

**Universidad Cardenal Herrera-CEU**

**Departamento Medicina y Cirugía Animal**



Valoración Biomecánica del Efecto de la  
Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en  
la Reparación de una Lesión Estándar del  
Tendón Calcáneo Común en Ovejas.  
Estudio Experimental

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

Diego López Nájera

VALENCIA  
2014



## ***Agradecimientos***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Agradecimientos

Esta tesis doctoral se ha hecho realidad gracias a la inestimable colaboración de muchas personas y entidades. Sin todos ellos no hubiera sido posible.

Gracias a mis directores de tesis, los Profesores José María Carrillo Poveda, Mónica Rubio Zaragoza y Joaquín J. Sopena Juncosa de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia. Gracias al Dr. Carrillo por darme la oportunidad y desarrollar todo lo necesario para poder llevar a cabo esta tesis doctoral. Su enorme capacidad de trabajo y su entusiasmo hace que lo difícil sea fácil. Gracias por su confianza y su amistad. Gracias a la Dra. Rubio por su valioso trabajo, efectivo y ordenado. Sus conocimientos, su control, y sus correcciones han sido indispensables en esta tesis doctoral. Gracias al Dr. Joaquín Sopena Juncosa por su colaboración, por su rigurosidad en el trabajo, y por sus acertadas opiniones.

Gracias a los Profesores Juan Manuel Domínguez Pérez y María del Mar Granados Machuca de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. Su trato, siempre amable y colaborador, nos abrió las puertas de sus instalaciones y su colaboración fue siempre diligente.

Gracias al Dr. J. Andrés Fernández Sarmiento por haber marcado el camino en su excelente trabajo de tesis doctoral. Esta tesis sirve para complementar y continuar la investigación emprendida por el Dr. Fernández, quien fue el pionero validando el modelo experimental y realizando los estudios histológicos y ecográficos.

Gracias al personal laboral de la Granja Experimental y al equipo que colabora con el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

Gracias a Alejandro Tarragó Riverola, Xavier Totusaus Calve, Angel Duran Segovia y Víctor Trilla Muntañola. Todos ellos fundadores del IVOT (Instituto Veterinario de Ortopedia y Traumatología) con los que he podido compartir muy buenos momentos personales y que me han enseñado una gran parte de los conocimientos adquiridos en traumatología veterinaria. Gracias a Alex Tarragó por haber sido el punto de partida y el alma del IVOT, el responsable de nuestra relación con la Facultad de Veterinaria del CEU de Valencia y el impulsor de la creación de la Fundación García Cugat. Sin todo ello no se hubiera hecho realidad esta tesis doctoral nacida a la luz de esta colaboración.

Gracias al Dr. Ramón Cugat Bertomeu y la Dra. Montserrat García Balletbó, así como a la Fundación García Cugat para la Investigación Biomédica. Su apoyo profesional, moral y económico ha sido indispensable para conseguir nuestra meta.

Gracias a Víctor J. Primo Capella, del Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV), por su excelente trabajo en los ensayos biomecánicos y su paciencia al solucionar siempre mis numerosas dudas.

Gracias a Carlos González Díaz, Natividad Hurtado Villar y Peter Kasamaki, por su valioso trabajo en la corrección de estilo y de redacción.

Gracias a mi equipo de la Clínica Veterinaria Gramenet y del Hospital Veterinario Montigalá. Su fidelidad, su profesionalidad y su enorme calidad humana me han dado el respaldo y la seguridad necesaria para afrontar este reto.

Gracias a mi mujer y a mis hijos por su amor incondicional.

Gracias a mi padre y a mi madre, que en paz descansen, por educarme con cariño en la cultura del esfuerzo.





