeteo y fraccionamiento del PRGF se realizaron en una campana de flujo laminar. En nuestro estudio, tras la infiltración de PRGF no se observó la aparición de infección en la zona de aplicación en ninguno de los animales, por lo que podemos decir que el PRGF resultó ser un producto biológicamente seguro en este estudio experimental. En un estudio clínico previo, en el que se incluyeron un gran número de pacientes y se empleó una metodología abierta para el aislamiento del PRP, no se observó tampoco infección asociada a la aplicación del PRP (Vasconcelos et al., 2003).

2.2. Pauta de administración del PRGF

En nuestro trabajo experimental se realizó una infiltración de PRGF intraoperatoria en cada uno de los bordes tendinosos seccionados. Esta primera

infiltración fue realizada mediante la visualización directa del tendón por parte del cirujano. Posteriormente, se realizaron infiltraciones semanales de la zona de reparación tendinosa. Estas infiltraciones postoperatorias se realizaron siempre bajo control ecográfico. En nuestro estudio se consiguió una buena visualización ecográfica de la zona lesionada durante los exámenes ecográficos, y la administración ecoguiada del PRGF resultó precisa. Estas inyecciones postoperatorias ecoguiadas de PRGF se llevaron a cabo con el animal bajo sedación, y realizando previamente una limpieza de la piel que recubría al tendón. En un trabajo experimental publicado recientemente sobre cadáveres, se evaluó la precisión de diferentes técnicas de inyección de PRP en el tendón de Aquiles, y se observó que la inyección ecoguiada conseguía una colocación precisa de PRP en el área de reparación (Wiegerinck et al., 2011).

Aunque existen varios estudios tanto clínicos como experimentales donde se emplea una aplicación única de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas (Schnabel et al., 2007; de Vos et al., 2010; Schepull et al., 2011), en nuestro estudio experimental hemos aplicado inyecciones semanales de PRGF durante las tres semanas siguientes a la cirugía. Este protocolo de inyección fue elegido en base a que en condiciones clínicas se suelen llevar a cabo inyecciones repetidas de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas, y a un estudio experimental previo de Anitua y colaboradores (2006) en el cual se evaluó el efecto de inyecciones semanales de PRP sobre el tendón de Aquiles sano de ovejas, y en el cual se emplearon inyecciones repetidas de PRGF (Anitua et al., 2006b).

El hecho de realizar una punción para infiltrar PRGF o solución salina en el tendón lleva consigo un daño tendinoso por la propia inyección y ruptura del peritendón, y por el efecto expansivo que el producto inyectado ejerce en el seno del tendón. Para intentar minimizar el daño tendinoso secundario a la inyección, se emplearon agujas de bajo calibre (23G), y se realizó una punción única y de manera ecoguiada para ser más precisos a la hora de colocar el producto inyectado. El daño debido a la inyección es inevitable si queremos realizar una infiltración intratendinosa de PRGF. Esta agresión al tendón puede producir un ligero efecto deletéreo sobre el proceso de cicatrización tendinosa, pero este mismo daño se produce en los tendones de todos los grupos experimentales, de modo que la agresión será la misma para los tendones tratados con PRGF y para los tendones del grupo salino.

La aplicación de PRGF en nuestro estudio fue en forma de infiltración intratendinosa, siguiendo la metodología de un estudio previo donde también se empleó esta ruta de administración (Anitua et al., 2006b). En el ámbito clínico del tratamiento de problemas tendinosos con PRGF, la administración intratendinosa probablemente sea la que se emplea con mayor frecuencia (de Vos et al., 2010; Schepull et al., 2011). Conviene recordar que el PRGF también se puede administrar en forma gelificada, o en forma de redes de fibrina directamente sobre la zona del defecto tendinoso en el caso de cirugía abierta de reparación del tendón (Sánchez et al., 2007). Recientemente también se ha descrito la colocación de PRP gelificado a través de artroscopia en casos de reparación de los tendones del manguito rotador (Randelli et al., 2011). Incluso existe la opción de inyectar el PRP en forma inactivada, y permitir que se active *in situ* al contactar con las fibras de colágeno.

Desafortunadamente, actualmente existen bastantes interrogantes con respecto a la formulación idónea de PRGF (concentración plaquetaria, presencia/ausencia leucocitos, concentración de factores de crecimiento, ratio factores de crecimiento). Estudios futuros deberían esclarecer qué composición o formulación de PRGF produce unos mejores efectos biológicos. Además, también es necesario determinar qué forma de administración de PRGF (en forma líquida, en forma de gel, activado/inactivado) produce mejores resultados. El tiempo óptimo entre aplicaciones, así como el volumen ideal de PRGF a inyectar en cada aplicación sigue siendo, a día de hoy, una incógnita. Probablemente no exista una respuesta única para cada una de estas cuestiones, y es posible que estos parámetros dependan de buena medida del tejido que estemos tratando (Tendón vs. Hueso vs. Músculo), el tipo de patología tratada (Traumática Vs. Degenerativa), o incluso del estadio clínico de la patología a tratar (Sobreaguda Vs. Aguda Vs. Crónica). Otra de las cuestiones que deberá ser abordada en estudios futuros será la determinación de qué tipo de patologías responden mejor al tratamiento con PRGF (Andía et al., 2010).

3. Evaluación anatomopatológica del efecto del PRGF en el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral fue la evaluación anatomopatológica del efecto que la infiltración tendinosa de PRGF tiene sobre el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles. Para ello se realizó una evaluación macroscópica de la zona lesionada y exámenes microscópicos del área de reparación.

3.1. Evaluación macroscópica

Cuando se evalúa desde el punto de vista macroscópico el proceso de cicatrización de un tendón, es necesario considerar una serie de parámetros anatomopatológicos que pueden llegar a tener importantes consecuencias clínicas como son la formación de adherencias entre la zona de reparación tendinosa y los tejidos adyacentes (Thomopoulos et al., 2010), el grado de unión de los bordes tendinosos, el grosor del tendón y el aspecto del tejido de reparación.

En nuestro estudio experimental se observó una intensa formación de adherencias en torno a la zona de reparación tendinosa. No se detectaron diferencias significativas entre los tendones tratados con PRGF y los infiltrados con salino. Una posible explicación a esta formación de adherencias en todos los animales puede deberse a la inmovilización del tarso de los animales durante todo el periodo de postoperatorio. Existen estudios donde se ha puesto de manifiesto que la movilización precoz del tendón reparado disminuye de manera importante la formación de adherencias (Wada et al., 2001). En un estudio experimental de donde se llevó a cabo la sección del tendón flexor digital superficial sobre un modelo canino se observó que la administración de bFGF exógeno indujo una mayor formación de adherencias (Thomopoulos et al., 2010).

En todos los tendones se observó una buena unión macroscópica de los bordes tendinosos, tanto a las 4 como a las 8 semanas, sin que se observasen diferencias entre los animales tratados con PRGF o con salino. En el examen macroscópico de un estudio experimental donde se practicó una tenectomía del tendón de Aquiles se observó que los animales acababan cicatrizando la tenotomía a los 3 meses de la cirugía incluso sin la sutura del tendón (Bruns et al., 2000). En este mismo estudio, los autores describieron que el diámetro del tendón de Aquiles operado tenía un grosor 4 veces mayor que el tendón contralateral a los 3 meses de la cirugía. Este grosor fue disminuyendo progresivamente a lo largo del tiempo, hasta que al año de la cirugía existía un grosor similar entre el tendón operado y el contralateral (Bruns et al., 2000). En nuestro estudio sin embargo, el grosor macroscópico del tendón operado no se llegó a incrementar por encima de 2.5 veces en comparación con el tendón contralateral en ninguno de los animales. El menor grosor observado en nuestro estudio experimental podría ser explicado porque en nuestro caso se suturó la tenotomía, lo que permitió que la cicatrización se hiciese de manera más precisa y con menos formación de tejido de reparación.

Los tendones infiltrados con PRGF presentaron una mejor apariencia macroscópica del tejido de cicatrización que los tendones infiltrados con solución salina a las 8 semanas del estudio. A este tiempo, el tejido de reparación de los tendones infiltrados con PRGF presentó un aspecto fibrilar, muy similar al que se observaba en las zonas con fibras tendinosas normales. Como veremos a continuación, esta mejoría macroscópica del tejido de reparación se vio refrendada por mejorías a nivel microscópico.

3.2. Evaluación histoquímica

Para evaluar histológicamente el proceso de cicatrización tendinosa tras un daño agudo es necesario estudiar cuatro aspectos importantes de la histología del tendón: morfología de los fibroblastos, organización de las fibras de colágeno, densidad de fibroblastos, respuesta vascular, y respuesta inflamatoria. En esta Tesis Doctoral se estudiaron cada uno de estos aspectos por separado y de una manera objetiva, empleando para ello métodos de cuantificación y análisis asistidos por ordenador.

3.2.1. Morfología de los fibroblastos

La célula residente del tendón es el tenocito. Estas células son un tipo especial de fibrocitos que se encargan de mantener la homeostasis del tejido tendinoso, y constituyen aproximadamente el 90 – 95% de los componentes celulares del tendón sano (Kannus, 2000). Los tenocitos se caracterizan morfológicamente por poseer un núcleo muy elongado o fusiforme, que ocupa prácticamente la totalidad de la célula. Estas células, aunque son metabólicamente activas, lo son en mucha menor medida que los tenoblastos. Los tenoblastos son un tipo de fibroblasto residente en el tejido tendinoso. En condiciones normales, en el tejido tendinoso apenas se observan tenoblastos, pero tras un daño o en un tendón patológico, el tenoblasto o fibroblasto se convierte en la célula dominante (Kannus, 2000). Estos fibroblastos se pueden originar a partir de la proliferación celular de tenoblastos residentes del tendón (principalmente a nivel del peritendón), o bien pueden proceder de tejidos adyacentes y migrar hacia el foco de lesión merced al estímulo quimiotáctico de los mediadores inflamatorios y los factores de crecimiento liberados por las plaquetas y los macrófagos (Hope y Saxby, 2007). Estos fibroblastos se caracterizan por poseer un núcleo mucho más ovalado y presentar una tasa metabólica más alta que la de los tenocitos (Kannus, 2000). En el tendón normal, el núcleo del tenocito se encuentra comprimido entre los haces de colágeno, lo que fomenta que tengan esa morfología tan alargada, y hace que se dispongan perfectamente alineados con el eje longitudinal del tendón (Kannus, 2000). Cuando se produce un daño tendinoso, la imagen histológica del tendón cambia radicalmente. Los fibroblastos se convierten en los protagonistas, y se disponen de manera aleatoria y errática en el tejido lesionado. A medida que va evolucionando el proceso de cicatrización, estos fibroblastos se van alineando progresivamente con respecto al eje longitudinal del tendón (Hope y Saxby, 2007). Junto con esta reorganización progresiva de los fibroblastos, se produce un cambio en la morfología del núcleo de estas células. La tasa metabólica de los fibroblastos va disminuyendo progresivamente a medida que avanza el proceso de cicatrización tendinosa, y esto de

acompaña de un aspecto más elongado del núcleo (Kannus, 2000). De esta manera, estudiando la morfología del núcleo y la orientación de los fibroblastos con respecto al eje longitudinal del tendón nos podemos hacer una idea objetiva de cómo está evolucionando el proceso de cicatrización tendinosa.

El estudio de la morfología o morfometría del núcleo celular se ha empleado para definir determinadas características celulares, sobre todo relativas al grado de atipia de las neoplasias (Sala et al., 1994; Kirillov et al., 2001; Cui et al., 2007). Existen determinadas medidas morfométricas del núcleo de los fibroblastos que pueden ser cuantificadas de una manera objetiva con ayuda de un programa de análisis de imagen microscópica (Image Pro Plus[®] versión 6.0, Media Cybernetics Inc., Bethesda MD, EEUU). En un estudio previo se han empleado datos morfométricos cuantitativos del núcleo de los fibroblastos para evaluar el proceso de cicatrización tendinoso (Hou et al., 2009a). Hou y colaboradores (2009) evaluaron en su estudio de cicatrización del tendón de Aquiles de conejo dos parámetros morfométricos muy interesantes del núcleo de los fibroblastos: aspecto nuclear [*nuclear aspect ratio* (NAR)] y orientación nuclear [*nuclear orientation angle* (NOA)] (Hou et al., 2009a). Estos dos parámetros proporcionan una idea muy acertada acerca de la morfología del núcleo de los fibroblastos, así como de la orientación de los mismos con respecto al eje longitudinal del tendón. Aparte de estos dos parámetros morfométricos, en nuestro estudio también se determinó el área (μm^2), perímetro (μm), eje mayor (μm), eje menor (μm), y factor forma del núcleo de los fibroblastos.

El parámetro NAR se definió como la relación existente entre el eje menor y el eje mayor del núcleo del fibroblasto (eje menor / eje mayor). A medida que este valor se aproximaba a cero, sugería una forma más alargada del núcleo; mientras que cuanto más cercano a uno sea este valor, más redondeada sería la forma del núcleo (Hou et al., 2009a). El valor de NAR en los tenocitos del tendón normal fue 0.07 ± 0.01 , lo que nos sugería la típica morfología fusiforme y alargada del núcleo de estos tenocitos. Como era de esperar, tras la cirugía se produjo un importante incremento de este parámetro en todos los grupos de estudio. El incremento en el valor NAR nos indicaba la presencia de un núcleo más ovalado (más típico de fibroblastos). En los animales que se eutanasiaron a las 4 semanas de la cirugía se observó que los tendones tratados con PRGF presentaban un aspecto nuclear menor en comparación con los tendones del grupo salino. Esta diferencia entre ambos grupos experimentales se hizo más manifiesta a las 8

semanas de la cirugía, observando que los núcleos de los fibroblastos de los tendones infiltrados con PRGF presentaron un aspecto nuclear menor que los del grupo salino. Este hallazgo nos indica que el tratamiento con PRGF hace que los núcleos de los fibroblastos presenten una morfología más fusiforme a las 8 semanas, en comparación con los fibroblastos expuestos a solución salina. Estos fibroblastos más alargados presentaban por tanto una morfología nuclear más madura, lo que nos indica que el proceso de cicatrización se encontraba en un estadio más avanzado que en el caso de los tendones infiltrados con solución salina. Spang y colaboradores (2011) también encontraron en su estudio experimental de sección del tendón rotuliano en ratas que los fibroblastos de los tendones en los que se aplicó PRP presentaron una morfología más alargada a las 2 semanas de la cirugía (Spang et al., 2011).

El parámetro NOA se definió como el ángulo existente entre el eje mayor del núcleo del fibroblasto y el eje longitudinal del tendón. Valores cercanos a 0° indicaban que el núcleo del fibroblasto estaba alineado con el eje longitudinal del tendón, mientras que valores extremos de 90° indicaban que la orientación del núcleo del fibroblasto era perpendicular al eje longitudinal del tendón (Hou et al., 2009a). Un estudio experimental *in vitro* puso de manifiesto que los fibroblastos correctamente alineados producían matriz extracelular correctamente alineada, y por tanto con unas mejores propiedades biomecánicas del tejido conectivo neoformado (Wang et al., 2003). En el caso del tejido tendinoso, el hecho de que los fibroblastos produzcan fibras de colágeno correctamente alineadas a lo largo del eje longitudinal del tendón se traduce en una mejor estructuración de los haces de colágeno, y por tanto unas mejores propiedades biomecánicas (Sharma y Maffulli, 2005a). Los tenocitos de los tendones normales presentaron una orientación nuclear de apenas 2.7°, lo que indicaba que las células se disponían perfectamente paralelas a lo largo del eje longitudinal del tendón. A las cuatro semanas de la cirugía se observó que tanto en los tendones infiltrados con solución salina como en los tratados con PRGF se había incrementado considerablemente el valor NOA, lo que nos indicaba que los fibroblastos habían perdido parcialmente su orientación a lo largo del eje longitudinal del tendón. En estos primeros estadios de la cicatrización tendinosa, el fibroblasto presenta una alta actividad metabólica y una intensa producción de matriz extracelular. Estas proteínas estructurales en un primer momento rellenan el defecto tendinoso y mantienen unidos los bordes de la tenotomía (Kannus, 2000). En los animales sacrificados a las 8 semanas de la cirugía se observó

que los núcleos de los fibroblastos de los tendones tratados con PRGF presentaban una orientación nuclear significativamente mejor que la observada en los fibroblastos de los tendones del grupo salino. Este hallazgo morfométrico nos indicaba que los fibroblastos de los animales tratados con PRGF presentaban un estadio evolutivo más avanzado que los tendones infiltrados con solución salina. Lyras y colaboradores (2009) encontraron en un modelo experimental de sección del ligamento rotuliano en conejo, que los fibroblastos de los tendones tratados con PRP presentaban una mejor orientación que los fibroblastos de los tendones del grupo control a las 4 semanas (Lyras et al., 2009a).

A las 8 semanas de la cirugía también se observaron diferencias estadísticamente significativas en otros parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos entre ambos grupo de estudio. Los tendones de los animales tratados con PRGF presentaron un eje mayor, eje menor, factor forma y perímetro más parecido al observado en los tenocitos del tendón normal. Estos hallazgos morfométricos, junto con los datos referentes al aspecto nuclear y orientación nuclear, nos indicaban que el tratamiento con PRGF produjo en los fibroblastos un aspecto más maduro que el observado en los fibroblastos tratados con solución salino, sobre todo a las 8 semanas de la cirugía.

3.2.2. Densidad de fibroblastos

La densidad de fibroblastos es otro parámetro clave a la hora de evaluar el proceso de cicatrización del tendón. Además, se trata de un parámetro cuantificable, y por tanto permite una evaluación y comparación objetiva y precisa de los resultados. Existen diversos estudios en los que, al igual que en el nuestro, se ha estudiado la densidad de fibroblastos en tendón tras la administración de PRGF (Anitua et al., 2006b; Anitua et al., 2009c; Lyras et al., 2009a; Spang et al., 2011). La celularidad del tendón (refiriéndonos a la densidad de fibroblastos) varía a lo largo del periodo de cicatrización, de manera similar a como evoluciona en el proceso cicatricial de otros muchos tejidos. El tendón es un tejido con una densidad celular relativamente baja, ya que es su mayor parte está compuesto por haces de colágeno altamente empaquetados (Kannus, 2000). En nuestro estudio experimental se determinó que la densidad de fibroblastos en el tendón de Aquiles normal de la oveja fue 227.78 ± 97.81 fibroblastos/mm². Esta densidad celular es similar a la observada por otros autores en el tendón de Aquiles sano de ovejas (Anitua et al., 2006b). Cuando el tendón sufre un

daño tisular se produce una respuesta inflamatoria, que pone en marcha los mecanismos quimiotácticos y proliferativos para que se produzca un crecimiento exponencial de la densidad celular en la zona de cicatrización (Sharma y Maffulli, 2005a; Hope y Saxby, 2007). Tras esta primera fase inflamatoria, comienza la fase proliferativa de la cicatrización. Durante esta segunda fase, que puede durar varias semanas, se produce un incremento progresivo en la celularidad del tendón, alcanzándose un pico máximo en torno a la 3ª – 4ª semana del daño. A partir de entonces, los procesos proliferativos dan paso a los procesos de reorganización y maduración tisular, y el tejido cicatricial va disminuyendo progresivamente su contenido celular en favor de una mayor cantidad y organización del tejido extracelular. Esta última fase de maduración y remodelación del tejido cicatricial puede durar meses o incluso años (Sharma y Maffulli, 2005a; Hope y Saxby, 2007).