## *Índices*

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Índice de Contenido

Introducción .....	3
Hipótesis y Objetivos .....	7
Revisión Bibliográfica.....	13
Histología del tendón de Aquiles .....	19
Biomecánica del tendón de Aquiles .....	21
Lesiones del tendón de Aquiles.....	23
Epidemiología, etiología y patogenia .....	23
Diagnóstico y tratamiento .....	25
Nuevas terapias para las lesiones del tendón de Aquiles .....	28
Proceso cicatricial del tendón.....	31

Etapas en la cicatrización tendinosa.....	31
Periodo inflamatorio.....	31
Periodo proliferativo.....	32
Periodo de remodelación.....	33
Cicatrización tendinosa intrínseca y extrínseca. Mediación en la cicatrización.....	34
Las plaquetas en el proceso de cicatrización.....	38
Gránulos plaquetarios.....	40
Gránulos alfa.....	40
Gránulos densos.....	42
Gránulos lisosomales.....	43
Respuesta plaquetaria tras un daño tisular.....	43
Factores de crecimiento.....	45
Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF).....	46
Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ).....	50
Factor de Crecimiento Insulínico (IGF).....	54
Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF).....	57
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF).....	60
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).....	61
Factor de Crecimiento Neurotrófico (NGF).....	63
Factor de Crecimiento Hepatocítico (HGF).....	64
¿Cómo se obtiene el Plasma Rico en Plaquetas (PRP)?.....	65
Obtención de PRP por aféresis.....	66
Obtención de PRP mediante sistema de centrifugación simple en tubo: PRGF System <sup>®</sup> (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain).....	67
Obtención de PRP mediante sistemas de doble centrifugación en tubo.....	70
Método de Landesberg.....	70
Curasan PRP <sup>®</sup> Kit.....	70

---

Friadent-Schütze PRP <sup>®</sup> Kit.....	71
Obtención de PRP mediante sistemas semiautomáticos comerciales.....	73
Platelet Concentrate Collection System .....	74
Gravitational Platelet Separation .....	75
Smart PReP <sup>®</sup> System.....	76
Plateltex <sup>®</sup> .....	77
Secquire PRP <sup>®</sup> System.....	78
Arthrex ACP <sup>®</sup> System.....	78
Otros dispositivos comerciales .....	79
Cartílago y lesiones articulares .....	82
Estudios experimentales.....	83
Estudios clínicos.....	85
Lesiones ligamentosas.....	86
Estudios experimentales.....	88
Estudios clínicos.....	90
Lesiones óseas .....	93
Estudios experimentales.....	94
Estudios clínicos.....	96
Lesiones musculares.....	98
Estudios experimentales.....	98
Estudios clínicos.....	99
Lesiones meniscales .....	101
Lesiones tendinosas .....	102
Estudios experimentales.....	103
Estudios clínicos.....	111
Tendón de Aquiles.....	112
Tendinopatía crónica del tendón de Aquiles .....	113

Tendinopatía del codo.....	115
Tendinopatía del tendón rotuliano.....	116
Reparación del manguito rotador.....	117
Lesiones tendinosas en caballos.....	119
Conclusiones sobre el empleo de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas ....	120
Material y Métodos.....	125
Modelo animal.....	128
Diseño experimental.....	130
Grupos experimentales y cronología del estudio.....	130
Estabulación y hospitalización.....	131
Protocolo anestésico y control preoperatorio.....	132
Preparación quirúrgica del paciente.....	134
Procedimiento quirúrgico.....	134
Inmovilización postoperatoria del tendón de Aquiles.....	138
Obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles de la oveja.....	143
Obtención del PRGF en la especie ovina.....	143
Extracción de sangre.....	143
Protocolo de centrifugación.....	144
Aislamiento del PRGF.....	145
Activación del PRGF.....	148
Aplicación del PRGF en la zona lesionada.....	149
Aplicación intraquirúrgica del PRGF.....	149
Aplicaciones del PRGF durante el periodo postoperatorio.....	151
Exámenes físicos durante el periodo de estudio.....	152
Obtención y procesado de las muestras.....	153
Estudio biomecánico.....	155
Ensayo de caracterización mecánica del tejido tendinoso.....	157

---

Introducción de una nueva metodología de ensayo .....	158
Preparación de las muestras para ensayo .....	159
Metodología del ensayo.....	160
VARIABLES DE ESTUDIO.....	161
Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano .....	161
Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano .....	162
Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano .....	162
Estudio estadístico .....	163
Estudio del efecto del factor tiempo en el proceso de reparación del tejido tendinoso.....	164
Estudio del efecto del factor tratamiento en el proceso de reparación del tejido tendinoso.....	164
Herramientas estadísticas .....	164
Resultados.....	167
Metodología para la evaluación biomecánica.....	170
Hallazgos clínicos durante el modelo de rotura del tendón.....	171
Evolución del peso .....	172
Evaluación del grado de cojera .....	173
Hallazgos biomecánicos durante el modelo de rotura de tendón.....	174
Estudio descriptivo de las variables .....	174
PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. PCB: Placebo .....	184
Estudio del factor tratamiento .....	184
Periodo de 2 Semanas.....	184
Periodo de 4 Semanas.....	186
Periodo de 8 Semanas.....	187
Estudio del factor Tiempo.....	189
Tratamiento PCB.....	189
Tratamiento con PRGF.....	190

Estudio del factor tratamiento.....	195
Periodo de 2 Semanas.....	195
Periodo de 4 Semanas.....	196
Periodo de 8 Semanas.....	198
Estudio del factor Tiempo.....	199
Tratamiento Placebo.....	199
Tratamiento con PRGF.....	201
Estudio del factor tratamiento.....	206
Periodo de 2 Semanas.....	206
Periodo de 4 Semanas.....	207
Periodo de 8 Semanas.....	208
Estudio del factor Tiempo.....	210
Tratamiento Placebo.....	210
Tratamiento con PRGF.....	212
Discusión.....	213
Evaluación del modelo experimental.....	215
Uso de PRGF.....	219
Metodología de ensayo biomecánico.....	223
Variables del estudio.....	227
Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.....	228
Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.....	230
Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.....	231
Conclusiones.....	235
Resumen.....	239
Summary.....	245
Limitaciones del estudio. Futuras líneas de trabajo.....	249
Bibliografía.....	255



## Índice de Tablas

Tabla 1. Contenido de los gránulos alfa de las plaquetas.....	42
Tabla 2: Métodos de obtención de PRP. (*) Referencias bibliográficas a lo largo del texto. ...	80
Tabla 3. Distribución de ovejas por grupo y tiempo.....	131
Tabla 4. Diseño de experiencias utilizado en el estudio. ....	156
Tabla 5. Condiciones del ensayo de tracción de tendones. ....	161
Tabla 6. Tabla comparativa de los pesos de los animales al principio y al final del estudio. ....	172
Tabla 7. Tabla comparativa del grado de cojera (AAEP lameness scale) a lo largo del periodo de estudio.....	173
Tabla 8. Relación de datos obtenidos en los ensayos .....	174

Tabla 9. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 2 semanas. ....	177
Tabla 10. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 2 semanas. ....	178
Tabla 11. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 4 semanas. ....	178
Tabla 12. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 4 semanas. ....	179
Tabla 13. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 8 semanas. ....	179
Tabla 14. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 8 semanas. ....	180
Tabla 15. Test de Q de Dixon realizado a los posibles valores anómalos detectados en el diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano. ....	183
Tabla 16. Tabla de resultados descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano. ....	184
Tabla 17. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas. ....	186
Tabla 18. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas. ....	187
Tabla 19. Resultados del test de Levene y el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 Semanas. ....	188
Tabla 20. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio Placebo. ....	190

---

Tabla 21. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB.....	190
Tabla 22. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PRGF. ....	191
Tabla 23. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRGF. ....	192
Tabla 24. Test de Q de Dixon realizado a los posibles valores anómalos detectados en el diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano. ....	194
Tabla 25. Tabla de descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano. ....	195
Tabla 26. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas. ....	196
Tabla 27. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas. ....	197
Tabla 28. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 semanas. ....	199
Tabla 29. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PCB.....	200
Tabla 30. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB. ....	200