En nuestro estudio experimental, la eutanasia de los animales se realizó a las 4 y a las 8 semanas de la cirugía. A las 4 semanas de la cirugía nos encontraríamos en una fase proliferativa de la cicatrización, donde ya se habría alcanzado el pico teórico máximo de celularidad, y la densidad celular habría empezado a descender progresivamente. A las 8 semanas de la cirugía el proceso de cicatrización se encontraría en los primeros estadios de la fase de maduración, y por tanto estaríamos en un periodo donde la densidad celular va disminuyendo progresivamente a medida que pasa el tiempo (Fig. 124).

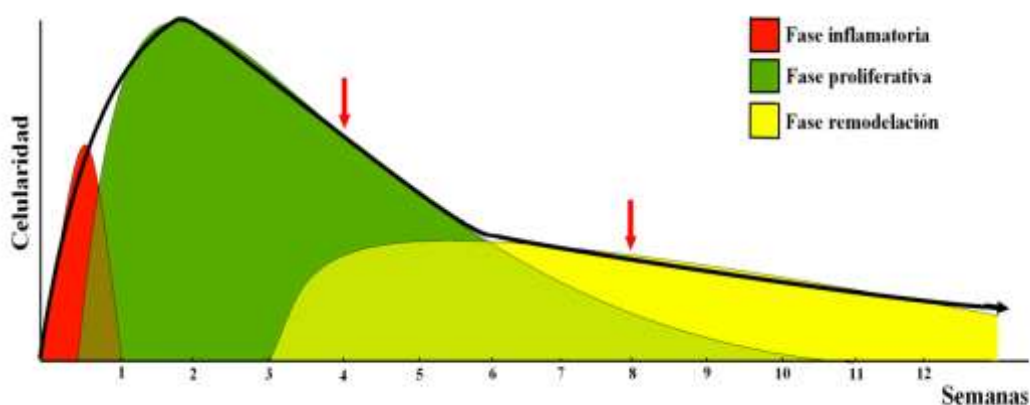


Fig. 124. Evolución de la celularidad a lo largo del tiempo, y durante las diferentes fases de la respuesta cicatricial. Los tiempos a los que se realizaron los sacrificios en nuestro estudio experimental (4 semanas y 8 semanas) se han marcado con una flecha roja.

En nuestro estudio experimental hemos observado que tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía, la densidad de fibroblastos existente en los tendones infiltrados con PRGF era significativamente menor que la observada en los tendones del grupo salino. Este hallazgo histológico, unido a la presencia de unos fibroblastos con una morfología más madura, nos indicaba que el tratamiento con PRGF aceleraba el proceso cicatricial del tendón, de modo que tanto a las 4 como a las 8 semanas de la cirugía la cicatrización de los tendones tratados con PRGF iba por delante de la de los tendones del grupo salino.

Lyras y colaboradores (2009) han observado a las cuatro semanas de la cirugía unos resultados similares a los nuestros con respecto a la densidad celular del tejido cicatricial tras el tratamiento con PRP en un modelo experimental de sección del tendón rotuliano de conejo (Lyras et al., 2009a). En cambio, Spang y colaboradores (2011) no observaron que los animales tratados con PRP presentasen diferencias con respecto a la celularidad en un estadio más precoz del proceso de cicatrización (2 semanas tras la cirugía), usando un modelo experimental de sección del tendón rotuliano en rata (Spang et al., 2011).

Estudios experimentales *in vitro* han puesto de manifiesto que el PRP es un potente agente estimulante de la proliferación de los fibroblastos (de Mos et al., 2008; Anitua et al., 2009b). En nuestro estudio, al observarse que tanto a las 4 como a las 8 semanas existe una menor densidad de fibroblastos en los animales tratados con PRGF, puede parecer que no existe un efecto proliferativo por parte del PRGF. Sin embargo, es necesario encuadrar estos resultados dentro de un contexto *in vivo*, y no *in vitro*, donde además del efecto de los factores de crecimiento existen otros muchos estímulos humorales que modulan la respuesta cicatricial. Además, en nuestro estudio hemos evaluado la densidad de fibroblastos a las 4 y 8 semanas, tiempos en los que ya ha pasado la fase más activa del periodo proliferativo. Puede ser que en estadios más precoces (primera o segunda semana tras la cirugía), la aplicación de PRGF *in vivo* muestre un efecto más claramente proliferativo sobre los fibroblastos.

Anitua y colaboradores (2006) realizaron un estudio experimental en el cual inyectaron PRGF (siguiendo la misma metodología de preparación y la misma pauta de administración que la empleada en nuestro estudio) en el tendón de Aquiles de ovejas sanas. Estos autores encontraron que a las cinco semanas del comienzo de los

tratamientos, los tendones tratados con PRGF presentaban una densidad celular significativamente mayor que la observada en los tendones del grupo salino y del grupo no tratado (Anitua et al., 2006b). Estos autores, al contrario que nosotros, encontraron que las aplicaciones de PRGF producían un efecto proliferativo sobre los fibroblastos del tendón. Sin embargo, es importante destacar el hecho de que el estudio del Dr. Anitua y colaboradores (2006) se llevó a cabo en tendones intactos, en los cuales no se había inducido ningún tipo de daño quirúrgico. En nuestro estudio, los tendones de Aquiles eran sometidos a una tenotomía y a una posterior reparación quirúrgica de esta tenotomía. Este intenso daño tendinoso induce una fuerte respuesta proliferativa en el tendón de Aquiles (Sharma y Maffulli, 2005a; Hope y Saxby, 2007), independientemente de la aplicación de PRGF o solución salina. Por tanto nuestro modelo experimental difiere sustancialmente del modelo experimental planteado por Anitua y colaboradores (2006), ya que cuando nosotros aplicamos los tratamientos con PRGF ya existe una importante respuesta proliferativa de base en el tendón. Si valoramos los dos trabajos en común, podemos decir que las aplicaciones de PRGF actúan de manera diferente en el tendón intacto y en el tendón patológico, de manera que en el tendón intacto ejercen un efecto proliferativo sobre los fibroblastos, mientras que en el tendón patológico producen una aceleración del proceso de cicatrización.

3.2.3. Organización de las fibras de colágeno

El tendón está constituido en su mayor parte por fibras de colágeno (principalmente colágeno de tipo I) densamente empaquetadas y paralelas entre sí (Kannus, 2000). Buena parte de las propiedades biomecánicas del tendón están íntimamente relacionadas con la estructura de las fibras de colágeno, de modo que para que un tendón sea funcional debe de conservar la organización de sus fibras de colágeno (Sharma y Maffulli, 2005a). Cuando un tendón se rompe, o se ve sometido a una agresión, se produce una intensa desestructuración de sus fibras de colágeno. Durante el proceso de cicatrización, se produce una reorganización progresiva de los haces de colágeno. Por ello, la evaluación del grado de organización de estas fibras de colágeno nos puede dar una buena idea de cómo está evolucionando el proceso de cicatrización en el tendón (Platt, 2005; Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007).

En este trabajo experimental se estudiaron dos parámetros importantes que definen la estructuración histológica de las fibras de colágeno del tendón. Uno de estos parámetros fue el grado de compactación de las fibras de colágeno, y el otro fue el grado de orientación de las fibras de colágeno. Ambos parámetros han sido usados previamente para evaluar el grado de organización de los haces de colágeno en el proceso de cicatrización del tendón y ligamento (Murray et al., 2007; Casalechi et al., 2009; Oemeroglu et al., 2009). El primero de estos parámetros nos indicaba cómo de empaquetadas están las fibras de colágeno que componen el tendón, de manera que a mayor madurez del proceso cicatricial cabe esperar un mayor grado de compactación de estas fibras. El segundo de los parámetros nos indicaba la disposición de las fibras de colágeno en el seno de la zona cicatricial. En un primer estadio del proceso de cicatrización, las fibras de colágeno se disponen de forma anárquica, y a medida que va madurando la reparación, las fibras de colágeno se disponen paralelamente al eje de carga del tendón, para así optimizar sus propiedades biomecánicas (Platt, 2005; Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007).

Para facilitar la evaluación histológica de la organización del colágeno se empleó la técnica de tinción histoquímica Tricrómico de Masson, que tiñe de color azul los haces de colágeno, y ha sido empleada en numerosos trabajos experimentales para estudiar el proceso de cicatrización en el tendón (Fowble et al., 2006; Casalechi et al., 2009; Lyras et al., 2009a).

En nuestro estudio experimental, los tendones de los grupos PRGF presentaron tanto un mayor grado de compactación como una mejor orientación de los haces de colágeno, a las 4 y a las 8 semanas de la cirugía. Estos resultados obtenidos ponen de manifiesto que la infiltración con PRGF produjo una mejor organización de las fibras de colágeno, y consiguió que el proceso de cicatrización de los tendones tratados con PRGF presentase un aspecto histológico más maduro y avanzado que el observado en los tendones del grupo salino.

Unos resultados similares fueron obtenidos en el trabajo de Lyras y colaboradores (2009). Estos investigadores encontraron que la aplicación de PRP en un modelo experimental de sección del tendón rotuliano produjo a las 4 semanas de la cirugía un tejido cicatricial más maduro y con una mejor organización de las fibras de colágeno (Lyras et al., 2009a). Aspenberg y Virchenko (2004) también observaron que

el tratamiento con PRP daba como resultado un tejido fibroso más maduro a las tres semanas de la cirugía, en su modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en rata (Aspenberg y Virchenko, 2004). Sin embargo, Spang y colaboradores (2011) no encontraron diferencias significativas en la orientación de las fibras de colágeno a las dos semanas de la cirugía con la aplicación de PRP, en un modelo experimental de sección del tendón rotuliano en rata (Spang et al., 2011).

3.2.4. Respuesta vascular

El tendón sano es un tejido relativamente poco vascularizado, y esto explica en parte el bajo potencial de cicatrización que posee (Fenwick et al., 2002). En nuestro estudio experimental hemos cuantificado tanto la densidad de vasos sanguíneos como el diámetro de los mismos. El tendón de Aquiles de la oveja, en condiciones normales, presentó una densidad vascular muy baja (0.47 ± 0.66 capilares/ mm^2), y los pocos vasos capilares existentes eran de pequeño diámetro (5.50 ± 1.13 μm). Cuando se produce un daño tendinoso, al igual que ocurre en otros tejidos, se produce un rápido proceso de angiogénesis que proporciona células y nutrientes para que se puedan llevar a cabo los mecanismos de reparación tisular. A medida que evoluciona el proceso de reparación del tendón, el aporte vascular se hace menos necesario, y los vasos sanguíneos desaparecen progresivamente en favor de la producción de matriz extracelular (Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007; Lyras et al., 2009b).

Lyras y colaboradores (2009, 2010) han publicado dos trabajos en los que evalúan el efecto de las aplicaciones de PRP sobre la angiogénesis, tanto en un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en conejo (Lyras et al., 2009b), como en un modelo de defecto en el tendón rotuliano de conejo (Lyras et al., 2010a). En estos trabajos, los autores utilizan una metodología de cuantificación de la densidad vascular asistida por ordenador, similar a la descrita en nuestro trabajo experimental, con la salvedad que en estos estudios se emplean técnicas inmunohistoquímicas para marcar los vasos sanguíneos. Estos autores observaron que durante los primeros estadios del proceso de reparación del tendón (primera y segunda semana tras la cirugía), el PRP produjo un estímulo marcado de la angiogénesis, de modo que los animales tratados con PRP presentaron una densidad vascular significativamente mayor que los tendones del grupo salino (Lyras et al., 2009b; Lyras et al., 2010a). Sin embargo, en un periodo de

cicatrización tendinosa algo más avanzado (tercera y cuarta semana) observaron justo lo contrario, es decir, los tendones tratados con PRP presentaron una densidad vascular significativamente menor que los del grupo salino (Lyras et al., 2009b; Lyras et al., 2010a). En nuestro estudio, se ha observado algo parecido a lo que describieron Lyras y colaboradores (2009, 2010). A las cuatro semanas del estudio hemos observado de la densidad vascular de los tendones tratados con PRGF era menor que la de los tendones del grupo salino, aunque sin alcanzar diferencias significativas. A las 8 semanas la vascularización de los tendones infiltrados con PRGF fue significativamente menor que la de los tendones del grupo salino. Estos hallazgos hacen pensar que los tendones expuestos al PRGF experimentan un estímulo angiogénico precoz más intenso, que hace que tomen ventaja en el proceso de cicatrización, de modo que cuando se estudian histológicamente tanto a las cuatro como a las ocho semanas de la cirugía, presentan un aspecto histológico más maduro y avanzado, y por tanto con menor densidad de vasos sanguíneos.

En un estudio experimental llevado a cabo por Anitua y colaboradores (2006) se inyectó PRGF en el tendón de Aquiles intacto de ovejas, y estos autores observaron que a las cinco semanas del comienzo de las infiltraciones, los tendones tratados presentaban mayor densidad vascular que los tendones infiltrados con solución salina (Anitua et al., 2006b). Este hallazgo pone de manifiesto que la aplicación de PRGF puede ejercer un efecto angiogénico, si bien las aplicaciones de PRGF en este estudio se realizaron sobre tendones intactos. Bosch y colaboradores (2011) observaron que la aplicación de PRP producía una mayor densidad vascular a las 23 semanas de la inducción del daño en un modelo experimental de lesión tendinosa en caballo (Bosch et al., 2011a).

Con respecto al diámetro de los vasos sanguíneos, en nuestro estudio hemos observado que a las cuatro semanas, los tendones infiltrados con PRGF presentaban un calibre ligeramente superior al observado en los tendones del grupo salino, aunque estas diferencias no fueron significativas. Sin embargo, a las 8 semanas del estudio, los vasos sanguíneos de los tendones infiltrados con PRGF presentaron un menor diámetro que los del grupo salino. Este hallazgo está en consonancia con los resultados observados con respecto a la densidad vascular, y nos estaría indicando un proceso de regresión vascular más avanzado, y por tanto un estadio de cicatrización más avanzado en los animales tratados con PRGF.

3.2.5. Evaluación de la infiltración inflamatoria

Cuando se produce un daño en el tendón, las primeras células que acuden al foco de lesión son los neutrófilos. A continuación, son los macrófagos los que toman el mando de la respuesta inflamatoria, y se encargan de orquestar el proceso de reparación tisular mediante la liberación de diversos factores de crecimiento y citoquinas (Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007). Las plaquetas juegan un papel importante en la modulación de la inflamación, ya que liberan citoquinas y son capaces de controlar el flujo de leucocitos hacia los tejidos lesionados (Andía et al., 2010). Estudios recientes han puesto de manifiesto que la respuesta inflamatoria puede determinar el éxito del proceso de reparación del tendón (Andía et al., 2010). La acumulación excesiva de neutrófilos en la zona de lesión puede exacerbar el daño tendinoso debido a la liberación de sustancias proinflamatorias tales como TNF- α , IFN- γ , IL-6 ó IL-1. Estas sustancias pueden inducir la destrucción de la matriz extracelular del tendón a través de la liberación de metaloproteasas tipo 1, 3 y 13 (John et al., 2010). Desafortunadamente, aún existen muchas lagunas en el conocimiento de cómo neutrófilos y macrófagos pueden influenciar en la calidad de la cicatrización tendinosa (John et al., 2010).

En nuestro estudio se evaluó el grado de infiltración inflamatoria en la zona de reparación tendinosa usando para ello una escala de valoración semicuantitativa. En los tendones normales no se observó infiltrado inflamatorio en ninguno de los animales. Los tendones infiltrados con PRGF presentaron un grado de infiltración inflamatoria estadísticamente menor que los tendones del grupo salino, tanto a las 4 como a las 8 semanas. Este interesante hallazgo histopatológico nos hace pensar que el PRGF puede ejercer un efecto antiinflamatorio en el foco de lesión. Otra hipótesis para explicar el menor grado de infiltración inflamatoria observada en los tendones infiltrados con PRGF podría estar relacionada con la aceleración del proceso de cicatrización inducido por la administración de este tratamiento. Es decir, los animales tratados con PRGF presentan un estadio de cicatrización más avanzado, y como consecuencia un menor grado de infiltración inflamatoria.

Recientemente, se ha evaluado el efecto de la aplicación de PRP en diferentes tejidos sanos de conejo, y se ha puesto de manifiesto que la aplicación de PRP puede inducir una respuesta inflamatoria sin que exista un daño previo en el tejido (Harris et al., 2012). Actualmente no existe ningún estudio experimental que evalúe el efecto del PRGF sobre la respuesta inflamatoria, y desconocemos si las aplicaciones de PRGF modulan o modifican de alguna manera la inflamación del tejido tendinoso lesionado (Andía et al., 2010). Sería necesario llevar a cabo estudios experimentales futuros para evaluar si la aplicación de PRGF ejerce un efecto antiinflamatorio, o modula en alguna manera la respuesta inflamatoria.

3.3. Evaluación inmunohistoquímica del colágeno tipo I y III

El tendón es un tejido compuesto fundamentalmente por matriz extracelular y poco contenido celular. Esta matriz extracelular está formada principalmente por proteínas de tipo estructural, donde destaca principalmente el colágeno (Kannus, 2000). En el organismo existen diversos tipos de colágeno, pero el tejido tendinoso está compuesto fundamentalmente por fibras de colágeno tipo I. También se observan algunas fibras de colágeno tipo III, pero en una proporción mucho menor. La correcta fibrogénesis del colágeno tipo I resulta fundamental para el buen funcionamiento del tendón (Sodersten et al., 2005). El colágeno de tipo I es el responsable de la fuerza mecánica del tejido tendinoso. El colágeno de tipo III presenta un papel importante en el proceso de cicatrización tendinosa, pero su presencia se asocia a una debilidad mecánica del tejido tendinoso, debido a que las fibras de colágeno de tipo III son más delgadas y distensibles que las de tipo I (Eriksen et al., 2002). El estudio inmunohistoquímico del tejido tendinoso procedente de pacientes con rotura del tendón de Aquiles mostró que estos tendones presentaban una mayor proporción de colágeno de tipo III (Jozsa y Kannus, 1997). Además, un estudio experimental *in vitro* mostró que los cultivos de tenocitos procedentes de tendones de Aquiles que habían sufrido rotura espontánea producían una mayor cantidad de colágeno tipo III, en comparación con los cultivos de tenocitos procedentes de tendones normales (Maffulli et al., 2003). Tras una lesión tendinosa, la síntesis de colágeno de tipo III se incrementa y forma uniones interfibrilares irregulares que contribuyen a la estabilidad precoz de la zona de lesión, mientras que se va sintetizando gradualmente el colágeno de tipo I, que es el que

restaurará las propiedades biomecánicas del tendón lesionado (McCarrel y Fortier, 2009). La cicatriz tendinosa estará compuesta por una cantidad anormalmente alta de colágeno de tipo III, que no se estructura en forma de haces y presenta un patrón fibrilar no lineal que disminuye de manera importante las propiedades biomecánicas de ese tejido (McCarrel y Fortier, 2009).

En nuestro trabajo experimental hemos realizado un estudio inmunohistoquímico para la detección de colágeno tipo I y colágeno tipo III en el proceso de cicatrización tendinosa. Crovace y colaboradores (2008) describieron el empleo de tinciones inmunohistoquímicas para la detección de estos tipos de colágeno en un modelo experimental de tendinitis del tendón de Aquiles de la oveja (Crovace et al., 2008). Los resultados de nuestro trabajo mostraron como a las 8 semanas de la cirugía, los tendones infiltrados con PRGF presentaron una mayor intensidad en la reacción inmunohistoquímica frente al colágeno de tipo I que los tendones del grupo salino, si bien a las 4 semanas no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. Con respecto al colágeno de tipo III, se observó que a las 4 semanas existía una mayor extensión de la reacción inmunohistoquímica en los tendones del grupo salino, sin embargo a las 8 semanas ambos grupos se homogeneizaron y no se detectaron diferencias significativas entre ambos. Estos interesantes resultados nos muestran que el tratamiento con PRGF podría minimizar la síntesis de colágeno tipo III en un primer estadio del proceso de reparación tendinosa, favoreciendo de esta manera las propiedades mecánicas del tendón. Posteriormente, a las 8 semanas de la cirugía, estos tendones tratados con PRGF presentaron una mayor intensidad de la reacción frente al anticuerpo de colágeno tipo I, que es el tipo de colágeno deseable en el proceso de cicatrización del tendón.

Diversos estudios experimentales *in vitro* han puesto de manifiesto que cuando los cultivos de tenocitos se exponen a PRP incrementan de manera significativa tanto la síntesis de colágeno de tipo I como tipo III (Anitua et al., 2006a; Schnabel et al., 2010; Zhang y Wang, 2010). Sin embargo, existe un estudio donde se informa que la exposición de los tenocitos a PRP disminuyó la expresión tanto de colágeno tipo I como de colágeno tipo III, pero sin afectar al ratio colágeno tipo I / tipo III (de Mos et al., 2008). McCarrel y Fortier observaron en un estudio *in vitro* que cuando exponían un cultivo de tenocitos a PRP, se incrementaba la síntesis de colágeno tipo I y disminuía la síntesis de colágeno tipo III (McCarrel y Fortier, 2009). En un estudio reciente, un

cultivo de células de tendón se expuso a PRGF, y no se observó un incremento significativo de la síntesis de procolágeno tipo I por parte de estas células (Anitua et al., 2009b). Desafortunadamente no existen otros estudios *in vivo*, aparte del nuestro, donde se evalúe la síntesis de los diferentes tipos de colágeno en el tejido tendinoso tras el tratamiento con PRGF.

4. Evaluación ecográfica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles tras la aplicación de PRGF

La ecografía es una técnica de gran importancia en el diagnóstico por imagen del sistema musculoesquelético, y su precisión es al menos equivalente a la resonancia magnética en el diagnóstico de anomalías tendinosas como la ruptura del tendón de Aquiles (Robinson, 2009). En nuestro estudio experimental hemos empleado la ecografía para realizar un seguimiento y monitorización semanal del proceso de cicatrización tendinosa. La ecografía es una técnica diagnóstica no invasiva, rápida, y económica, que nos permitió llevar a cabo una evaluación cómoda y fiable el proceso de cicatrización en nuestro modelo experimental. Los animales toleraron bien la manipulación necesaria para los exámenes ecográficos, simplemente con una ligera sedación. Bosch y colaboradores (2011) también han empleado con éxito los exámenes ecográficos periódicos para monitorizar a lo largo del periodo de estudio el proceso de cicatrización tendinosa en su modelo experimental en la especie equina (Bosch et al., 2011b).

La ecogenicidad del tejido tendinoso se relaciona fundamentalmente con el contenido y la densidad de colágeno, que es la proteína estructural más importante del tendón. En el tendón sano, las fibras de colágeno se encuentran densamente empaquetadas y organizadas siguiendo una arquitectura jerárquica a lo largo del eje longitudinal del tendón. Estas características del tejido hacen que exista una alta impedancia acústica, y como consecuencia una alta ecogenicidad, que hace que en la imagen ecográfica en corte transversal se vea como un punteado hiperecoico, y en el

corte ecográfico longitudinal como un patrón fibrilar alineado con el eje longitudinal del tendón (van Schie et al., 2000). Cuando el tendón sufre una lesión, la estructura original de este tejido se ve afectada. Dependiendo de la intensidad del daño se pueden producir roturas de fibras de colágeno, hemorragias, edema, necrosis, lisis de las fibrillas y/o procesos inflamatorios. Durante las diferentes fases de la cicatrización, en la zona de la lesión tendinosa irá apareciendo tejido de granulación, que progresivamente irá evolucionando hacia tejido fibroso. Durante el periodo de maduración, este tejido fibroso se irá reorientando progresivamente de manera paralela al eje de carga del tendón (Platt, 2005; Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007). Durante todo este proceso de cicatrización se producen cambios en la microanatomía de la zona lesionada, que producirán cambios sustanciales en la ecogenicidad y arquitectura ecográfica del tendón (van Schie et al., 2000).

Esta pérdida, y posterior recuperación gradual en la ecogenicidad en el tejido tendinoso ha sido evaluada por diversos autores mediante el uso de escalas de valoración semicuantitativa (Reef, 2001). En nuestro estudio se empleó una escala de valoración semicuantitativa que evaluaba varios aspectos importantes del examen ecográfico del tendón: ecogenicidad del tendón, alineación de las fibras tendinosas (arquitectura del tendón), porcentaje de lesión en el área transversal (área transversal lesionada / área transversal total), y grosor del tendón lesionado en comparación con el tendón sano. Nuestros resultados mostraron que a las 8 semanas de la cirugía, los tendones tratados con PRGF presentaban una mejor valoración ecográfica que los tendones infiltrados con solución salina. Los exámenes ecográficos llevados a cabo en las semanas anteriores no mostraron diferencias entre ambos grupos de estudio. Esta mejoría desde el punto de vista ecográfico observada en los tendones tratados con PRGF a las 8 semanas de la cirugía estaba en consonancia con los resultados histológicos, y apoya la hipótesis de que el empleo de PRGF en casos de lesiones agudas del tendón de Aquiles produce una aceleración el proceso de cicatrización.

Además del empleo de una escala de valoración semicuantitativa, en nuestro estudio experimental se usaron métodos cuantitativos para evaluar el proceso de cicatrización del tendón desde el punto de vista ecográfico. Uno de estos sistemas cuantitativos fue el valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica. En nuestro estudio experimental no se observaron diferencias en el valor medio en la escala de grises del corte transversal del tendón entre ambos grupos de estudio. El hecho de no

observar diferencias en este parámetro a las 8 semanas de la cirugía entre los animales del grupo PRGF y del grupo salino no se ajusta a lo observado según la escala de valoración semicuantitativa. Además tampoco se ajustaría a lo observado en los exámenes histopatológicos. Algunos autores ya han apuntado que, aunque el valor medio en la escala de grises del corte transversal de la imagen ecográfica puede resultar de utilidad, este tipo de medida ecográfica no es suficientemente sensible como para evaluar objetivamente el estado general del proceso cicatricial del tendón (van Schie et al., 2000). Esto se debe a que el análisis cuantitativo del nivel de grises de la imagen ecográfica solo evalúa un aspecto de la ecogenicidad, conocido como intensidad, y obvia otros aspectos muy importantes como son la homogeneidad y la arquitectura del tejido tendinoso (van Schie et al., 2000). Además, este parámetro es muy dependiente de una correcta técnica ecográfica y una adecuada toma de imágenes, ya que cualquier angulación en el transductor puede dar lugar a valoraciones totalmente erróneas (van Schie et al., 2000). Por este motivo pensamos que en nuestro estudio experimental, el valor medio en la escala de grises de la imagen ecográfica del tendón no fue lo suficientemente sensible como para detectar diferencias entre ambos grupos de estudio.

El análisis computerizado de la imagen ecográfica llevada a cabo en nuestro estudio experimental nos permitió definir cuatro tipos diferentes de patrones ecogénicos existentes en el corte transversal de la imagen ecográfica. La metodología empleada en nuestro estudio está inspirada en los trabajos de van Schie y colaboradores (van Schie et al., 1999; van Schie y Bakker, 2000; van Schie et al., 2000; van Schie et al., 2001; van Schie et al., 2003; van Schie et al., 2009). Este autor ideó una ingeniosa metodología para evaluar el aspecto ecográfico del tendón de una manera objetiva a través del análisis informático de imágenes ecográficas transversales seriadas del tendón, identificando cuatro patrones ecográficos diferentes que se correspondían con unas características ecogénicas determinadas del tejido (van Schie et al., 2009). En nuestro estudio experimental también hemos identificado cuatro patrones ecogénicos diferentes, que se corresponden con definiciones ecográficas específicas en función de las características ecogénicas del tejido. La ecogenicidad tipo I se corresponde con áreas de ecogenicidad moderada con punteado hiperecoico (ecogenicidad normal del tendón); la ecogenicidad tipo II se corresponde con zonas de ecogenicidad de moderada a hiperecoica; la ecogenicidad tipo III se corresponde con áreas de hipoecoicas a

anecoicas, con una pobre demarcación; y por último, la ecogenicidad tipo IV se corresponde con áreas anecoicas (fluido inflamatorio, sangre).

En nuestro estudio experimental se observó que los tendones tratados con PRGF presentaron una mayor proporción de áreas con una ecogenicidad tipo I en el corte transversal que en los tendones del grupo salino, en la 7ª, y sobre todo en la 8ª semana tras la cirugía. Con respecto a los patrones ecogénicos que nos informaban de un peor aspecto ecográfico, es decir los patrones ecogénicos de tipo III y tipo IV, se observó que a las 8 semanas, los tendones infiltrados con PRGF presentaban menor proporción de estos. Estos hallazgos nos indicaban que el tratamiento con PRGF había producido una mejoría en el aspecto ecográfico de los tendones a las 8 semanas de la cirugía.

Los hallazgos detectados con el análisis computerizado de la imagen ecográfica están en consonancia con los resultados observados mediante la evaluación ecográfica empleando una escala de valoración semicuantitativa, y a su vez también estarían de acuerdo con lo observado en los exámenes histológicos del tendón.

La mayor proporción de áreas con ecogenicidad tipo I, y la menor proporción de las de tipo III y IV en los tendones del grupo PRGF a las 8 semanas de la cirugía sugieren que el PRGF aceleró la organización de la matriz extracelular de colágeno y fomentó su compactación y alineamiento a lo largo del eje longitudinal del tendón. El examen histopatológico de los tendones también mostró una mejoría con respecto a la organización de las fibras de colágeno en los tendones tratados a las 4 semanas en los tendones del grupo PRGF. Sin embargo, ni el análisis computerizado de la imagen ecográfica, ni la evaluación mediante escala de valoración semicuantitativa han detectados diferencias estadísticamente significativas a este tiempo más precoz entre ambos grupos de estudio. Este hecho puede deberse a que la evaluación ecográfica no fue lo suficientemente sensible y precisa como para detectar las diferencias histológicas existentes a las 4 semanas de la cirugía, donde el tejido de reparación aún no estaba tan maduro como a las 8 semanas.

Nuestro resultados ecográficos con respecto al efecto del PRGF en el proceso de cicatrización del tendón son similares a los publicados por Bosch y colaboradores en 2011 (Bosch et al., 2011b). Estos autores emplearon un modelo de daño tendinoso en el tendón flexor digital superficial de caballos y aplicaron PRP o salino, según el grupo de estudio. A continuación hicieron un seguimiento ecográfico del proceso de

cicatrización, empleando un análisis computerizado de la imagen ecográfica, según la metodología descrita por van Schie y colaboradores (2009) (van Schie et al., 2009). Existen importantes diferencias metodológicas entre el estudio de Bosch y colaboradores (2011) y nuestro trabajo. Nuestro modelo experimental fue una tenotomía completa del tendón de Aquiles, mientras que Bosch y colaboradores (2011) practicaron simplemente un defecto en el tendón. Además, la metodología de aislamiento del PRP empleada por estos autores difiere de la descrita en nuestro trabajo, y ellos emplearon una aplicación única de PRP mientras que nosotros hicimos aplicaciones repetidas. A pesar de estas diferencias metodológicas, Bosch y colaboradores (2011) observaron, al igual que nosotros, que los tendones tratados con PRP presentaron un mejor aspecto ecográfico que los tendones del grupo control (Bosch et al., 2011b).

5. Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP para mejorar el proceso de cicatrización tendinosa

El empleo clínico del PRP está creciendo entre los profesionales sanitarios relacionados con la Medicina del Deporte para el tratamiento de lesiones del sistema musculoesquelético, en un intento de acelerar los procesos de cicatrización y permitir una vuelta más precoz a la actividad física (Engebretsen et al., 2010). A pesar de este uso bastante extendido, aún existen pocos estudios clínicos que evalúen la eficacia de este tipo de terapias biológicas para el tratamiento de problemas musculoesqueléticos (Engebretsen et al., 2010). Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo experimental pretenden aportar luz acerca del efecto del PRGF, un tipo de PRP, en el proceso de cicatrización de lesiones tendinosas. En esta sección de la Discusión, vamos a comparar los resultados experimentales obtenidos en nuestro trabajo, con los resultados publicados en los trabajos clínicos que evalúan el tratamiento de lesiones del tendón de Aquiles con PRP. Antes de comenzar esta comparación de resultados es necesario tener en cuenta que los resultados obtenidos sobre un modelo experimental,

como es nuestro caso, son difíciles de extrapolar de manera directa al escenario clínico, pero pueden aportar una información valiosa que ayude a interpretar de manera más completa los resultados observados en los estudios clínicos.

El primer trabajo clínico publicado en el cual se evalúa el efecto de la aplicación de PRGF para el tratamiento de roturas del tendón de Aquiles fue realizado por del Dr. Sánchez y sus colaboradores (Sánchez et al., 2007). En este trabajo pionero, los autores observaron que la administración de PRGF en los pacientes sometidos a cirugía para reparar la rotura del aguda del tendón de Aquiles produjo una aceleración en el tiempo de recuperación, en comparación con los pacientes en los que no se aplicó el PRGF. Este estudio empleó la metodología de obtención de PRGF desarrollada por BTI[®] Biotechnology Institute, que fue la misma metodología que se empleó en nuestro modelo experimental. Sánchez y colaboradores (2007), para el tratamiento de los pacientes con rotura del tendón de Aquiles, aplicaron una infiltración intratendinosa de PRGF en los bordes del tendón roto durante la cirugía, y posteriormente colocaron una malla de fibrina autóloga construida a partir del PRGF sobre la zona de la reparación quirúrgica. En nuestro estudio, además de la aplicación intraquirúrgica de PRGF en los bordes tendinosos, hemos realizado infiltraciones semanales de PRGF durante el periodo postoperatorio. Las mejorías clínicas y funcionales observadas en el estudio de Sánchez y colaboradores (2007) podrían explicarse en base a las mejorías histológicas observadas en nuestro estudio experimental. En nuestro trabajo hemos observado que la aplicación de PRGF produjo una aceleración en el proceso de cicatrización del tendón a nivel histológico. Desafortunadamente, en el trabajo de Sánchez y colaboradores (2007) no fue posible la toma de biopsias tendinosas en los pacientes tratados con PRGF para poder contrastar esta hipótesis. A nivel ecográfico, estos autores observaron que los tendones tratados con PRGF presentaron un menor incremento en el área de corte transversal que los tendones del grupo control. En nuestro estudio sin embargo, no hemos observado diferencias en el incremento del área de corte transversal entre los diferentes grupos experimentales a lo largo de las 8 semanas del periodo de estudio. En el estudio de Sánchez y colaboradores (2007), estos estudios ecográficos se llevaron a cabo muy a largo plazo (varios años después de la cirugía), mientras que en nuestro trabajo experimental, los exámenes se realizaron durante los primeros dos meses tras la cirugía. Es posible que para detectar diferencias con respecto al incremento del área de

corte transversal del tendón operado sea necesario llevar a cabo los exámenes ecográficos más a largo plazo.

Dos años más tarde, Sánchez y colaboradores (2009) publicaron otro trabajo en el cual describían dos casos clínicos de manejo de complicaciones postquirúrgicas de reparaciones del tendón de Aquiles (Sánchez et al., 2009). Para el manejo de estas complicaciones se emplearon infiltraciones intraquirúrgicas de PRGF en los bordes tendinosos, además de técnicas de refuerzo y de transposición tendinosa. Estos autores obtuvieron unos excelentes resultados clínicos (Sánchez et al., 2009). De acuerdo con nuestros hallazgos experimentales, las aplicaciones de PRGF pueden ayudar a fomentar los procesos de cicatrización tendinosa, y puede resultar de gran utilidad para mejorar el ambiente tisular en estos casos complejos donde en los procesos de cicatrización pueden estar comprometidos.

Sin embargo, existen otros estudios clínicos donde no se observaron mejorías significativas tras la aplicación de PRP para el tratamiento de lesiones del tendón de Aquiles. Recientemente, de Vos y su grupo de colaboradores han publicado tres artículos derivados de un mismo ensayo clínico aleatorio, doble ciego y controlado con salino, llevado a cabo en un hospital holandés, donde se incluyeron 54 pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles (de Vos et al., 2010; de Vos et al., 2011; de Jonge et al., 2011). En este ensayo clínico se evaluó la eficacia del PRP para el tratamiento de lesiones crónicas del tendón de Aquiles. La evaluación se llevó a cabo mediante una escala de valoración funcional del tendón de Aquiles, y mediante exámenes ecográficos a los 6 y a los 12 meses del tratamiento. Los resultados publicados por estos autores no mostraron diferencias significativas entre los individuos tratados con PRP y los del grupo salino con respecto a la funcionalidad del tendón de Aquiles a los 6 meses del tratamiento (de Vos et al., 2010). Tampoco se observaron diferencias con respecto a la evaluación ecográfica del tendón de Aquiles, ni a los 6 meses (de Vos et al., 2011), ni al año del tratamiento con PRP (de Jonge et al., 2011). En sus publicaciones, estos autores concluyeron que la aplicación de PRP no se tradujo en mejoras significativas de los pacientes con tendinopatía del tendón de Aquiles (de Vos et al., 2010; de Vos et al., 2011; de Jonge et al., 2011). En un principio, los resultados observados en nuestro modelo experimental no estarían en consonancia con lo observado en estas publicaciones. Sin embargo, existen una serie de cuestiones que

deben de ser comentadas a la hora de comparar los resultados de estos autores, y nuestros resultados.

En primer lugar, nosotros hemos evaluado la aplicación de PRGF en un modelo experimental donde se ha creado quirúrgicamente una tenotomía en un tendón sano y sin patología previa. Estaríamos por tanto ante un modelo de daño agudo del tendón. El ensayo clínico de de Vos y colaboradores (2010) evalúa el efecto del PRP en pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles. La respuesta cicatricial del tendón es diferente en casos de lesiones agudas y en casos de lesiones crónicas / degenerativas (tendinopatías) (Waterson et al., 1997). En nuestro estudio hemos observado que el PRGF fomenta el proceso cicatricial en un modelo experimental de lesión aguda / traumática del tendón de Aquiles, pero no sabemos cómo se comportaría frente a un proceso crónico / degenerativo. Desafortunadamente, a día de hoy no existe ningún estudio que evalúe histológicamente el efecto del PRGF sobre un modelo experimental de lesión crónica / degenerativa del tendón de Aquiles.