Tabla 31. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PRGF.....	202
Tabla 32. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRGF. ....	202
Tabla 33. Test Q de Dixon realizado para los grupos de estudio con un solo valor anómalo. ....	204
Tabla 34. Test Grubbs realizado para el grupo de estudio con dos posibles valores anómalos. ....	204
Tabla 35. Tabla de descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano. ....	206
Tabla 36. Test adicional no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparación de medias, aplicado a la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas. ....	207
Tabla 37. Resultado obtenido para el test de Kruskal-Wallis para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas.....	208
Tabla 38. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 Semanas.....	209
Tabla 39. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PCB. ....	211
Tabla 40. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB. ....	211
Tabla 41. Resultados obtenidos para el test de Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRFC. ....	212

## Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía del tendón de Aquiles (especie humana).....	16
Figura 2. Organización de las fibras de colágeno en haces para constituir la estructura básica de los tendones. ....	19
Figura 3. Cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina. Tendón de Aquiles normal con tenocitos (A) y en proceso de cicatrización con fibroblastos (B). Las líneas discontinuas de ambas imágenes indican la dirección del eje longitudinal del tendón de Aquiles. ....	20
Figura 4. Patrones de sutura comunes para la anastomosis término-terminal del tendón. ....	27
Figura 5. Material necesario para la preparación de PRGF, según la metodología BTI Biotechnology Institute. ....	68
Figura 6. Proceso de pipeteo fraccionado para el aislamiento del PRGF. ....	69

Figura 7. Secquire PRP® System ( <a href="http://www.secquire.com">http://www.secquire.com</a> ).....	78
Figura 8. Parte del grupo de ovejas empleado para la realización de esta tesis.....	129
Figura 9: Estabulación en las instalaciones del patio interior de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba.....	131
Figura 10. Cateterización de la vena yugular externa para la administración intravenosa de los agentes preanestésicos.....	132
Figura 11. La intubación endotraqueal es particularmente difícil en esta especie debido a que la glotis se encuentra alejada de la entrada de la boca. Se utilizó un laringoscopio de pala larga y un fiador metálico introducido por la luz del tubo endotraqueal para ayudar a dirigirlo hacia el interior de la tráquea.....	133
Figura 12. Extremidad colgada del techo, delimitando el campo quirúrgico mediante paños de campo estériles. La zona distal de la extremidad se cubre con vendas cohesivas estériles respetando las normas de asepsia.....	134
Figura 13. Incisión cutánea de 8 cm en la zona lateral de la piel que recubre el tendón de Aquiles.....	135
Figura 14. Disección de la fascia que recubre el tendón de Aquiles.....	135
Figura 15. Exposición del tendón de Aquiles.....	135
Figura 16. Localización y marcado de la zona de tenotomía.....	135
Figura17. Patrón en triple polea para la sutura del tendón.....	136
Figura 18. Pre-sutura del tendón. Se realizan las diferentes lazadas que conforman el patrón en triple polea.....	136
Figura19. Tenotomía completa del tendón de Aquiles, a 5 cm de la inserción del tendón en el calcáneo, apartando hacia un lado las lazadas de la triple polea.....	137
Figura 20. Recolocación de las lazadas de la triple polea y aproximación de los dos bordes tendinosos recién cortados.....	137
Figura 21. Anudado de la sutura. Nos aseguramos de que los bordes de la tenotomía queden perfectamente posicionados.....	137
Figura 22. Sutura del peritendón mediante un patrón simple continuo.....	138
Figura 23. Cierre cutáneo con un patrón simple discontinuo.....	138