Otro aspecto destacado que hay que analizar al comparar los resultados obtenidos por de Vos y colaboradores (2010), y los resultados de nuestro estudio es la metodología de obtención del PRP. En el ensayo clínico de de Vos y colaboradores (2010) se empleó un tipo de PRP obtenido según el sistema Gravitational Platelet Separation System III (GPS III System[®], Biomet Biologics LLC, Warsaw, Indiana, EEUU) (de Vos et al., 2010). Este sistema de aislamiento de PRP difiere considerablemente de la metodología PRGF de BTI[®] Biotechnology Institute empleada en nuestro estudio experimental. El PRP obtenido mediante el GPS III System[®], presenta una elevada concentración plaquetaria (por encima de 8 veces los niveles basales), y contiene leucocitos y eritrocitos (Eppley et al., 2004). Sin embargo, el PRGF de BTI[®] Biotechnology Institute se caracteriza por presentar una concentración moderada de plaquetas, y no presentar ni leucocitos ni eritrocitos (Anitua et al., 2008). Las importantes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas existentes entre los dos tipos de PRP muy probablemente se asocian con respuestas biológicas igualmente diferentes (Anitua et al., 2008), y podrían contribuir a explicar las diferencias observadas entre el estudio clínico publicado por de Vos y colaboradores (2010), y los hallazgos histológicos observados en nuestro modelo experimental.

Otra diferencia a destacar es con respecto a la pauta de administración del PRP. En el trabajo clínico de de Vos y colaboradores (2010) se aplicó una infiltración única de PRP (de Vos et al., 2010), mientras que en nuestro estudio experimental se llevaron a cabo aplicaciones repetidas de PRGF durante las tres primeras semanas del estudio. Bajo nuestro punto de vista, parece complicado de una aplicación única de PRP pueda conseguir efectos detectables en el tratamiento de un problema tan exigente desde el punto de vista terapéutico como es el caso de la tendinopatía crónica del tendón de Aquiles. Según nuestros resultados experimentales, la administración repetida de PRGF durante las tres primeras semanas tras la cirugía se tradujo en un efecto positivo sobre la cicatrización del tendón de Aquiles. Por desgracia no existen estudios experimentales que comparen la eficacia de la administración única o la administración repetida de PRGF para el tratamiento de lesiones del sistema musculoesquelético. Sería interesante llevar a cabo estudios futuros encaminados a determinar la pauta correcta de infiltración con PRGF para optimizar el proceso de cicatrización tendinosa.

Los estudios ecográficos llevados a cabo en el ensayo clínico de de Vos y colaboradores (2011) no observaron diferencias significativas entre los tendones tratados con PRP y los del grupo salino, ni a los 6 meses (de Vos et al., 2011), ni al año del tratamiento (de Jonge et al., 2011). A estos tiempos, todos los individuos habían experimentado mejorías en el aspecto ecográfico de los tendones, independientemente del grupo al que pertenecían (de Vos et al., 2011; de Jonge et al., 2011). En nuestro estudio experimental sin embargo, se detectó que a las 8 semanas de la cirugía, los tendones tratados con PRGF presentaron un mejor aspecto ecográfico que los tendones del grupo salino. Puede ocurrir que tanto a los 6 meses como a los 12 meses del tratamiento con PRP haya transcurrido demasiado tiempo para observar diferencias entre ambos grupos de estudio. Quizá hubiese sido interesante haber realizado exámenes ecográficos antes de los 6 meses, para determinar si, como apuntan nuestros resultados experimentales, el tratamiento con PRGF produce una aceleración precoz en el proceso de cicatrización del tendón.

Recientemente se ha publicado un estudio clínico aleatorio, controlado y doble ciego en el cual se ha evaluado la eficacia del tratamiento con PRP en 30 pacientes con rotura aguda del tendón de Aquiles (Schepull et al., 2011). Los resultados de este estudio, al contrario de lo observado en nuestro trabajo experimental, sugieren que el tratamiento con PRP no resulta útil en el tratamiento con PRP. Entre el trabajo

publicado por Schepull y colaboradores (2011) y nuestro estudio experimental existen importantes diferencias con respecto a la metodología de obtención del PRP. Schepull y colaboradores (2011) emplearon un PRP obtenido mediante una doble centrifugación, de acuerdo con los procedimientos empleados en medicina transfusional (Schepull et al., 2011). Esta metodología dio como resultado un PRP con una concentración de plaquetas extremadamente alta (diez veces por encima de la concentración plaquetaria basal). Estudios previos han puesto de manifiesto que altas concentraciones de determinados factores de crecimiento como el TGF- β pueden resultar perjudiciales para la cicatrización del tendón, ya que el TGF- β es un potente estimulante de la fibrogénesis, y potencialmente puede estimular la formación de un tejido cicatricial excesivo y fibrótico, debido a un incremento exagerado de la síntesis de colágeno en la zona de reparación (Anitua et al., 2006b). En el estudio de Schepull y colaboradores (2011), el PRP se almacenó a 22°C y movimiento constante durante unas 20 horas antes de su aplicación (Schepull et al., 2011), mientras que en nuestro estudio, el periodo de tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre del paciente y la administración del PRGF en la zona de la lesión no superó la hora. Al igual que en los estudios de de Vos y colaboradores (2010), Schepull y colaboradores (2011) también emplearon una aplicación única de PRP intraquirúrgico (Schepull et al., 2011), mientras que en nuestro estudio experimental hemos empleado aplicaciones repetidas de PRGF durante las primeras tres semanas tras la cirugía.

6. Limitaciones de nuestro estudio experimental

Cuando se realiza un estudio experimental es necesario revisar desde un punto de vista crítico la metodología de trabajo, e intentar informar al lector de las posibles limitaciones del mismo. El conocer las limitaciones inherentes a cualquier estudio experimental nos permite hacer una interpretación más correcta de los resultados obtenidos, y valorarlos de cara a su potencial aplicación al campo de la Medicina. En este estudio podemos identificar una serie de limitaciones que deben de ser

consideradas. Una de estas limitaciones es que en este modelo experimental no se realizaron estudios biomecánicos en los tendones tratados con PRGF o solución salina. El objetivo de realizar estudios biomecánicos sería evaluar si las mejoras observadas a nivel histológico y ecográfico tras la aplicación de PRGF se traducen en una mejora de las propiedades biomecánicas de los tendones. Los prometedores resultados obtenidos a nivel histológico justifican sobradamente la realización de futuros estudios biomecánicos usando este mismo modelo experimental *in vivo* de rotura del tendón de Aquiles en la especie ovina.

Otra limitación de este trabajo se relaciona con la formulación del PRGF. En la especie humana, Anitua y colaboradores han tipificado y detallado con precisión la composición del PRGF obtenido según la metodología que ellos mismos han desarrollado (Anitua et al., 2011a). Desafortunadamente, en la especie ovina no se han realizado estudios cuantitativos de determinen la composición y concentración de los diferentes factores de crecimiento que componen el PRGF. En vista de los resultados obtenidos en este trabajo experimental, futuros estudios deberían indagar en esta cuestión, y tipificar la composición del PRGF en la especie ovina.

En nuestro trabajo experimental, el modelo empleado utiliza tendones sanos. Como ya se ha comentado previamente, el proceso de cicatrización en el tendón sano no es exactamente igual que en el tendón patológico (Waterson et al., 1997). Además, en la mayoría de los casos clínicos de rotura espontánea del tendón de Aquiles, el tendón roto presenta un proceso patológico crónico que parece ser que desencadena el fatal desenlace (Jozsa y Kannus, 1997a). Por este motivo sería interesante desarrollar un modelo experimental *in vivo* de lesión crónica/degenerativa del tendón de Aquiles, y evaluar si las aplicaciones de PRGF presentan el mismo efecto beneficioso que se ha observado en el modelo experimental descrito en este trabajo.

En nuestro estudio experimental hemos aplicado cuatro inyecciones de PRGF; una aplicación intraoperatoria, y posteriormente tres aplicaciones semanales durante las primeras tres semanas del periodo postoperatorio. Esta pauta de administración se eligió basada en los estudios experimentales previos de Anitua y colaboradores (Anitua et al., 2006), y la tendencia clínica al empleo de inyecciones repetidas de PRGF en el tratamiento de roturas tendinosas. Por desgracia no se ha estudiado el efecto que tendría sobre el proceso de cicatrización del tendón la aplicación de más o menos aplicaciones

de PRGF. De la misma manera, tampoco se ha evaluado cuál sería el efecto que tendría sobre la cicatrización tendinosa el hecho de acortar o alargar el periodo entre tratamientos. En trabajos futuros se debería de estudiar el número correcto de aplicaciones y el tiempo entre tratamientos para intentar optimizar el proceso de cicatrización del tendón.

7. Líneas de investigación en curso y futuras

Actualmente se está llevando a cabo un estudio biomecánico de los tendones tratados con PRGF, usando un diseño experimental idéntico al descrito en nuestro trabajo de Tesis Doctoral. Los resultados de las pruebas biomecánicas supondrán un nuevo trabajo de Tesis Doctoral.

Otro estudio experimental que se está realizando actualmente evalúa el efecto que tiene el PRGF sobre el proceso de cicatrización del tendón a las 2 semanas de la cirugía, tanto desde el punto de vista histológico como biomecánico.

La evaluación ultraestructural del tejido cicatricial de los tendones tratados con PRGF puede revelar interesantes resultados que ayuden a aclarar el mecanismo por el cual el tratamiento con PRGF produce una aceleración en la cicatrización del tendón de Aquiles. Actualmente se están llevando a cabo estudios ultraestructurales de los tendones de Aquiles tratados con PRGF y salino en este mismo modelo experimental, a las 2, 4 y 8 semanas de la cirugía.

La tipificación tanto cualitativa como cuantitativa del PRGF en la especie ovina en una línea de investigación futura que pretende describir la composición del PRGF de la oveja y determinar la concentración plaquetaria y de los principales factores de crecimiento relacionados con la cicatrización tendinosa (PDGF, TGF- β , bFGF, VEGF, EGF, IGF-I, HGF, trombospondina). De la misma manera, sería interesante comparar la composición del PRGF de la especie ovina con el de otras especies como el humano, perro, caballo, gato.

En estudios futuros se pretende evaluar si el PRGF modula en alguna medida la respuesta inflamatoria en el tejido tendinoso en proceso de reparación. El menor grado de inflamación observado en los tendones tratados con PRGF podría ser explicado merced a un efecto modulador de la respuesta inflamatoria por parte del PRGF.

En nuestro modelo experimental de lesión aguda del tendón de Aquiles, la aplicación de PRGF ha mostrado unos resultados muy satisfactorios. En estudios futuros se pretende diseñar un modelo experimental de lesión crónica / degenerativa del tendón de Aquiles, y evaluar el efecto que ejerce el PRGF sobre este tipo de lesiones.

Conclusions

1. The methodology described in this Doctoral Thesis produced a standardized, accurate and repeatable injury on the Achilles tendon in sheep. This *in vivo* experimental animal model is useful to test different treatment modalities which pursue an improvement on the healing and/or repair of Achilles tendon.
2. PRGF infiltration was a safe treatment, which produced no detectable adverse effects on general health of animals or on the healing process of Achilles tendon in this experimental model.
3. Fibroblast nuclei in PRGF-treated tendons showed a significantly better orientation and more elongated shape than in the saline group at eight weeks. These results suggest a more advanced stage of healing compared to tendons infiltrated with saline.
4. Histological examinations of the repaired tendons showed a significantly more mature organization of collagen bundles in PRGF-treated tendons than in the saline group, both at four and eight weeks after surgery.
5. Compared to saline group, PRGF injections induced markedly less inflammatory cell infiltration, faster vascular regression, and lower fibroblast density, suggesting an acceleration of the tendon healing process.
6. Tendons infiltrated with PRGF showed significantly less collagen type III four weeks after surgery; and more collagen type I at eight weeks, compared to tendons injected with saline.
7. PRGF-treated tendons showed improvements related to ultrasonographic appearance at eight week after surgery.
8. PRGF accelerated the healing process after an acute injury of Achilles tendon in this experimental model. This suggests that PRGF infiltration may be an interesting coadjuvant treatment during the surgical management of acute rupture of Achilles tendon.

Resumen

Summary

La ruptura aguda del tendón de Aquiles es una lesión grave, con un manejo terapéutico complejo, debido a la pobre capacidad de cicatrización que tiene el tendón. El uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) se está usando clínicamente para el manejo de este tipo de lesión. Diversos estudios experimentales han mostrado que el empleo de este tipo de terapia biológica puede producir una interesante mejoría de la cicatrización del tendón, pero recientemente han aparecido algunos estudios clínicos que ponen en entredicho este efecto beneficioso. Actualmente existe un intenso debate acerca de la efectividad de este tipo de terapias. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto que tiene la aplicación de inyecciones intratendinosas de PRGF sobre la cicatrización del tendón de Aquiles, usando para ello un modelo experimental en oveja.

Para ello se emplearon 20 ovejas adultas en las que se practicó una sección del tendón de Aquiles de manera estandarizada. A continuación, esta tenotomía se reparó mediante una sutura de los bordes tendinosos, usando un patrón en triple polea. Los animales se dividieron en cuatro grupos de cinco individuos cada uno. Dos de estos grupos recibieron una infiltración de PRGF en el lugar de la tenotomía justo tras la cirugía. Durante las 3 semanas posteriores a la cirugía se aplicó una inyección semanal de PRGF de manera ecoguiada en la zona de la lesión tendinosa. Los otros dos grupos recibieron una infiltración de solución salina, siguiendo la misma pauta descrita para los grupos tratados con PRGF. Uno de los grupos tratados con PRGF y otro de los grupos infiltrados con salino se eutanasiaron a las cuatro semanas de la cirugía, y los otros dos grupos restantes se eutanasiaron a las 8 semanas. Durante el periodo postoperatorio se realizaron exámenes físicos semanales de los animales, y exámenes ecográficos del tendón de Aquiles para monitorizar el proceso de cicatrización. Tras la eutanasia de los animales, se extrajeron los tendones de Aquiles y se realizó un examen macroscópico de la zona de reparación, y exámenes histoquímicos para evaluar histológicamente la zona de reparación. Con ayuda de un programa de análisis de la imagen microscópica se

determinaron los siguientes parámetros: morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, neovascularización. La organización de las fibras de colágeno y la respuesta inflamatoria se evaluaron mediante una escala de valoración semicuantitativa. Para evaluar el colágeno tipo I y tipo III se realizaron técnicas inmunohistoquímicas.

Todos los animales que se emplearon en el diseño de este modelo experimental llegaron al final del estudio sin que se registrase ninguna baja. Tras el análisis estadístico de los datos recogidos se observó una mejoría significativa del aspecto ecográfico de los tendones tratados con PRGF a las 8 semanas de la cirugía. En cuanto al estudio histológico, el núcleo de los fibroblastos en los tendones tratados con PRGF presentó una morfología significativamente más alargada y una mejor orientación con respecto al eje longitudinal del tendón, sobre todo a las 8 semanas de la cirugía. Además, estos tendones mostraron unos haces de colágeno más compactados y mejor alineados con respecto al eje longitudinal del tendón, tanto a las 4 como a las 8 semanas. Los tendones de los grupos PRGF presentaron una disminución significativa de la densidad de fibroblastos, y una regresión vascular más rápida que en el caso de los tendones del grupo salino. La infiltración inflamatoria también fue menor en los tendones tratados con PRGF, tanto a las 4 como a las 8 semanas. Con respecto al estudio inmunohistopatológico, se observó que los tendones tratados con PRGF presentaban menor extensión en la reacción frente al colágeno de tipo III a las cuatro semanas de la cirugía, y una mayor intensidad en la reacción frente a colágeno tipo I a las ocho semanas de la cirugía.

Los hallazgos de este estudio sugieren que el empleo de PRGF aceleró el proceso de cicatrización tendinosa en nuestro modelo experimental. Los tendones tratados con PRGF mostraron una mejoría en las características morfométricas de los núcleos de los fibroblastos, una organización más madura de los haces de colágeno, una aceleración en el proceso de regresión vascular y un menor grado de infiltración inflamatoria. Además, estos tendones presentaron un mejor aspecto ecográfico a las 8 semanas de la cirugía. Estos resultados proporcionan indicios para considerar la infiltración de PRGF como una terapia coadyuvante prometedora en el tratamiento de las roturas agudas del tendón de Aquiles.

The acute rupture of the Achilles tendon is probably the most dramatic lesion that affects this tendon, and the management of this injury may result challenging. Recovery from a tendon rupture is a slow process because the poor-healing capacity of tendon compared to other tissues, mainly associated with a reduced blood supply and a reduced metabolism of the tenocytes. The use of Platelet-Rich in Growth Factors (PRGF) has been proposed to improve the healing of Achilles tendon injuries. Several authors have reported that applications of PRP for improve the healing response after tendon injuries but there is debate about the effectiveness of this biological therapy. The objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the effects of PRGF injections on Achilles tendon healing, using an experimental model in sheep.

The Achilles tendons of twenty adult sheep were divided surgically in a standardized way. After the tenotomy, the Achilles tendon was sutured using a three-loop pulley pattern. Animals were randomly divided into four groups of five animals each. The repaired tendons of two groups received an infiltration of PRGF intraoperatively and every week for the following three weeks under ultrasound guidance. The other two groups received injections with saline as described previously. The animals in one PRGF-treated group and one saline group were euthanized at four weeks, and the animals in the remaining two groups were euthanized at eight weeks. During the postoperative period, weekly general health examinations were performed, and the operated tendons were evaluated by mean of ultrasound in order to monitor the healing process in tendons. After euthanasia, the Achilles tendons were harvested and examined macroscopically. Histological examinations were also performed. The morphometry of fibroblast nuclei, fibroblast density, and vascular response were evaluated with the aid of image analysis software. Other histological parameters as the arrangement of collagen fibers, or inflammatory cell infiltration were evaluated using a semiquantitative grade scale. Immunohistochemical techniques were performed to evaluate the collagen type I and type III.

All animals used in the design of this experimental model reached the end of the study without any casualties. After the statistical analysis of the data, a significant improvements related to ultrasonographic appearance of the Achilles tendon was observed in PRGF-treated tendons at eight weeks after surgery. Regarding histological study, fibroblast nuclei of PRGF-treated tendons were significantly more elongated and more parallel to the tendon axis than the fibroblast nuclei of the saline-injected group at eight weeks. PRGF-treated tendons also showed more packed and better oriented collagen bundles, both at four and eight weeks. In addition to an increased maturation of the collagen structure, fibroblast density was significantly lower in tendons that had been infiltrated with PRGF. PRGF-treated tendons exhibited faster vascular regression than tendons in the control groups at eight weeks. PRGF-treated group showed a lower degree of inflammation than saline group, both at four and eight week after surgery. Tendons infiltrated with PRGF showed significantly less collagen type III four weeks after surgery; and more collagen type I at eight weeks, compared to tendons injected with saline.

The findings of this Doctoral Theses suggest that PRGF injections accelerated the healing process in repaired tendons after experimental disruption of Achilles tendons in sheep. PRGF-treated tendons showed improvements in morphometric features of fibroblast nuclei, suggesting a more advanced stage of healing. Histological examinations at eight weeks of tendons treated with PRGF revealed a more mature organization of collagen bundles, lower vascular density and lower fibroblast density, producing more advanced histological appearances of the healing process than in tendons infiltrated with saline. Ultrasonographic evaluations also showed an improvement in tendon healing in PRGF-injected tendons at eight weeks. These results suggest that PRGF infiltration may be an interesting adjuvant treatment during the surgical management of acute rupture of Achilles tendons.

Agradecimientos

Pues sí queridos amigos, compañeros y familiares, resulta que tengo la Tesis Doctoral redactada frente a mis ojos. Resulta que al final de este largo camino hemos concluido un trabajo que considero tan vuestro como mío. Un camino que se ha prolongado durante cuatro años en los que siempre he sentido a alguno de vosotros cerca de mí. Ya sabéis que no ha sido nada fácil. En realidad nadie nos dijo que fuese fácil. Sin duda son las cosas difíciles las que nos motivan y nos empujan a dar el 100% de nosotros mismos. Y os puedo asegurar que en este trabajo he dado el máximo de mí. Y todo gracias a vosotros. A quienes me habéis contagiado con las inquietudes de la investigación, a quienes me habéis ofrecido vuestra mano cuando la mía temblaba, a quienes me habéis empujado cuando la cuesta se endurecía, y a quienes me habéis sabido frenar cuando cogía demasiada velocidad, a todos ellos, GRACIAS.

Durante estos años hay un gran número de personas que han volcado un enorme esfuerzo en esta Tesis Doctoral. Personas que generosamente me han ofrecido su saber, su ayuda, y su apoyo, y con los que tengo una enorme deuda. A través de estas líneas me gustaría expresarles mi más sincero agradecimiento a cada uno de ellos.

A mis directores de tesis, los Profesores Doctores D. Juan Manuel Domínguez Pérez y Dña. María del Mar Granados Machuca, por haberme guiado a través de este largo camino con el entusiasmo que os caracteriza, por compartir vuestros conocimientos tan generosamente conmigo, por enseñarme lo que significa la investigación, y sobre todo, por brindarme vuestra amistad. Gracias Juanma, eres mi Maestro. Muchas gracias por sembrar en mí esta pasión por la Cirugía Veterinaria, por darme la oportunidad de aprender a tu lado, y por compartir conmigo tantas horas bajo la lámpara de quirófano. Muchas gracias por inculcarme el amor por el trabajo bien hecho. Muchas gracias por confiar en mí, y por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. Nada de esto hubiese sido posible sin tu tesón, trabajo y dedicación. Gracias María del Mar. Gracias por darle la oportunidad a aquel estudiante de quinto curso. Porque tú fuiste la primera que confiaste en mí. Nunca olvidaré aquella conversación después de mi último examen de la carrera, examen de Patología Quirúrgica General, tras el cual me hablaste de algo relacionado con una Beca “de no sé qué”, y que abrió en mí una ventana hacia la investigación que hasta entonces había permanecido cerrada. Sin lugar a dudas, sin aquella primera oportunidad, hoy no estaría escribiendo estas líneas. Muchas gracias por mostrarme tu extraordinaria capacidad de trabajo y sacrificio, que admiro enormemente y nunca dejará de sorprenderme. Un ejemplo a seguir para mí.

A los Profesores Doctores D. Juan Morgaz Rodríguez y Dña. Rocío Navarrete Calvo, por haberme ofrecido tantos momentos, tantas risas, tantas satisfacciones. Por ser quienes realmente me “engancharon” a esa vida de becario de Cirugía. Gracias Juan, por ser un espejo en el que mirarme. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y me sigues enseñando cada día. Por ser ese compañero de trabajo dispuesto siempre a echarme un cable ante cualquier dificultad. Muchas gracias por tu sencillez. No se puede ser más auténtico. Gracias Rocío, por tu ternura y sinceridad. No imaginas como añoro aquel compañerismo de sala de becarios cuando éramos vecinos de mesa. Muchas gracias por todas las sonrisas que hemos compartido. Muchas gracias por enseñarme lo que significa la constancia en el trabajo.

Al Profesor Doctor D. Rafael J. Gómez Villamandos, por su apoyo constante y la confianza que me ha demostrado durante todos estos años. Muchas gracias, Rafa, por

hacer que el barco siga navegando, por mantener el timón bien dirigido, y por hacer que la tripulación permanezca unida. Gracias por hacerme sentir parte de tu equipo.

A los Profesores Doctores Dña. Cristina Riber Pérez, D. José María Santisteban Valenzuela, y D. Indalecio Ruiz Calatrava, por el apoyo que me han brindado durante todos estos años. Gracias Cristina, por ser de las primeras que confiaste un bisturí en mis manos. Gracias José María e Indalecio, por todos esos buenos momentos de peroles, cenas de Navidad y comidas de feria. Gracias a los tres por aceptarme tan cálidamente en vuestro grupo de trabajo durante todos estos años.

A Pili, Funes y Sete. Gracias por vuestra inmensa ayuda durante todo el periodo experimental de la Tesis, por el buen ambiente de trabajo que mantenemos en la sala de becarios, y por todo el apoyo que me habéis ofrecido durante estos años. Gracias Pili, por aportar esa frescura que necesita todo equipo de trabajo. Por ser tan entrañable y por arrancarnos siempre una sonrisa con alguna de tus ocurrencias. Por supuesto, muchísimas gracias por tu inestimable colaboración a la hora de diseñar la valoración ecográfica de los tendones. Gracias Funes, por ser un tío tan “currante” y tan versátil. Gracias por toda la ayuda que me has dado con el manejo de las ovejas. Me has demostrado que sirves lo mismo para evaluar el efecto de una infusión de fentanilo, que para remangarte y sacar el estiércol de los boxes. Gracias Sete, por esa disposición que tienes siempre para ayudar a los demás. Las dos palabras que mejor te definen son: prudencia y trabajo; y ten por seguro que con esas dos palabras llegarás muy lejos. Muchas gracias por toda tu entrega. Los tres hacéis que me sienta orgulloso de entrar por la puerta de la sala de becarios.

A los “nuevos” becarios de la Unidad de Cirugía; Raúl, María, Sergio, Lidia y Dani. Muchas gracias a todos por vuestro incansable trabajo y dedicación. Sois parte esencial de la dinámica del grupo. Muchas gracias por vuestra colaboración durante las sesiones de cirugía. Sin vuestra ayuda no habría sido posible. Muchas gracias Raúl, por todas esas horas de ecógrafo que nos hemos pegado juntos en la granja, por todos esos tubos de sangre que hemos centrifugado, por toda esa incansable ayuda que me has dado. Durante muchos meses has sido mis pies y mis manos.

A los Profesores Doctores D. José María Carrillo Poveda, Dña. Mónica Rubio Zaragoza, y D. Joaquín Sopena Juncosa, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia, por formar parte imprescindible del equipo de

trabajo durante aquellas maratónicas sesiones de cirugía, por el tiempo que habéis dedicado para que este trabajo pueda ver la luz. Muchas gracias Chema y Mónica, por la confianza que siempre habéis mostrado en mí, y por la hospitalidad con la nos habéis tratado cuando hemos ido por Valencia. Muchas gracias Joaquín, por la meticulosidad de las cirugías. Buena parte del éxito del modelo experimental está en tus manos.

A los Doctores D. Ramón Cugat Bertomeu y Dña. Montserrat García Balletbó, así como a la Fundación García-Cugat para la Investigación Biomédica. Muchas gracias Ramón y Montse por vuestra cercanía, hospitalidad y sencillez. Muchas gracias por la confianza que habéis depositado en mí. Sinceramente ha sido para mí todo un honor haber colaborado con vosotros, y me siento muy halagado por el trato recibido. Muchas gracias a la Fundación García-Cugat, sin cuya participación no habría sido posible que este trabajo experimental viese la luz.

Al resto de Profesores del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba, en especial a la Doctora Alba Galán Rodríguez y al Doctor José Carlos Estepa Nieto. Muchas gracias Alba por el apoyo y la confianza que he sentido por tu parte desde que era un “Megatrix”. Muchísimas gracias José Carlos, por tu valiosa ayuda a la hora de llevar a cabo los estudios ecográficos de los tendones. Gracias por todos esos “truquillos” que me diste para realizar las ecografías. Gracias por colaborar de una manera totalmente desinteresada en este proyecto. Gracias por enseñarme a ver imágenes donde antes solo veía sombras.

A las Profesoras Doctoras Dña. Juana Martín de las Mulas González-Albo, y Dña. Yolanda Millán Ruiz, del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba. Gracias Juana, por el interés y la disposición que has mostrado para la realización del estudio histológico de los tendones. Muchas gracias por permitir la creación de un interesante nexo de colaboración científica entre nuestra unidad de cirugía y vuestro grupo de histopatología. Muchas gracias Yolanda, por conseguir que un cirujano cambie durante varios meses el bisturí por el microscopio. La verdad que ha sido una experiencia muy enriquecedora. Sin tu especial atención y colaboración esa misión habría sido imposible. Gracias por hacerme sentir tan cómodo trabajando con vosotras. Ha sido un verdadero placer. También quiero dar las gracias a los becarios de Anatomía Patológica por haberme hecho más llevaderas

aquellas largas jornadas de microscopio y fotografías. Muchas gracias a Raquel, Silvia, Irene, Mari Ángeles, Inma, Fernando y Nieves.

Al Profesor Doctor D. José García Monterde, del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba, por su valiosísima ayuda a la hora de llevar a cabo las medidas morfométricas del núcleo de los fibroblastos. Gracias Pepe, sin tu ayuda y consejos jamás habría podido poner a punto el programa de análisis de la imagen microscópica.

Al Profesor Doctor D. Alfonso Blanco Rodríguez, del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba, por el interés mostrado en el estudio ultraestructural de los tendones.

A la Doctora Marta Rius, especialista en ecografía del sistema musculoesquelético y en Medicina del Deporte. Gracias Marta, por tu valiosa colaboración a la hora de diseñar la escala de valoración ecográfica del daño tendinoso, y muchas gracias por tu hospitalidad y cordialidad durante la semana que estuve aprendiendo ecografía con vosotros.

A todos los alumnos internos de cirugía que participaron en aquellos días interminables de cirugía de las ovejas, en los que empezábamos al amanecer y nos íbamos a casa de noche. Sin el esfuerzo de todos ellos esta Tesis Doctoral no habría sido posible. Muchas gracias a Carlos Cuenca, Beatriz Navarro, Blanca de Sousa, Mónica Bautista, Elena Barba, David Valera, José María Zapata, Olmo, Amaranta, Vito Stirling, Rocío Anaya, Juanfran Cabrillana, Aroha, Puri, Pancho, Pilar Fuentes-Guerra, Chema, Alejandro Coronel, Joaquín y Raquel.

A los compañeros del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, en especial a Carmen Martínez, Carmen Villalobos, Nacho, Belén, Toñi, Inma, Jose y Juan Antonio. Muchas gracias por vuestro apoyo y ayuda durante aquellos “días de ovejas”. Sin vosotros no habría sido posible.

Al personal laboral de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba, en especial a José Miguel, Manolo López y Manolo, así como al Director de la misma, el Profesor Doctor D. Valeriano García Domenech.

A mis padres, Andrés y Leonor. Gracias por apoyarme ciegamente cuando decidí emprender este largo camino. Siempre habéis confiado en mí, y si he conseguido algo en la vida, ha sido gracias a vosotros dos. Espero no defraudaros. A mi hermano, Salva. Sencillamente porque aún no me he encontrado ningún ser humano más íntegro, con más valores y con mejor corazón que él. No cambies nunca. A mis abuelos, Salvador y María, por todo el cariño y fuerza que me transmiten, y porque tienen un corazón que no les cabe en el pecho. A mi tío Salva, por su apoyo incondicional en todas las decisiones que tomo. A mi tío José María, compañero de profesión, y responsable de que estudiase Veterinaria. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y me enseñas.

A Suker, la nobleza hecha mascota, nuestro fiel amigo, que tristemente nos ha dejado unos días antes de acabar esta Tesis Doctoral. Nunca te olvidaré.

A Eli, por todo el tiempo robado. Gracias por ser mi fiel compañera en este duro viaje. Gracias por tenerme preparada siempre una palabra de ánimo. Por ayudarme a sortear los baches del camino. Gracias por alumbrarme cuando el camino se hacía oscuro, y por guiarme cuando me encontraba perdido. Gracias por tenderme tu mano cuando, cerca del destino, tropecé con una piedra. Tú sabes como nadie todo el esfuerzo que ha supuesto este largo viaje. Gracias por tu paciencia y tu comprensión. Ahora, llegados al final, lo justo es que crucemos juntos la meta.

A Blacky, un torbellino de cuatro patas que llena de alegría nuestro hogar.

A todos ellos, GRACIAS de todo corazón.

Bibliografía

1. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res.* 1991; 9: 495-502.
2. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: A pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19: 59-65.
3. Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJMA, Lenz ME, Sah RL, Masuda K. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 1272-1280.
4. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery- a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.* 2009; 91b: 987-996.
5. Andersson G, Backman LJ, Scott A, Lorentzon R, Forsgren S, Danielson P. Substance P accelerates hypercellularity and angiogenesis in tendon tissue and enhances paratendinitis in response to Achilles tendon overuse in a tendinopathy model. *Br J Sports Med.* 2011 Oct; 45(13): 1017-1022.
6. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10: 1415-1426.
7. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Platelet rich plasma therapies for sports muscle injuries: any evidence behind clinical practice?. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11: 509-518.

8. 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): 529-535.
9. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001 Aug; 13(6): 487-493.
10. Anitua E, Andía I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Throm Haemost*. 2004; 91: 4-15.
11. Anitua E, Andía I, Sánchez M, Azofra J, Zalduendo MM, 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; 23: 281-286.
12. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006a; 24: 227-234.
13. 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*. 2006b; 77: 285-293.
14. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, Andia I. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta 1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007a; 119: 950-959.
15. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, De la Fuente M, Azofra J, Andia I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic

- acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheum.* 2007b; 46: 1769-1772.
16. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007c; 28: 4551-4560.
 17. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J Biomed Mater Res Part A.* 2009a; 90a: 1262-1263.
 18. Anitua E, Sanchez M, Zalduendo MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, Andia I. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009b; 42: 162-170.
 19. Anitua E, Orive G, Pla R, Roman P, Serrano V, Andía I. The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: a histologic and histomorphometric study. *J Biomed Mater Res A.* 2009c; 91: 158-165).
 20. Anitua E, Sanchez M, Merayo-Lloves J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) Stimulates Proliferation and Migration of Primary Keratocytes and Conjunctival Fibroblasts and Inhibits and Reverts TGF- β 1-Induced Myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011a; 52: 6066-6073.
 21. Anitua E, Sanchez M, Orive G. The importance of understanding what is platelet-rich growth factor (PRGF) and what is not. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011b; 20: e23-e24.
 22. Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 Apr; 76(4): 1809-1813.

23. Antoniades HN, Galantopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jan; 88: 565-569.
24. Appel TR, Pötzsch B, Müller J, von Lindern JJ, Bergé SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Impl Res*. 2002; 13: 522-528.
25. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Vinals L, Martinez P, Bach E, Prades M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*. 2006; 81: 237-245.
26. Argüelles D, Carmona JU, Climent F, Munoz E, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet Rec*. 2008; 162: 208-211.
27. Aspenberg P, Albrektsson T, Thorngren KG. Local application of growth-factor IGF-I to healing bone. *Acta Orthop Scand*. 1989a; 60 (5): 607-610.
28. Aspenberg P, Lohmander S. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. *Acta Orthop Scand*. 1989b; 60 (4): 473-476.
29. Aspenberg P, Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand*. 1999; 70: 51-54.
30. Aspenberg P, Forslund C. Bone morphogenetic proteins and tendon repair. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10: 372-375.
31. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004; 75: 93-99
32. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor- β in human platelets. *J Biol Chem*. 1983 Jun; 258(11): 7155-7160.

33. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activates human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Sep; 84: 6020-6024.
34. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FNL, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*. 1999; 5: 267-277.
35. Azuma H, Yasuda K, Tohyama H, Sakai T, Majima T, Aoki Y, Minami A. Timing of administration of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor influences the effect on material properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament. *J Biomech*. 2003; 36: 373-381.
36. Baboldashti NZ, Poulsen RC, Franklin SL, Thompson MS, Hulley PA. Platelet-Rich Plasma Protects Tenocytes From Adverse Side Effects of Dexamethasone and Ciprofloxacin. *Am J Sports Med*. 2011; 39: 1929-1935.
37. Bachli EB, Pech CM, Johnson KM, Johnson DJD, Tuddenham EGD, McVey JH. Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1935-1944.
38. Bagge J, Lorentzon R, Alfredson H, Forsgren S. Unexpected presence of the neurotrophins NGF and BDNF and the neurotrophin receptor p75 in the tendon cells of the human Achilles tendon. *Histol Histopathol*. 2009; 24(7): 839-848.
39. Balias R, Sala X, Álvarez G, Jiménez F. Ecografía musculoesquelética. Ed.: Paidotribo, Barcelona (España). 2007.
40. Banfi G, Corsi MM, Volpi P. Could platelet rich plasma have effects on systemic circulating growth factors and cytokine release in orthopaedic applications?. *Br J Sports Med*. 2006; 40: 816-816.

41. Barber FA, Hrnack SA, Snyder SJ, Hapa O. Rotator Cuff Repair Healing Influenced by Platelet-Rich Plasma Construct Augmentation. *Arthroscopy*. 2011; 27: 1029-1035.
42. Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, McFatrige LA, Amento EP. TGF-beta 1 accelerates wound healing: reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. *Growth Factors*. 1991; 5(4): 295-304.
43. Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2841-2849.
44. Benjamin M, Theobald P, Suzuki D, Toumi H. The Anatomy of the Achilles Tendon. En: Maffulli N, Almekinders L (Editores), *The Achilles Tendon*. Springer, Londres. 2007; 5-16.
45. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*. 1993 Jun; 165 (6): 728-737.
46. Bertolotto M, Perrone R, Martinoli C, Rollandi GA, Patetta R, Derchi LE. High resolution ultrasound anatomy of normal Achilles tendon. *Br J Radiol*. 1995 Sep; 68(813): 986-991.
47. Bhahot S, Alex JC. Current applications of platelets gel in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg*. 2002 Feb; 18 (1): 27-33.
48. Bibbo C, Bono CM, Lin SS. Union rates using autologous platelet concentrate alone and with bone graft in high-risk foot and ankle surgery patients. *J Surg Orthop Adv*. 2005; 14: 17-22.
49. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and

- other active substances - An in vitro study. *J Bone Joint Surg –Br.* 2007; 89b: 417-420.
50. Bielecki T, Gazdzik TS, Szczepanski T. Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *Eur Surg Res.* 2008; 40: 289-296.
 51. Blei CL, Nirschl RP, Grant EG. Achilles tendon: US diagnosis of pathologic conditions. Work in progress. *Radiology.* 1986 Jun; 159(3): 765-767.
 52. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *New Eng J Med.* 2000 May; 4: 1350-1358.
 53. Bolt P, Clerk AN, Luu HH, Kang Q, Kummer JL, Deng ZL, Olson K, Primus F, Montag AG, He TC, Haydon RC, Toolan BC. BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 1315-1320.
 54. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- β in disease: The dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1-7.
 55. Borrione P, Di Gianfrancesco A, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-Rich Plasma in Muscle Healing. *Am J Phys Med Rehabil.* 2010; 89: 854-861.
 56. Bosch G, van Schie HTA, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CHA, 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; 28: 211-217.
 57. Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HTM. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created

- equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports*. 2011a; 21: 554-561.
58. Bosch G, van Weeren PR, Barneveld A, van Schie HTM. 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*. 2011b; 187: 92-98.
 59. Bouffard JA, Eyler, William R, Introcaso, Joseph H, van Holsbeeck, Marnix. Sonography of Tendons. *Ultrasound Quarterly*. 1993; 11(4): 259-286.
 60. Bowen-Pope DF, van Koppen A, Schatteman G. Is PDGF really important? Testing the hypotheses. *Trends Genet*. 1991; 4: 413-418.
 61. Boyer MI, Goldfarb CA, Gelberman RH: Recent progress in flexor tendon healing. The modulation of tendon healing with rehabilitation variables. *J Hand Ther*. 2005; 18: 80-85,86.
 62. Bring DK, Reno C, Renstrom P, Salo P, Hart DA, Ackermann PW: Joint immobilization reduces the expression of sensory neuropeptide receptors and impairs healing after tendon rupture in a rat model. *J Orthop Res*. 2009; 27: 274-280.
 63. Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM, Curtsinger LJ 3rd, Holtzin L, Schultz GS, Jurkiewicz MJ, Lynch JB. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med*. 1989; 321(2): 766-779.
 64. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconstr Surg*. 1991; 88(2): 189-194.