Figura 24. Esquema del fijador externo transarticular de tarso (T-TAESF) para proteger el tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio. ....	139
Figura 25. Incisiones cutáneas en el punto donde se coloca la aguja. ....	140
Figura 26. Colocación de las agujas de punta roscada positiva de 3.0 mm. ....	140
Figura 27. Unión de las agujas a las barras conectoras de la tibia y del metatarso. Ambas barras conectoras se unen entre sí por medio de una rótula de Meynard de 4.0 mm x 4.0 mm, formando un ángulo de 140°. ....	141
Figura 28. Consolidación del montaje mediante la colocación de dos barras conectoras de 4 mm. entre la barra conectora de la tibia y la del metatarso con rótulas de Meynard de 4.0 mm x 4.0 mm. ....	141
Figura 29. Protección del T-TAESF mediante un vendaje para evitar que los animales se lesionen con las barras conectoras. ....	142
Figura 30. Centrifugado de la sangre a 630 G durante 8 minutos. ....	144
Figura 31. Tubo de sangre tras el proceso de centrifugado. La fracción plasmática y el sedimento eritrocitario quedan separados por una delgada capa leucocitaria o "buffycoat". ....	146
Figura 32. Campana de flujo laminar para el proceso de pipeteo de la fracción plasmática en el aislamiento del PRGF empleando material estéril y respetando estrictamente las normas de asepsia. ....	146
Figura 33. Procedimiento de fraccionamiento del plasma para la obtención del PRGF, según las instrucciones de BTI®. ....	147
Figura 34. Diferentes fracciones plasmáticas aisladas de cada uno de los cuatro tubos depositadas en un tubo estéril correctamente identificado. ....	148
Figura 35. Jeringa con los 2 mL de PRGF junto con el volumen de cloruro de calcio empleado para la activación plaquetaria. ....	150
Figura 36. El cloruro de calcio se introduce en el interior de la jeringa con el PRGF y se mezcla suavemente. Antes de la inyección intratendinosa del PRGF activado es necesario eliminar todo el aire y burbujas del interior de la jeringa. ....	150

Figura 37. Aplicación intraquirúrgica del PRGF realizada tras la sutura del peritendón. Los dos bordes tendinosos recién suturados se infiltran empleando una aguja de 23G.....	151
Figura 38. Disección del tendón de Aquiles tras la eutanasia.....	154
Figura 39. Ambos tendones, el sano y el intervenido.....	154
Figura 40. Empaquetado de las muestras.....	155
Figura 41. Fotografía de las mordazas denominadas "cryojaws". .....	158
Figura 42. Disposición final de los tendones en las mordazas de ensayo.....	160
Figura 43. Montaje final de las mordazas en la máquina de ensayos y resultado final tras el ensayo.....	160
Figura 44. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.....	182
Figura 45. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano tras la eliminación de los valores anómalos.....	183
Figura 46. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.....	185
Figura 47. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas.....	187
Figura 48. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas.....	188
Figura 49. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo PCB.....	189
Figura 50. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo de estudio PRGF.....	191
Figura 51. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.....	194
Figura 52. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.....	195



---

Figura 53. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas. ....	197
Figura 54. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas. ....	198
Figura 55. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo PCB. ....	199
Figura 56. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo PRGF. ....	201
Figura 57. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano. ....	205
Figura 58. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas. ....	207
Figura 59. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas. ....	208
Figura 60. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas. ....	209
Figura 61. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo PCB. ....	210
Figura 62. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo PRGF. ....	212



## *Listado abreviaturas*

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Listado de abreviaturas

A continuación se detallan todas las abreviaturas que aparecen a lo largo del documento:

- ACP: Plasma autólogo acondicionado.
- ADP: Adenín difosfato.
- aFGF: Factor de crecimiento fibroblástico ácido.
- bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico.
- BMP: Proteína morfogenética ósea.
- CDMP: Proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago.
- CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.
- EGF: Factor de crecimiento endotelial.
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