65. Brown J, Sivan M. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injection for chronic patellar tendinopathy: a case report. *PM & R*. 2010; 2: 969-972.
66. Bruce WJ, Frame K, Burbidge HM, Thompson K, Firth EC: A comparison of the effects of joint immobilisation, twice-daily passive motion and voluntary motion on articular cartilage healing in *sheep*. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2002, 15:23-29.
67. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W: Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2000; 8: 364-369.
68. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*. 1988 Feb; 81: 277-281.
69. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Ann Rev Med*. 1991; 42: 17-24.
70. Canalis E. Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75(1): 1-4.
71. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003; 8: 980-989.
72. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2002 Oct; 133(10): 1383-1386.
73. Carmichael S: The external fixator in small animal orthopedics. *J Small Ani Pract*. 1991; 32: 486-493.
74. Carpenter JE, Thomopoulos S, Soslowsky LJ: Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; S296-311.

75. Carpenter JE, Hankenson KD: Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2004; 25: 1715-1722.
76. Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L, Jr., De Paula AM, Pacheco MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 659-665.
77. Castor CW, Bignall MC, Hossler PA, Roberts DJ. Connective tissue activation XXI. Regulation of glycosaminoglycan metabolism by lymphocyte (CTAP-I) and platelet (CTAP-III) growth factors. *In Vitro*. 1981Sep; 17(9): 777-785.
78. Castricini R, Longo UG, De Benedetto M, Panfoli N, Pirani P, Zini R, Maffulli N, Denaro V. Platelet-Rich Plasma Augmentation for Arthroscopic Rotator Cuff Repair A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med*. 2011; 39: 258-265.
79. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem*. 1987 Feb; 262(6): 2869-2874.
80. Cervellin M, de Girolamo L, Bait C, Denti M, Volpi P. Autologous platelet-rich plasma gel to reduce donor-site morbidity after patellar tendon graft harvesting for anterior cruciate ligament reconstruction: a randomized, controlled clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012; 20: 114-120.
81. Cetti R, Junge J, Vyberg M. Spontaneous rupture of the Achilles tendon is preceded by widespread and bilateral tendon damage and ipsilateral inflammation - A clinical and histopathologic study of 60 patients. *Acta Orthop Scand*. 2003; 74: 78-84.
82. Chan BP, Fu SC, Qin L, Lee KM, Rolf CG, Chan KM. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing. *Acta Orthop Scand*. 2000; 71 (5): 513-518.

83. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med.* 2005; 33: 43-51.
84. Chang J, Siebert JW, Schendel SA, Press BH, Longaker MT. Scarless wound healing: Implication for the aesthetic surgeon. *Aesth Plast Surg.* 1995; 19: 237-241.
85. Chang J, Thunder R, Most D, Longaker MT, Lineaweaver WC. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF- β 1 increase postoperative range of motion. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105: 148-155.
86. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004 Dec; 22(4): 233-241.
87. Chen TM, Rozen WM, Pan WR, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI. The Arterial Anatomy of the Achilles Tendon: Anatomical Study and Clinical Implications. *Clin Anatomy.* 2009; 22: 377-385.
88. Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12: 834-842.
89. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 293-298.
90. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals 1. *Lab Ani.* 1996; 30: 293-316.
91. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999; 134: 200-205.

92. Crass JR. Tendon ecogenicity: ex vivo study. *Radiology*. 1988; 167: 499-501.
93. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med*. 2008; 42.
94. Crovace A, Lacitignola L, Francioso E, Rossi G. Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2008; 21: 329-336.
95. Cui Y, Koop EA, van Diest PJ, Kandel RA, Rohan TE. Nuclear morphometric features in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 104: 103-107.
96. Dahlgren LA, van der Meulen MCH, Bertram JEA, Starrak GS, Nixon AJ. Insulina-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res*. 2002; 20: 910-919.
97. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Aldini NN, Giavaresi G, Cenni E, Baldini N, Cenacchi A, Bassi A, Giardino R, Fornasari PM, Giunti A. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res*. 2006; 24: 877-888.
98. Davidson CJ, Ganion LR, Gehlsen GM, Verhoestra B, Roepke JE, Sevier TL: Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. *Med Sci Sports Exerc*. 1997; 29: 313-319.
99. de Clerck F, van Nueten JM, Reneman RS. Platelet-vessel wall interactions: implication of 5-hydroxytryptamine. A review. *Agents Actions*. 1984 Dec; 15(5-6): 612-626.

100. de Jonge S, de Vos RJ, Weir A, van Schie HTM, Bierma-Zeinstra SMA, Verhaar JAN, Weinans H, Tol JL. One-Year Follow-up of Platelet-Rich Plasma Treatment in Chronic Achilles Tendinopathy A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2011; 39: 1623-1629.
101. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HTM, Weinans H, Verhaar JAN, van Osch GJVM. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med.* 2008; 36: 1171-1178.
102. Deuel TF, Huang JS, Proffitt RT, Baenzinger JU, Chang D, Kennedy BB. Human platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1981 Sep; 256(17): 8896-8899.
103. de Vos RJ, Weir A, van Schie HTM, Bierma-Zeinstra SMA, Verhaar JAN, Weinans H, Tol JL. Platelet-Rich Plasma Injection for Chronic Achilles Tendinopathy A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2010; 303: 144-149.
104. de Vos RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JAN, Weinans H, van Schie HTM. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *British J Sports Med.* 2011; 45: 387-392.
105. 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; 27: 158-167.
106. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Donmez G, Maffulli N. Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18: 638-643.
107. Drengk A, Zapf A, Stuermer EK, Stuermer KM, Frosch K-H. Influence of Platelet-Rich Plasma on Chondrogenic Differentiation and Proliferation of

- Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2009; 189: 317-326.
108. Duan C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol*. 2002; 175: 41-54.
109. Duffy Jr FJ, Seiler JG, Gelberman RH, Hergueter CA. Growth factors and canine flexor tendon healing: Initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg Am*. 1995; 20A: 645-649.
110. Dussik KT. Measurements of articular tissues with ultrasound. *Am J Phys Med*. 1995; 14: 357-360.
111. Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Giatromanolaki A, Sivridis E, Papachristou DN, Kontoleon E. Angiogenic effect of intramuscular administration of basic and acidic fibroblast growth factor on skeletal muscles and influence of exercise on muscle angiogenesis. *Br J Sports Med*. 2006; 40: 35-39.
112. Engebretsen L et al. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. 2010; 44: 1072-1081.
113. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 114: 1502-1508.
114. Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res*. 2002 Nov; 20(6): 1352-1357.
115. Everts PA, Devilee RJJ, Mahoney CB, van Erp A, Oosterbos CJM, Stellenboom M, Knape JTA, van Zundert A. Exogenous application of platelet-leukocyte gel during open subacromial decompression contributes to improved patient outcome. *Eur Surg Res*. 2008a; 40: 203-210.

116. Everts AM, Zundert AV, Schönberger JPAM, Devilee RJJ, Knape JTA. What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *J Biomed Mater Res A*. 2008b; 85: 1135-1136.
117. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31: 281-286.
118. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res*. 2002; 4: 252-260.
119. Ferraresi C, Oliveira TdB, Zafalon LdO, de Menezes Reiff RB, Baldissera V, de Andrade Perez SE, Matheucci Junior E, Parizotto NA. Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans. *Lasers Med Sci*. 2011; 26: 349-358.
120. Figueroa D, Melean P, Calvo R, Vaisman A, Zilleruelo N, Figueroa F, Villalon I. Magnetic Resonance Imaging Evaluation of the Integration and Maturation of Semitendinosus-Gracilis Graft in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Autologous Platelet Concentrate. *Arthroscopy*. 2010; 26: 1318-1325.
121. Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop*. 2010a; 34: 909-915.
122. Filardo G, Presti ML, Kon E, Marcacci M. Nonoperative biological treatment approach for partial Achilles tendon lesion. *Orthopedics*. 2010b; 33: 120-123.
123. Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011; 19: 528-535.

124. Fleming BC, Spindler KP, Palmer MP, Magarian EM, Murray MM. Collagen-Platelet Composites Improve the Biomechanical Properties of Healing Anterior Cruciate Ligament Grafts in a Porcine Model. *Am J Sports Med.* 2009; 37: 1554-1563.
125. Fornage BD. The hypoechoic normal tendon. A pitfall. *J Ultrasound Med.* 1987; 6: 19-22.
126. Forslund C, Aspenberg P. Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2. *Am J Sports Med.* 2003; 31: 555-559.
127. Forslund C, Rueger D, Aspenberg P. A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1,-2 and-3 for tendon healing in rats. *J Orthop Res.* 2003; 21: 617-621.
128. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469: 2706-2715.
129. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med, United States.* 2009; 2259-2272.
130. Fowble VA, Vigorita VJ, Bryk E, Sands AK. Neovascularity in chronic posterior tibial tendon insufficiency. *Clin Orthop Relat Res.* 2006; 450: 225-230.
131. Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Okazaki K, Tsuta K, Shikinami Y, Uchida A. Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials.* 2005; 26: 4301-4308.
132. Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of

- human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*. 2005; 26: 1953-1960.
133. Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008; 39 (S1): S88-S96.
134. Gandhi A, Bibbo C, Pinzur M, Lin SS. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin*. 2005; 10: 621.
135. Gandhi A, Doumas C, O'Connor JP, Parsons JR, Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*. 2006; 38: 957-957.
136. Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factor I and II expression in the healing wound. *J Surg Res*. 1992; 52: 389-394.
137. Gaweda K, Tarczynska M, Krzyzanowski W. Treatment of Achilles Tendinopathy with Platelet-Rich Plasma. *Int J Sports Med*. 2010; 31: 577-583.
138. Gear ARL, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*. 2003; 10: 335-350.
139. Gelberman RH, Vandeberg JS, Lundborg GN, Akeson WH. Flexor tendon healing and restoration of the gliding surface –an ultrastructural- study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1983; 65: 70-80.
140. Gelberman RH, Manske PR, Akeson WH, Woo SLY, Lundborg G, Amiel D. Flexor Tendon Repair. *J Orthop Res*. 1986; 4: 119-128.
141. Genovese RL, Rantanen NW, Simpson BS, Simpson DM. Clinical experience with quantitative analysis of superficial digital flexor tendon injuries in Thoroughbred and Standardbred racehorses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1990 Apr; 6(1): 129-145.

142. Gentry PA. Platelet biology. En: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al. (editores). Schlam's veterinary haematology. Philadelphia (EEUU), Lippincott Williams and Wilkins. 2000; 459-466.
143. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000; 355: 1531-1539.
144. Getty R. Sisson and Grossman's The anatomy of de domestic animals. WB Saunders. Philadelphia. 1st Ed. 1975.
145. Giannini S, Vannini F, Timoncini A, Ghermandi R, Ruffilli A. The treatment of severe chondropaties of the knee with autologous platelet rich plasma injections: Preliminary results. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16 (4): S126-S127.
146. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; S82-S89.
147. Goel DP, Chan D, Watson K, Mohtadi N. Safety and hospital costs of Achilles tendon surgery: the serendipitous impact of a randomized clinical trial. *Can J Surg*. 2009; 52: 467-472.
148. Grageda E. Platelet-Rich Plasma and bone graft materials: A review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004; 13: 301-309.
149. Grant WP, Jerlin EA, Pietrzak WS, Tam HS. The utilization of autologous growth factors for the facilitation of fusion in complex neuropathic fractures in the diabetic population. *Clin Podiatr Med Surg*. 2005; 22: 561.
150. Grimaud E, Heymann D, Rédini F. Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutics roles of TGF- β in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13: 241-257.

151. Gruber R, Karreth F, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants stimulate formation of osteoclast-like cells through a prostaglandin/RANKL-dependent mechanism. *Bone*. 2002a; 30: 726-732.
152. Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res*. 2002b; 13: 529-535.
153. Habel RE. Guide to the dissection of domestic ruminants. 4th Ed. 1975.
154. Hakimi M, Jungbluth P, Sager M, Betsch M, Herten M, Becker J, Windolf J, Wild M. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury*. 2010; 41: 717-723.
155. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of Autologous Platelet-rich Plasma to Treat Muscle Strain Injuries. *Am J Sports Med*. 2009; 37: 1135-1142.
156. Han B, Woodell-May J, Ponticciello M, Yang Z, Nimni M. The Effect of Thrombin Activation of Platelet-Rich Plasma on Demineralized Bone Matrix Osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am*. 2009; 91a, 1459-1470.
157. Harari J: Complications of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1992, 22:99-107.
158. Harmon KG. Muscle injuries and PRP: what does the science say? *Br J Sports Med*. 2010; 44: 616-617.
159. Harrison P, Cramer EM. Platelets alfa granules. *Blood Reviews*. 1993; 7: 52-62.
160. Hartwig J, Italiano J,Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1580-1586.

161. Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. *J Invest Dermatol.* 1990; 95: 626-631.
162. Hess GW. Achilles tendon rupture: a review of etiology, population, anatomy, risk factors, and injury prevention. En: *Foot Ankle Spec.* Vol.3. Estados Unidos. 2010; 29-32.
163. Hildebrand KA, Woo SLY, Smith DW, Allen CR, Deie M, Taylor BJ, Schmidt CC. The effects of platelet-driven growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med.* 1998; 26(4): 549-554.
164. Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot Ankle Clin.* 2007; 12: 553-567.
165. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C. Effects of transforming growth factor-beta 1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol.* 2009a; 28: 324-335.
166. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu. The roles of TGF-beta1 gene transfer on collagen formation during Achilles tendon healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009b; 383: 235-239.
167. Howes R, Bowness JM, Grotendorst GR, Martin GR, Reddi AH. Platelet-derived growth factor enhances demineralised bone matrix-induced cartilage and bone formation. *Calcif Tissue Int.* 1998; 42: 34-38.
168. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg.* 2004; 29A: 551-563.
169. Huang SS, Huang JS. TGF- β control of cell proliferation. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 447-462.

170. Hughes GC, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, Lowe JE, Annex BH, Landolfo KP. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: Comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77: 812-818.
171. Hulth A, Johnell O, Miyazono K, Lindberg L, Heinegard D, Heldin CH. Effect of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *J Orthop Res.* 1996; 14: 547-553.
172. Igotz RA, Massagué J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986 Mar; 261(9): 4337-4345.
173. Ilhami K, Gokhan M, Ulukan I, Eray BM, Levent A, Cigdem T: Biomechanical and histologic comparison of Achilles tendon ruptures reinforced with intratendinous and peritendinous plantaris tendon grafts in rabbits: an experimental study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2004; 124: 608-613.
174. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* 2009; 30: 4956-4966.
175. Ishida K, Kuroda R, Miwa M, Tabata Y, Hokugo A, Kawamoto T, Sasaki K, Doita M, Kurosaka M. The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng.* 2007; 13: 1103-1112.
176. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: Biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am.* 2008; 33a: 102-112.
177. Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin, United States.* 2005; 255-266.

178. Jenis LG, Banco RJ, Kwon B. A prospective study of Autologous Growth Factors (AGF) in lumbar interbody fusion. *The spine journal*. 2006; 6: 14-20.
179. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation - An experimental study in dogs. *J Orthop Res*. 2004; 22: 653-658.
180. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop*. 2005; 29: 67-72.
181. Jia WT, Zhang CQ, Wang JQ, Feng Y, Ai ZS. The prophylactic effects of platelet-leucocyte gel in osteomyelitis –an experimental study in a rabbit model. *J Bone Joint Surg-Br*. 2010; 92b: 304-310.
182. Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Lee JH, Kang SB, Lee JH, Han HS, Rhee SH, Shin S. Does Platelet-Rich Plasma Accelerate Recovery After Rotator Cuff Repair? A Prospective Cohort Study. *Am J Sports Med*. 2011; 39: 2082-2090.
183. 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; 28: 1071-1077.
184. Joshi SM, Mastrangelo AN, Magarian EM, Fleming BC, Murray MM. Collagen-Platelet Composite Enhances Biomechanical and Histologic Healing of the Porcine Anterior Cruciate Ligament. *Am J Sports Med*. 2009; 37: 2401-2410.
185. Jozsa L, Kvist M, Balint BJ, Reffy A, Jarvinen M, Lehto M, Barzo M. The role of recreational sport activity in Achilles -tendon rupture- a clinical, pathoanatomical, and sociological – study of 292 cases. *Am J Sports Med*. 1989; 17: 338-343.

186. Jozsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports*. 1997a; 7: 113-118.
187. Jozsa L, Kannus P. Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology. Champaign, Illinois (EEUU). *Human Kinetics*; 1997b.
188. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Butler DL. Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair. *Tissue Eng*. 2006; 12: 681-689.
189. Jungbluth P, Wild M, Grassmann JP, Ar E, Sager M, Herten M, Jager M, Becker J, Windolf J, Hakimi M. Platelet-Rich Plasma on Calcium Phosphate Granules Promotes Metaphyseal Bone Healing in Mini-Pigs. *J Orthop Res*. 2010; 28: 1448-1455.
190. Kainberger FM, Engel A, Barton P, Huebsch P, Neuhold A, Salomonowitz E. Injury of the Achilles tendon: diagnosis with sonography. *Am J Roentgenol*. 1990 Nov; 155(5): 1031-1036.
191. Kainberger F, Mittermaier F, Seidl G, Parth E, Weinstabl R. Imaging of tendons--adaptation, degeneration, rupture. *Eur J Radiol*. 1997 Nov; 25(3): 209-222.
192. Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med*. 2002; 36(4): 239-249.
193. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K-I, 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; 215: 837-845.