- GPS: Gravitational platelet separation.
- HGF: Factor de crecimiento hepatocítico.
- IGF: Factor de crecimiento insulínico.
- Ig: Inmunoglobulinas.
- IL: Interleucina.
- KW: Kruskal Wallis
- MMPs: Metaloproteasas.
- NGF: Factor de crecimiento neurotrófico.
- O: Operado.
- PAF: Factor de activación plaquetario.
- PCB: Placebo.
- PCCS: Platelet concentrate collection system.
- PDCI: Inhibidor de la colagenasa derivado de plaquetas.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- PF: Factor plaquetario.
- PRFC: Plasma rico en factores de crecimiento.
- PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento.
- PPGF: Plasma pobre en factores de crecimiento.
- PRP: Plasma rico en plaquetas.
- PPP: Plasma pobre en plaquetas.
- S: Sano.
- SSF: Solución salina
- TIMPs: Inhibidores tisulares de las metaloproteasas.
- TGF: Factor de crecimiento transformante.
- T-TAESF: Fijador externo transarticular tarsal modificado.
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.
- WADA: World antidoping agency.

# ***Introducción***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**





## Introducción

Las lesiones tendinosas son una de las principales causas de morbilidad de origen músculo-esquelético. Entre el 30 y el 50 % de las lesiones deportivas tienen relación directa con un patología de tipo tendinosa (Andía *et al.*, 2010). El tendón es una estructura anatómica con un bajo potencial de cicatrización debido a su pobre vascularización y escasez de tenocitos (Fenwick *et al.*, 2002).

La reparación de las lesiones del tejido tendinoso es un proceso complicado que necesita diversos mecanismos de división celular, formación de nuevos vasos sanguíneos, síntesis de matriz extracelular y remodelación del nuevo tejido de reparación. Para conseguir de forma efectiva este proceso participan muchos elementos; diferentes líneas celulares y diversas proteínas, metabolitos y electrolitos. La comunidad científica intenta encontrar terapias eficaces que ayuden a mejorar el

tratamiento de este tipo de lesiones (Kaux *et al.*, 2012; Monto *et al.*, 2012; Uysal *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012; Kaux *et al.*, 2013).

Las plaquetas han demostrado tener un papel fundamental en el inicio y mantenimiento del proceso de reparación y regeneración de los tejidos. Después de un daño tisular se produce una extravasación de células sanguíneas que organizan un coágulo y la degranulación de las plaquetas que lo conforman. Los gránulos plaquetarios contienen en su interior diversos factores de crecimiento que inician la sucesión de eventos que conduce a la cicatrización del tejido (Bennett y Schultz, 1993; Anitua *et al.*, 2004). Además, las plaquetas actúan como moduladoras de la morfogénesis, del crecimiento y de la diferenciación celular, gracias a los factores de crecimiento del interior de sus gránulos alfa (Anitua *et al.*, 2004). En el proceso de cicatrización tisular también participan otras líneas celulares capaces de producir factores de crecimiento. Entre ellas destacan las células inflamatorias, fibroblastos, células epiteliales y células del endotelio vascular (Bennett y Schultz, 1993). Aunque cada vez se conocen mejor los mecanismos de cicatrización de este tejido, actualmente todavía se desconoce buena parte de los procesos bioquímicos que tienen lugar en el tejido tendinoso durante el proceso de cicatrización (Andía *et al.*, 2010).

A principios de los años 80 Knighton y colaboradores (1982) demostraron la capacidad del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) para inducir angiogénesis, fibroplasia y síntesis de colágeno en la cicatrización de tejidos. Se apuntaba a las plaquetas como una importante fuente de factores de crecimiento (Ross *et al.*, 1986). Las terapias basadas en la aplicación de plasma autólogo, proporcionan 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 que juegan un papel importante en el proceso de reparación y regeneración tisular (Anitua *et al.*, 2004).

El PRP se ha empleado con buenos resultados en la cirugía oral y maxilofacial (Marx *et al.*, 1998; Anitua *et al.*, 1999; Carlson y Roach, 2002), en la cirugía plástica (Bhanot y Alex, 2002) y en la cirugía ortopédica (Lowery *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003a; Mishra *et al.*, 2009b).