194. Kangas J, Paasimaa S, Makela P, Leppilahti J, Tormala P, Waris T, Ashammakhi N: Comparison of strength properties of poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 and polyglyconate (Maxon) sutures: in vitro, in the subcutis, and in the achilles tendon of rabbits. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58: 121-126.
195. Kangas J, Pajala A, Siira P, Hamalainen M, Leppilahti J: Early functional treatment versus early immobilization in tension of the musculotendinous unit after Achilles rupture repair: a prospective, randomized, clinical study. *J Trauma.* 2003; 54: 1171-1180; discussion 1180-1171.
196. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10: 312-320.
197. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniadis HN, Scher CD. Platelet α granules contain a growth factor for fibroblast. *Blood.* 1979 Jun; 53(6): 1043-1052.
198. Kaplan PA. Sonography of the musculoskeletal system. *AJR.* 1990; 155: 237-240.
199. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 272-285.
200. Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2004; 38: 193-197.
201. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbuehl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials.* 2008; 29: 3983-3992.
202. Kawamoto K, Matsuda H. Nerve growth factor and wound healing. *Prog Brain Res.* 2004; 146: 369-384.

203. Kawamura M, Urist M. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol.* 1988; 130: 435-442.
204. Keegan KG, Dent EV, Wilson DA, Janicek J, Kramer J, Lacarrubba A, Walsh DM, Cassells MW, Esther TM, Schiltz P, Frees KE, Wilhite CL, Clark JM, Pollitt CC, Shaw R, Norris T. Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses. *Equine Vet J.* 2010; 42: 92-97.
205. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* 1986 May; 163: 1037-1050.
206. Khan RJK, Fick D, Keogh A, Crawford J, Brammar T, Parker M. Treatment of acute achilles tendon ruptures - A meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Bone Joint Surg-Am.* 2005; 87a: 2202-2210.
207. Kibblewhite DJ, Bruce AG, Strong DM, Ott SM, Purchio AF, Larrabee WF Jr. Transforming growth factor-beta accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model. *Growth Factors.* 1993; 9(3): 185-193.
208. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993; 362 Apr: 841-844.
209. Kim ES, Park EJ, Choung PH. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: An experimental study in rabbits. *J Prosthet Dent.* 2001; 86: 428-433.
210. Kim HJ, Nam H-W, Hur C-Y, Park M, Yang HS, Kim B-S, Park J-H. The effect of platelet rich plasma from bone marrow aspirate with added bone

- morphogenetic protein-2 on the Achilles tendon-bone junction in rabbits. *Clin Orthop Surg.* 2011; 3: 325-331.
211. Kirillov VA, Yuschenko YP, Paplevka AA, Demidchik EP. Thyroid carcinoma diagnosis based on a set of karyometric parameters of follicular cells. *Cancer.* 2001; 92: 1818-1827.
212. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5): 729-760.
213. Kirkeby OJ, Ekeland A. No effects of local somatomedin C on bone repair. Continuous infusion in rats. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63 (4): 447-450.
214. Kirkendall D, Garret W. Músculos, tendones y ligamentos: Estructura, función y fisiología. In: Fitzgerald R, Kaufer H , Malkani A (Editores), *Ortopedia.* Ed.: Médica Panamericana, Buenos Aires. 2004; 186-199.
215. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma. *J Pediatr Orthop.* 2007a; 27: 629-634.
216. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone.* 2007b; 40: 522-528.
217. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT Chang J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF- β on tendon cell collagen production. *J Hand Surg.* 2002; 27a; 615-620.
218. Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. An in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg.* 1982; 196(4): 379-388.

219. Kobayashi D, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K. Effect of basic fibroblast growth factor on the healing of defects in the canine anterior cruciate ligament. *Knee Surg, Sports Traumatol, Arthrosc.* 1997; 5: 189-194.
220. Kocher MS, Bishop J, Marshall R, Briggs KK, Hawkins RJ. Operative versus nonoperative management of acute Achilles tendon rupture - Expected-value decision analysis. *Am J Sports Med.* 2002; 30: 783-790.
221. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Lo Presti M, Russo A, Bondi A, Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. Platelet-rich plasma: New clinical application: A pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury.* 2009; 40: 598-603.
222. Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M (2010a): Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010a; 18: 472-479.
223. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, Martin I, Marcacci M. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010b; 11.
224. Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011a; 19: 516-527.
225. Kon E, Mandelbaum B, Buda R, Filardo G, Delcogliano M, Timoncini A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-Rich Plasma Intra-Articular Injection Versus Hyaluronic Acid Viscosupplementation as Treatments for Cartilage Pathology: From Early Degeneration to Osteoarthritis. *Arthroscopy.* 2011b; 27: 1490-1501.

226. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med.* 1999; 27 (3): 363-369.
227. Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56: 1116-1117.
228. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58: 297-300.
229. Lansdown ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Rep Reg.* 2002; 10: 271-285.
230. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol.* 1996; 70: 37-44.
231. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, Körmöczi GF, Buchta C. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vos Sang.* 2006; 91: 135-139.
232. Lemos J, Amorós FJ, Cerezo E, de la Fuente J, Martínez M. Aplicaciones de la ecografía en el diagnóstico de la patología del aparato locomotor. *Medicina General.* 2001; N.º Extr: 57-72.
233. Leppilahti J, Orava S. Total Achilles tendon rupture - A review. *Sports Med.* 1998; 25: 79-100.
234. Letson AK, Dahners LE. The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop Rel Res.* 1994; 308: 207-212.

235. Leven RM. Megakaryocytes. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (editores). Schlam's veterinary haematology. Philadelphia (EEUU), Lippincott Williams and Wilkins. 2000; 443-447.
236. Lewis DD, Cross AR, Carmichael S, Anderson MA: Recent advances in external skeletal fixation. *J Small Anim Pract.* 2001, 42:103-112.
237. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 91-98.
238. Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor- β enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64(5): 553-556.
239. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67(4): 407-417.
240. Ljung A, Skoog V, Widenfalk B, Ren Z, Nistér M, Ohlsén L. Expression of platelet-derived growth factor beta receptor in chondrogenesis of perichondrial transplants. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1995 Dec; 29(4): 289-295.
241. Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Acute ruptures of the achilles tendon. *Sports Med Arthrosc.* 2009; 17: 127-138.
242. Loo WL, Lee DYH, Soon MYH. Plasma Rich in Growth Factors to Treat Adductor Longus Tear. *Ann Acad Med Singapore.* 2009; 38: 733-734.
243. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone.* 1999 Aug; 25(2): 47S-50S.
244. Lundborg G, Rank F, Heinau B. Intrinsic tendon healing –a new experimental-model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1985; 19: 113-117.

245. 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.* 2009a; 129: 1577-1582.
246. 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.* 2009b; 30: 1101-1106.
247. 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.* 2010a; 34: 143-148.
248. Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, Chronopoulos E, Tryfonidis M (2010b): Experimental study of tendon healing early phase: Is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010b; 96: 381-387.
249. 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.* 2009 Eur Foot Ankle Society. Publicado por Elsevier Ltd, Francia. 2010c; 137-141.
250. 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; 50: 276-282.
251. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989; 84: 640-646.

252. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 1988; 106: 1659-1665.
253. Maffulli N, Dymond NP, Capasso G. Ultrasonographic findings in subcutaneous rupture of Achilles tendon. *Sports Med Phys Fitness.* 1989 Dec; 29(4): 365-368.
254. Maffulli N, Dymond NP, Regine R. Surgical repair of ruptured Achilles-tendon in sportsmen and sedentary patients –a longitudinal ultrasound assessment. *Int J Sports Med.* 1990; 11: 78-84.
255. Maffulli N. Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81a: 1019-1036.
256. Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med.* 2000 Jul-Aug; 28(4): 499-505.
257. Maffulli N, Tallon C, Wong J, Lim KP, Bleakney R. Early weightbearing and ankle mobilization after open repair of acute midsubstance tears of the achilles tendon. *Am J Sports Med.* 2003; 31: 692-700.
258. Maffulli N, Longo UG, Maffulli GD, Khanna A. Achilles tendon ruptures in elite athletes. *Foot Ankle Int.* 2011; 32: 9-15.
259. Maganaris C, Narici M, Almekinders L, Maffulli N. Biomechanics of the Achilles tendon. En: Maffulli N, Almekinders L (Editores), *The Achilles tendon.* Springer, Londres. 2007; 17-24.

260. Ma J, Shen J, Smith BP, Ritting A, Smith TL, Koman LA: Bioprotection of tendon repair: adjunctive use of botulinum toxin A in Achilles tendon repair in the rat. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 2241-2249.
261. Maniscalco P, Gambera D, Lunati A, Vox G, Fossombroni V, Beretta R, Crainz E. The "Cascade" membrane: a new PRP device for tendon ruptures. Description and case report on rotator cuff tendon. *Acta Biomed.* 2008; 79: 223-226.
262. Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 1997; 46: 4-18.
263. Manske PR, Lesker PA, Gelberman RH, Rucinsky TE. Intrinsic restoration of the flexor tendon surface in the nonhuman primate. *J Hand Surg Am.* 1985; 10a: 632-637.
264. Mariconda M, Cozzolino F, Cozzolino A, D'Agostino E, Bove A, Milano C. Platelet gel supplementation in long bone nonunions treated by external fixation. *J Orthop Trauma.* 2008; 22: 342-345.
265. Marie PJ, Hott M, Perheentupa J. Effects of epidermal growth factor on bone formation and resorption in vivo. *Am J Physiol.* 1990; 258(21): E275-E281.
266. Marlovits S, Mousavi M, Gäbler C, Erdös J, Vécsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J.* 2004; 13(1): S102-S106.
267. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med.* 2001 Aug; 51(4): 292-299.
268. Martinoli C, Derchi LE, Pastorino C, Bertolotto M, Silvestri E. Analysis of echotexture of tendons with us. *Radiology.* 1993; 186: 839-843.

269. 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): 638-646.
270. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent.* 2001; 10(4): 225-228.
271. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62: 489-496.
272. Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 753-791.
273. Mastrangelo AN, Vavken P, Fleming BC, Harrison SL, Murray MM. Reduced Platelet Concentration Does Not Harm PRP Effectiveness for ACL Repair in a Porcine dIn Vivo Model. *J Orthop Res.* 2011; 29: 1002-1007.
274. Matras H. Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985; 43: 605-611.
275. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltext[®]. *Vox Sang.* 2008; 94: 202-208.
276. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet[®], RegenPRP-Kit[®], Plateltext[®] and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009; 97: 110-118.
277. McCarrel T, Fortier L. Temporal Growth Factor Release from Platelet-Rich Plasma, Trehalose Lyophilized Platelets, and Bone Marrow Aspirate and Their Effect on Tendon and Ligament Gene Expression. *J Orthop Res.* 2009; 27: 1033-1042.
278. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: Basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma.* 2008; 22: 433-438.

279. Mei-Dan O, Carmont M, Kots E, Barchilon V, Nyska M, Mann G. Early return to play following complete rupture of the medial collateral ligament of the elbow using preparation rich in growth factors: a case report. *J Shoulder Elbow Surg / Am Shoulder Elbow Surg*. 2010a; 19: 1-5.
280. Mei-Dan O, Lippi G, Sanchez M, Andia I, Maffulli N. Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? *Phys Sportsmed*. 2010b; 38: 127-135.
281. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg-Br*. 2000; 82b: 131-137.
282. Micklethwaite L, Wood AK, Sehgal CM, Polansky M, Dowling BA, Dart AJ, Rose RJ, Hodgson DR. Use of quantitative analysis of sonographic brightness for detection of early healing of tendon injury in horses. *Am J Vet Res*. 2001 Aug; 62(8):1320-1327.
283. Milano G, Passino ES, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriciani C. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18: 971-980.
284. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2006; 34: 1774-1778.
285. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. Buffered Platelet-Rich Plasma Enhances Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009a; 15: 431-435.
286. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*. 2009b; 28: 113-125.

287. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Feb; 263: 30-48.
288. Moller M, Movin T, Granhed H, Lind K, Faxen E, Karlsson J. Acute rupture of tendo Achillis - A prospective, randomised study of comparison between surgical and non-surgical treatment. *J Bone Joint Surg-Br.* 2001; 83b: 843-848.
289. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003; 33(5): 381-394.
290. Moojen DJF, Everts PAM, Schure R-M, Overdevest EP, van Zundert A, Knape JTA, Castelein RM, Creemers LB, Dhert WJA. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008; 26: 404-410.
291. Mooren RECM, Merckx MAW, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJW. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36: 626-631.
292. Morizaki Y, Zhao C, An K-N, Amadio PC. The Effects of Platelet-Rich Plasma on Bone Marrow Stromal Cell Transplants for Tendon Healing In Vitro. *J Hand Surg Am.* 2010; 35a: 1833-1841.
293. Mortensen HM, Skov O, Jensen PE: Early motion of the ankle after operative treatment of a rupture of the Achilles tendon. A prospective, randomized clinical and radiographic study. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81: 983-990.
294. Movin T, Ryberg A, McBride DJ, Maffulli N. Acute rupture of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin, United States.* 2005; 331-356.
295. Murray MM, Spindler KP, Devin C, Snyder BS, Muller J, Takahashi M, Ballard P, Nanney LB, Zurakowski D. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *J Orthop Res.* 2006; 24: 820-830.

296. Murray MM, Spindler KP, Abreu E, Muller JA, Nedder A, Kelly M, Frino J, Zurakowski D, Valenza M, Snyder BD, Connolly SA. Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 2007a; 25: 81-91.
297. Murray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair anterior cruciate ligament plasma scaffold. *J Orthop Res.* 2007b; 25: 1007-1017.
298. Murray MM, Palmer M, Abreu E, Spindler KP, Zurakowski D, Fleming BC. Platelet-Rich Plasma Alone Is Not Sufficient to Enhance Suture Repair of the ACL in Skeletally Immature Animals: An In Vivo Study. *J Orthop Res.* 2009; 27: 639-645.
299. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994; 15(2): 203-208.
300. Nayeri F, Olsson H, Peterson C, Sundqvist T. Hepatocyte growth factor; expression, concentration and biological activity in chronic leg ulcers. *J Dermatol Sci.* 2005; 37: 75-85.
301. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998; 18: 118-123.
302. Ng CO, Ng GY, See EK, Leung MC. Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol.* 2003; 29: 1501-1506.
303. Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res.* 2008; 75: 135-141.
304. Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials.* 1997; 18: 1201-1225.

305. Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β . *J Orthop Res*. 1998; 16: 531-541.
306. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin, United States*. 2005; 225-238.
307. Oemeroglu S, Peker T, Tuerkoezkan N, Oemeroglu H. High-dose vitamin C supplementation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009; 129: 281-286.
308. Olsen SK, Garbi M, Zampierini N, Eliseenkova AV, Ornitz DM, Goldfarb M, Mohammadi M. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *J Bio Chem*. 2003; 278 (36): 34226-34236.
309. Oreilly MAR, Massouh H. The sonographic diagnosis of pathology in the Achilles-tendon. *Clin Radiology*. 1993; 48: 202-206.
310. Orhan Z, Ozturan K, Guven A, Cam K. The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis. A histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Br*. 2004; 86: 613-618.
311. Orcajo B, Muruzabal F, Isasmendi MC, Gutierrez N, Sánchez M, Orive G, Anitua E. The use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) in the treatment of a severe mal perforant ulcer in the foot of a person with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93: 65-67.
312. Orrego M, Larrain C, Rosales J, Valenzuela L, Matas J, Durruty J, Sudy H, Mardones R. Effects of Platelet Concentrate and a Bone Plug on the Healing of Hamstring Tendons in a Bone Tunnel. *Arthroscopy*. 2008; 24: 1373-1380.

313. Owens RF, Jr., Ginnetti J, Conti SF, Latona C. Clinical and Magnetic Resonance Imaging Outcomes Following Platelet Rich Plasma Injection for Chronic Midsubstance Achilles Tendinopathy. *Foot Ankle Int.* 2011; 32: 1032-1039.
314. Paavola M, Paakkala T, Kannus P, Järvinen M. Ultrasonography in the differential diagnosis of Achilles tendon injuries and related disorders. A comparison between pre-operative ultrasonography and surgical findings. *Acta Radiol.* 1998 Nov; 39(6): 612-619.
315. Palmer SE, Genovese R, Longo KL, Goodman N, Dyson S. Practical management of superficial digital flexor tendinitis in the performance horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1994 Aug; 10(2): 425-481.
316. Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GAC, Orchard J. Platelet-Rich Plasma Treatment for Ligament and Tendon Injuries. *Clin J Sport Med.* 2011; 21: 37-45.
317. Parameswaran AD, Roberts CS, Seligson D, Voor M: Pin tract infection with contemporary external fixation: how much of a problem?. *J Orthop Trauma.* 2003, 17:503-507.
318. Parekh SG, Wray WH, 3rd, Brimmo O, Sennett BJ, Wapner KL. Epidemiology and outcomes of Achilles tendon ruptures in the National Football League. *Foot Ankle Spec.* 2009; 2: 283-286.
319. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007 Mar 2;13:1-10.
320. Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. Positive Effect of an Autologous Platelet Concentrate in Lateral Epicondylitis in a Double-Blind Randomized Controlled Trial Platelet-Rich Plasma Versus Corticosteroid Injection With a 1-Year Follow-up. *Am J Sports Med.* 2010; 38: 255-262.

321. Pesonen K, Viinikka L, Myllylä G, Kiuru J, Perheentupa J. Characterization of material with epidermal growth factor immunoreactivity in human serum and platelets. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68(2): 486-491.
322. Petersen W, Pufe T, Unterhauser F, Zantop T, Mentlein R, Weiler A: The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003, 123: 475-480.
323. Pierce GF, Mustoe TA, Altmann BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biol.* 1991; 45: 319-326.
324. Pitsillides AA, Skerry TM, Edwards JC: Joint immobilization reduces synovial fluid hyaluronan concentration and is accompanied by changes in the synovial intimal cell populations. *Rheumatology (Oxford).* 1999; 38: 1108-1112.
325. Platt MA. Tendon repair and healing. *Clin Podiatr Med Surg.* 2005; 22: 553-560.
326. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by transforming growth factor β . *J Exp Med.* 1987 Jan; 165: 251-256.
327. Potenza AD. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog –an experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* 1962; 44: 49-64.
328. Powell DM, Chang E, Farris EH. Recovery from deep-plane rhytidectomy following unilateral wound treatment with autologous platelet gel. *Arch Facial Plast Surg.* 2001 Oct-Dec; 3: 245-250.
329. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch.* 2001; 439: 579-585.

330. Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, Bauge C, Beauchef G, Andriamanalijaona R, Galera P, Boumediene K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in oostearthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res.* 2008; 49(3): 293-297.
331. Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1982 May; 257(9): 5154-5160.
332. Rabillard M, Grand JG, Dalibert E, Fellah B, Gauthier O, Niebauer GW. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar ostectomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2009; 22: 460-466.
333. Radice F, Yanez R, Gutierrez V, Rosales J, Pinedo M, Coda S. Comparison of Magnetic Resonance Imaging Findings in Anterior Cruciate Ligament Grafts With and Without Autologous Platelet- Derived Growth Factors. *Arthroscopy.* 2010; 26: 50-57.
334. Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N (2008): Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil.* 2008; 30: 1584-1589.
335. Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P. Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011; 20: 518-528.
336. Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg-Am.* 2007; 89a: 139-147.
337. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping. *Science.* 1988; 241: 708-712.

338. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281-287.
339. Reed GL. Platelet secretion. In Platelets (Ed. Michelson AD), 2° Ed.: Elsevier Science, San Diego. 2007; 309-318.
340. Reef VB. Superficial digital flexor tendon healing: Ultrasonographic evaluation of therapies. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2001; 17: 159.
341. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J.* 2005; 272: 5723-5741.
342. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001; 12: 261-273.
343. Ribault D, Khatib AM, Panasyuk A, Barbara A, Bouizar Z, Mitrovic RD. Mitogenic and metabolic actions of epidermal growth factor on rat articular chondrocytes: Modulation by fetal calf serum, transforming growth factor- β , and tyrphostin. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 337(2): 149-158.
344. Ripamonti U, Bosch C, van den Heever B, Duneas N, Melsen B, Ebner R. Limited chondro-osteogenesis by recombinant human transforming growth factor-beta 1 in calvarian defects of adult baboons (*Papio ursinus*). *J Bone Miner Res.* 1996 Jul; 11(7): 938-945. (Abstract).
345. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985 Jan; 82: 119-123.
346. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth

- factor type β : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 Jun; 83: 4167-4171.
347. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol*. 1987 Jul; 105(1): 457-463.
348. Robinson P. Sonography of Common Tendon Injuries. *Am J Roentgenol*. 2009; 193: 607-618.
349. Rockett MS, Waitches G, Sudakoff G, Brage M. Use of ultrasonography versus magnetic resonance imaging for tendon abnormalities around the ankle. *Foot Ankle Int*. 1998 Sep; 19(9): 604-612.
350. Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF- β signalling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Dec; 15(12): 1367-1377.
351. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet- dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1974 Apr; 71(4): 1207-1210.
352. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986 Jul; 46(18): 155-169.
353. Rutherford RB, Ross R. Platelet factors stimulate fibroblast and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Cell Biol*. 1976 Apr; 69: 196-203.
354. Rupp S, Tempelhof S, Fritsch E. Ultrasound of the Achilles -tendon after surgical repair- morphology and function. *Br J Radiol*. 1995; 68: 454-458.

355. Sakai T, Yasuda K, Tohyama H, Azuma H, Nagumo A, Majima T, Frank CB. Effects of combined administration of transforming growth factor-beta 1 and epidermal growth factor on properties of the in situ frozen anterior cruciate ligament in rabbits. *J Orthop Res.* 2002; 20: 1345-1351.
356. Sala MA, Komesu MC, Lopes RA, Maia Campos G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz Dent J.* 1994; 5: 11-14.
357. Saleh H, Cox F. Gravitational platelet separation. Accelerating the body's own healing process. *Br J Periop Nurs.* 2004; 14 (4): 175-179.
358. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Oct; 84: 7109-7113.
359. Sampson S, Reed M, Silvers H, Meng M, Mandelbaum B. Injection of Platelet-Rich Plasma in Patients with Primary and Secondary Knee Osteoarthritis A Pilot Study. *Am J Phys Med Rehabil.* 2010; 89: 961-969.
360. Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I. Aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica. *Cuadernos de Artroscopia.* 2003a; 10: 12-19.
361. 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.* 2003b; 35(10): 1648-1652.
362. Sánchez M, Anitua E, Andía I. Application of Autologous Growth Factors on Skeletal Muscle Healing., 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig (Alemania). 2005.
363. 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; 35: 245-251.

364. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andía 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; 26: 910-913.
365. Sánchez M, Anitua E, Cole A, Silva Ad, Azofra J, Andía I. Management of post-surgical Achilles tendon complications with a preparation rich in growth factors: A study of two-cases. *Injury Extra*. 2009a; 40: 11-15.
366. Sánchez M, Anitua E, Cugat R, Azofra J, Guadilla J, Seijas R, Andía I. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *J Orthop Trauma*. 2009b; 23: 52-59.
367. Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andía I. Platelet-Rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*. 2009c; 39: 345-354.
368. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andía I. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology, *Arthroscopy*. 2010; 470-480.
369. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials*. 2006; 27: 1817-1823.
370. Sarrafian TL, Wang H, Hackett ES, Yao JQ, Shih MS, Ramsay HL, Turner AS. Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a cross-linked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg*. 2010, 49:128-134.
371. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998 Sept; 94(4): 657-666.

372. Schepsis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med.* 2002; 30: 287-305.
373. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous Platelets Have No Effect on the Healing of Human Achilles Tendon Ruptures A Randomized Single-Blind Study. *Am J Sports Med.* 2011; 39: 38-47.
374. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 2007; 25: 230-240.
375. Sciore P, Boykiw R, Hart DA. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factors receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. *J Orthop Res.* 1998; 16: 429-437.
376. Scordino LE, DeBerardino TM. Biologic Enhancement of Meniscus Repair. *Clin Sports Med.* 2012; 31: 91.
377. Seijas R, Santana-Suarez RY, García-Balletbó M, Cusco X, Ares O, Cugat R. Delayed union of the clavicle treated with plasma rich in growth factors. *Acta Orthop Belg.* 2010; 76: 689-693.
378. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219 Feb: 983-985.
379. Serra C. Análisis biomecánico e histológico del tejido de reparación en defectos condrales de espesor completo tras la aplicación de Plasma Rico en Plaquetas autólogo. Estudio experimental., Cardenal Herrera University. Valencia. España. 2006.

380. Sharma P, Maffulli N. Current concepts review tendon injury and tendinopathy: Healing and repair. *J Bone Joint Surg-Am.* 2005a; 87a: 187-202.
381. Sharma P, Maffulli N. The future: rehabilitation, gene therapy, optimization of healing. *Foot Ankle Clin.* 2005b; 10: 383-397.
382. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6: 181-190.
383. Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing?. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009; 17: 676-682.
384. Simman R, Hoffmann A, Bohinc RJ, Peterson WC, Russ AJ. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing. *Ann Plast Surg.* 2008; 61: 337-344.
385. Sitaras NM, Sariban E, Pantazis P, Zetter B, Antoniades HN. Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. *J Cell Physiol.* 1987; 132: 376-380.
386. Skerry TM, Lanyon LE: Immobilisation induced bone loss in the sheep is not modulated by calcitonin treatment. *Bone.* 1993, 14: 511-516.
387. Skerry TM, Lanyon LE: Interruption of disuse by short duration walking exercise does not prevent bone loss in the sheep calcaneus. *Bone.* 1995, 16: 269-274.
388. Södersten F, Ekman S, Eloranta ML, Heinegård D, Dudhia J, Hultenby K. Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon. *Matrix Biol.* 2005 Aug; 24(5): 376-385.

389. Soler M. Análisis macroscópico, histológico e inmunohistoquímico del efecto del Plasma Rico en Plaquetas autólogo en la reparación de defectos condrales en conejo. Estudio experimental. Universidad Cardenal Herrera. Valencia. España. 2006.
390. Smith SE, Roukis TS. Bone and wound healing augmentation with platelet-rich plasma. *Clin Podiatr Med Surg*. 2009; 26: 559-588.
391. Spakova T, Rosocha J, Lacko M, Harvanova D, Gharaibeh A. Treatment of Knee Joint Osteoarthritis with Autologous Platelet-Rich Plasma in Comparison with Hyaluronic Acid. *Am J Phys Med Rehabil*. 2012.
392. 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; 19: 495-502.
393. Spencer EM, Liu CC, Si ECC, Howard GA. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*. 1991; 12: 21-26.
394. Spindler KP, Dawson JM, Stahlman GC, Davidson JM, Nanney LB. Collagen expression and biomechanical response to human recombinant transforming growth factor beta (rhTGF-beta 2) in the healing rabbit MCL. *J Orthop Res*. 2002; 20: 318-324.
395. Spindler KP, Murray MM, Detwiler KB, Tarter JT, Dawson JM, Nanney LB, Davidson JM. The biomechanical response to doses of TGF-beta 2 in the healing rabbit medial collateral ligament. *J Orthop Res*. 2003; 21: 245-249.
396. Spindler KP, Murray MM, Carey JL, Zurakowski D, Fleming BC. The Use of Platelets to Affect Functional Healing of an Anterior Cruciate Ligament (ACL) Autograft in a Caprine ACL Reconstruction Model. *J Orthop Res*. 2009; 27: 631-638.

397. Suba Z, Takacs D, Gyulai-Gaal S, Kovacs K. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: A histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19: 832-838.
398. Suchak AA, Bostick GP, Beaupre LA, Durand DC, Jomha NM. The influence of early weight-bearing compared with non-weight-bearing after surgical repair of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am*. 2008; 90: 1876-1883.
399. Suckow MA, Hodde JP, Wolter WR, Hiles MC: Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule material in a rat model. *J Mater Sci Mater Med*. 2007, 18:1105-1110.
400. Sumner DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor- β . *J Bone Joint Surg Am*. 1995 Aug; 77a(8): 1135-1140.
401. Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*. 2010; 34: 589-597.
402. Szabo S, Folkman J, Vattay P, Morales RE, Pinkus GS, Kato K. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology*. 1994; 104 (4): 1106-1111.
403. Tablin F. Platelet structure and function. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, et al (editores). *Schlam's veterinary haematology*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 2000; 448-452.
404. Takigawa M, Okawa T, Pan HO, Aoki C, Takahashi K, Zue JD, Suzuki F, Kinoshita A. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-

- derived chondrocyte cell line. HCS-2/8. *Endocrinology*. 1997; 138 (10): 4390-4400.
405. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 52: 161-165.
406. Taylor DW, Petrera M, Hendry M, Theodoropoulos JS. A Systematic Review of the Use of Platelet-Rich Plasma in Sports Medicine as a New Treatment for Tendon and Ligament Injuries. *Clin J Sport Med*. 2011; 21: 344-352.
407. Textor J. Autologous Biologic Treatment for Equine Musculoskeletal Injuries: Platelet-Rich Plasma and IL-1 Receptor Antagonist Protein. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2011; 27: 275.
408. Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, Sakijama-Elbert S, Harwood FL, Zampiakis E, Kim HM, Amiel D, Gelberman RH. Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res*. 2009; 25.
409. Thomopoulos S, Kim HM, Das R, Silva MJ, Sakiyama-Elbert S, Amiel D, Gelberman RH. The effects of exogenous basic fibroblast growth factor on intrasynovial flexor tendon healing in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Oct; 92(13): 2285-2293.
410. Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF- β binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 38-41.
411. Torricelli P, Fini M, Filardo G, Tschon M, Pischedda M, Pacorini A, Kon E, Giardino R. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop*. 2011; 35: 1569-1576.
412. Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, Zhao C, An KN. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg*. 2004; 53: 393-397.

413. Tsukiyama K, Acorda JA, Yamada H. Evaluation of superficial digital flexor tendinitis in racing horses through gray scale histogram analysis of tendon ultrasonograms. *Vet Radiol Ultrasound*. 1996; 37: 46-50.
414. Tsuzaki M, Brigman BE, Yamamoto J, Lawrence T, Simmons JG, Mohapatra NK, Lund PK, van Wyk J, Hannafin JA, Bhargava MM, Banes AJ. Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells. *J Orthop Res*. 2000; 18: 546-556.
415. Tuite DJ, Renstrom P, O'Brien M. The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports*. 1997; 7: 72-77.
416. Valenti Nin JR, Mora Gasque G, Valenti Azcarate A, Aquerreta Beola JD, Hernandez Gonzalez M. Has Platelet-Rich Plasma Any Role in Anterior Cruciate Ligament Allograft Healing? *Arthroscopy*. 2009; 25: 1206-1213.
417. van Buul GM, Koevoet WLM, Kops N, Bos PK, Verhaar JAN, Weinans H, Bernsen MR, van Osch GJVM. Platelet-Rich Plasma Release Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. *Am J Sports Med*. 2011; 39: 2362-2370.
418. van Osch GJVM, van den Berg WB, Hunziker EB, Häuselmann HJ. Differential effects of IGF-1 and TGF-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998; 6: 187-195.
419. van Schie JT, Bakker EM, van Weeren PR. Ultrasonographic evaluation of equine tendons: a quantitative in vitro study of the effects of amplifier gain level, transducer-tilt, and transducer-displacement. *Vet Radiol Ultrasound*. 1999 Mar-Apr; 40(2): 151-160.

420. van Schie HT, Bakker EM. Structure-related echoes in ultrasonographic images of equine superficial digital flexor tendons. *Am J Vet Res.* 2000 Feb; 61(2): 202-209.
421. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of gray level statistics. *Am J Vet Res.* 2000 Feb; 61(2): 210-219.
422. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Efficacy of computerized discrimination between structure-related and non-structure-related echoes in ultrasonographic images for the quantitative evaluation of the structural integrity of superficial digital flexor tendons in horses. *Am J Vet Res.* 2001 Jul; 62(7): 1159-1166.
423. van Schie HT, Bakker EM, Jonker AM, van Weeren PR. Computerized ultrasonographic tissue characterization of equine superficial digital flexor tendons by means of stability quantification of echo patterns in contiguous transverse ultrasonographic images. *Am J Vet Res.* 2003 Mar; 64(3): 366-375.
424. van Schie HT, Bakker EM, Cherdchutham W, Jonker AM, van de Lest CH, van Weeren PR. Monitoring of the repair process of surgically created lesions in equine superficial digital flexor tendons by use of computerized ultrasonography. *Am J Vet Res.* 2009 Jan; 70(1): 37-48
425. van Schie HTM, de Vos RJ, de Jonge S, Bakker EM, Heijboer MP, Verhaar JAN, Tol JL, Weinans H. Ultrasonographic tissue characterisation of human Achilles tendons: quantification of tendon structure through a novel non-invasive approach. *Br J Sports Med.* 2010; 44: 1153-1159.
426. Vasconcelos E, Figueiredo AC, Seghatchian J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. *Transfus Apher Sci.* 2003; 29(1): 13-16.

427. Ventura A, Terzaghi C, Borgo E, Verdoia C, Gallazzi M, Failoni S. Use of growth factors in ACL surgery: preliminary study. *J Orthop Traumatol.* 2005; 6: 76-79.
428. Verschure PJ, van Marle J, Joosten LAB, Helsen MMA, Lafeber FPJG, van den Berg WB. Localization of insulina-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan síntesis and content. *Br J Rheumatol.* 1996; 35: 1044-1055.
429. Vikjaer D, Blom S, Hjorting-Hansen E, Pinholt EM. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 59-66.
430. 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.* 2006a; 77: 806-812.
431. Virchenko O, Grenegard M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop.* 2006b; 960-966.
432. Virchenko O, Fahlgren A, Rundgren M, Aspenberg P. Early Achilles tendon healing in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008; 128: 1001-1006.
433. Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, Kern A, Ratcliffe A, Gardner KL. Growth Factor-Rich Plasma Increases Tendon Cell Proliferation and Matrix Synthesis on a Synthetic Scaffold: An In Vitro Study. *Tissue Eng.* 2010; 16a: 1021-1029.
434. Vogrin M, Ruprecht M, Dinevski D, Haspl M, Kuhta M, Jevsek M, Knezevic M, Rozman P. Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind, clinical trial. *Eur Surg Res.* Basel., Switzerland. 2010; 77-85.

435. Wada A, Kubota H, Miyanishi K, Hatanaka H, Miura H, Iwamoto Y: Comparison of postoperative early active mobilization and immobilization in vivo utilising a four-strand flexor tendon repair. *J Hand Surg Br* 2001, 26:301-306.
436. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Aug; 84: 5788-5792.
437. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, Yang LC. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction - A study in rabbits. *J Orthop Res*. 2003; 21: 984-989.
438. Wang JHC, Jia FY, Gilbert TW, Woo SLY. Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech*. 2003; 36: 97-102.
439. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech*. 2006; 39: 1563-1582.
440. Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cusco X, Garcia-Balletbo M. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011; 131: 311-317.
441. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, Bertone AL. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc*. 2008; 232: 1515-1520.
442. Waterston SW, Maffulli N, Ewen SWB. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon: basic science and some aspects of clinical practice. *Br J Sports Med*. 1997; 31: 285-298.

443. Weatherall JM, Mroczek K, Tejwani N. Acute Achilles Tendon Ruptures. *Orthopedics*. 2010; 33: 758-764.
444. Weibrich G, Buch RSR, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*. 2002a; 20(2): 93-97.
445. Weibrich G, Kleis WKG. Curasan PRP Kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Impl Res*. 2002b; 13: 437-443.
446. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002c; 17: 184-190.
447. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PReP[®] system versus the Friadent-Schülze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res*. 2003a; 14: 233-239.
448. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res*. 2003b; 14: 357-362.
449. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler W. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34: 665-671.
450. Weibrich G, Kleis WKG, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the Plasma-Rich-in-Growth-Factor Kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20: 118-123.

451. Weiner BK, Walker M. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions. *Spine*. 2003; 28: 1968-1970.
452. Westphal RG. Health risks to cytopheresis donors. *Clin Haematol*. 1984; 13(1): 289-301.
453. Weyrich AS, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelets, endothelial cells, inflammatory chemokines, and restenosis. Complex signalling in the vascular play book. *Circulation*. 2002; 106: 1433-1435.
454. 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; 55: 1294-1299.
455. Wiegerinck JI, Reilingh ML, de Jonge MC, van Dijk CN, Kerkhoffs GM. Injection techniques of platelet-rich plasma into and around the Achilles tendon: a cadaveric study. *Am J Sports Med*. 2011 Aug; 39(8): 1681-1686.
456. Woo SLY, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JHC. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; S312-S323.
457. Wood AK, Sehgal CM, Polansky M. Sonographic brightness of the flexor tendons and ligaments in the metacarpal region of horses. *Am J Vet Res*. 1993 Dec; 54(12): 1969-1974.
458. Wu W, Cben F, Liu Y, Ma Q, Mao T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: Experimental study in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65: 1951-1957.
459. Wu W, Zhang J, Dong Q, Liu Y, Mao T, Chen F. Platelet-rich plasma - A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. *Med Hypotheses*. 2009; 72: 455-457.

460. Yasuda K, Tomita F, Yamazaki S, Minami A, Tohyama H. The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction - A canine model study. *Am J Sports Med.* 2004; 32: 870-880.
461. Yeung CK, Guo X, Ng YF: Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res.* 2006, 24:193-201.
462. Yinger K, Mandelbaum BR, Almekinders LC. Achilles rupture in the athlete. Current science and treatment. *Clin Podiatr Med Surg.* 2002; 19: 231-50.
463. Yoshida S, Yamaguchi Y, Itami S, Yoshikawa K, Tabata Y, Matsumoto K, Nakamura T. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J Invest Dermatol.* 2003; 120: 335-343.
464. Yoshikawa Y, Abrahamsson SO. Dose related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro. *Acta Orthop Scand.* 2001; 72(3): 287-292.
465. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 1998; 16: 406-413.
466. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood.* 2000 Jun; 95(12): 4004-4007.
467. Yuan T, Zhang C, Zeng B. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): A case report. *Transfus Apher Sci.* 2008; 38: 167-173.
468. Yuehuei H. An, Freidman RJ. Animal Models in Orthopaedic Research. CRC; 1 Ed. Septiembre 30, 1998.

469. Zhang F, Liu H, Stile F, Lei MP, Pang Y, Oswald TM, Beck J, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112: 1613-1619.
470. Zhang J, Wang JHC. Platelet-Rich Plasma Releasate Promotes Differentiation of Tendon Stem Cells Into Active Tenocytes. *Am J Sports Med*. 2010; 38: 2477-2486.
471. Zhao CF, Amadio PC, Tanaka T, Kutsumi K, Tsubone T, Zobitz ME, An KN: Effect of gap size on gliding resistance after flexor tendon repair. *J Bone Joint Surg-Am*. 2004, 86a: 2482-2488.
472. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*. 2001; 41: 1217-1224.
473. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2003; 85: 283-289.