Seguramente es en las lesiones del tendón donde más se ha extendido su uso clínico. No obstante, algunos estudios clínicos ponen en entredicho el efecto beneficioso de la aplicación de PRP para incrementar el proceso de cicatrización del tendón. De este modo, actualmente existe una controversia acerca de la utilidad clínica de estas terapias para el manejo terapéutico de patologías tendinosas (Andía *et al.*, 2010; Engebretsen *et al.*, 2010; Kon *et al.*, 2011; Paoloni *et al.*, 2011).

Algunos factores de crecimiento son primordiales en el proceso de cicatrización tendinosa, como el PDGF, TGF- $\beta$ 1, VEGF, EGF, bFGF y IGF-I entre otros muchos (Molloy *et al.*, 2003; Hsu y Chang, 2004). Parece que la acción de un único factor de crecimiento no produce un efecto terapéutico significativo y que, para observar una mejoría en la cicatrización del tendón, es necesaria la participación de varios factores de crecimiento y que otras moléculas se encuentren en equilibrio anabólico y catabólico (Maffulli *et al.*, 2000).

Recientemente se ha evidenciado en un estudio experimental, que la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en lesiones completas de tendón de Aquiles de ovejas, acelera el proceso de cicatrización del tendón (Fernández *et al.*, 2013). Aparecen cambios histológicos como una mejor organización de las fibras de colágeno y una mejor orientación de los núcleos de los fibroblastos, así como un descenso en el número de vasos sanguíneos y un descenso en la densidad de fibroblastos (Fernández *et al.*, 2013).

Algunos estudios han evidenciado una mayor resistencia mecánica en tendones calcáneos de ratas lesionados quirúrgicamente tras la aplicación de PRP (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012) pero sólo valoran la fuerza total del tendón tratado, sin llegar a valorar la calidad del tejido neo-formado.

Es importante por lo tanto obtener un método útil y repetitivo que permita la estandarización de los parámetros de resistencia mecánica. Aún a día de hoy, hay serios problemas en el diseño de estudios de resistencia mecánica, bien por los parámetros a medir, o por las complicaciones técnicas a la hora de diseñar las mordazas de agarre (Baums *et al.*, 2008; Bowser *et al.*, 2011).

Los correctos diseños experimentales nos permitirían correlacionar los resultados histológicos con los resultados de resistencia, lo que de verdad daría una aplicación real a las terapias.

## ***Hipótesis y Objetivos***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Hipótesis de Trabajo

Las lesiones tendinosas son frecuentes y una de las principales causas de morbilidad de origen músculo-esquelético en el ámbito del deporte (Andía *et al.*, 2010). La aplicación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en este tipo de lesiones, ha demostrado un acortamiento en los tiempos de cicatrización así como en la recuperación. Recientemente se ha evidenciado que, la aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en lesiones completas de tendón de Aquiles de ovejas, acelera el proceso de cicatrización del tendón (Fernández *et al.*, 2013).

No obstante, algunos estudios clínicos ponen en entredicho el efecto beneficioso de la aplicación de PRP para incrementar el proceso de cicatrización del tendón. Existe

actualmente controversia acerca de la utilidad clínica para el manejo terapéutico de patologías del tendón.

Algunos trabajos han probado una mayor resistencia mecánica en tendones calcáneos de ratas lesionados quirúrgicamente tras la aplicación de PRP (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012), pero sólo valoran la fuerza total del tendón tratado, sin llegar a valorar la calidad del tejido neo-formado. Además, utilizan el nitrógeno líquido para congelar el sistema de agarre mordaza-muestra anatómica para los estudios biomecánicos, método que dificulta mucho la manipulación de las muestras.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la aplicación de PRGF puede ayudar a mejorar la resistencia mecánica de los tendones de Aquiles lesionados. Para poder demostrar esta hipótesis tenemos que mejorar los sistemas de sujeción de las muestras tendinosas a evaluar en los test de ensayos, minimizando así los problemas que hasta la fecha han acompañado a este tipo de estudios.



## Objetivos

Basándonos en la hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos, que han de guiar el desarrollo de esta tesis doctoral:

- Valorar una nueva metodología que facilite y mejore la sujeción de muestras anatómicas tendinosas en ensayos biomecánicos, que cumpla con los siguientes objetivos:
  - El no deslizamiento de la muestra en las mordazas de ensayo.
  - La determinación de la resistencia a la tracción en la zona de interés.
  - La integridad de los tejidos adyacentes a la zona de interés, con el objetivo de no comprometer dicha zona.

- Evaluación biomecánica del efecto que tiene la aplicación de inyecciones intra-tendinosas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre la cicatrización del tendón de Aquiles, en comparación con un grupo Placebo. Para ello se empleará un modelo experimental en oveja, previamente validado para el estudio histológico y ecográfico. Se testarán los tendones en máquina universal de ensayos para evaluar la resistencia mecánica a la tracción del tejido de cicatrización. Se ha planteado la valoración del tejido de cicatrización con tres parámetros diferentes:
  - Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.
  - Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.
  - Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.

## ***Revisión Bibliográfica***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Anatomía del tendón de Aquiles

El tendón más fuerte y grueso del cuerpo humano es el tendón de Aquiles y su función es conectar el músculo tríceps sural (músculo sóleo y las dos cabezas del músculo gastrocnemio) al hueso calcáneo (O'Brien, 2005; Benjamin *et al.*, 2007).

En los cóndilos femorales se originan las cabezas lateral y medial del músculo gastrocnemio y en su porción más distal comienza su contribución al tendón de Aquiles. El sóleo, que se origina en la cara posterior de la cabeza del peroné y la línea del sóleo de la tibia, ofrece una contribución al tendón de Aquiles más gruesa pero más corta (Benjamin *et al.*, 2007).

Las fibras tendinosas del músculo gastrocnemio convergen a medida que van descendiendo, provocando a su vez el estrechamiento del tendón de Aquiles, y rotan alrededor de las fibras procedentes del músculo sóleo. Las fibras del músculo

gastrocnemio se fijan lateralmente a nivel de la inserción del calcáneo, mientras que las fibras procedentes del músculo sóleo se fijan medialmente (Benjamin *et al.*, 2007). No todas las fibras se insertan en el calcáneo, sino que una proporción variable de las fibras más superficiales del tendón de Aquiles pasan bajo el talón y se continúan con las fibras de la fascia plantar (Benjamin *et al.*, 2007).

Existen cambios substanciales en la forma del tendón de Aquiles entre su porción proximal y su porción distal. El tendón de Aquiles se vuelve más grueso a medida que se aproxima a su inserción ósea, igual que ocurre con muchos otros tendones del cuerpo (Benjamin *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1. Anatomía del tendón de Aquiles (especie humana).** <http://legal-anatomical.medicalillustration.com/generateexhibit.php?ID=26839>

El tendón de Aquiles se desliza con respecto al resto de estructuras que lo rodean gracias al paratendón, una envoltura de tejido conjuntivo compuesta, esencialmente, por fibras de colágeno de tipo I y III y fibrillas elásticas, que tienen su superficie interna tapizada por sinoviocitos que producen pequeñas cantidades de líquido sinovial. Probablemente, este paratendón no sea tan efectivo como una genuina vaina sinovial, aunque cumple su objetivo de facilitar el movimiento del tendón con respecto a los tejidos contiguos (Kannus, 2000). Es una estructura rica en vasos sanguíneos y nervios. Alrededor del tendón hallamos el epitendón, y su parte más externa se continúa con el paratendón, creando así el peritendón (Benjamin *et al.*, 2007).

El nervio sural pasa junto al paratendón del tendón de Aquiles, y atraviesa su borde lateral unos 10 centímetros por encima de su inserción (Benjamin *et al.*, 2007). El tendón de Aquiles, cerca de su inserción en el calcáneo, está rodeado 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).

El aporte vascular que recibe el tendón de Aquiles se produce a través de vasos sanguíneos que marchan por el paratendón, y que principalmente se derivan de la arteria tibial posterior. Las roturas del tendón de Aquiles tienen lugar entre 2 y 6 cm por encima de su inserción en el calcáneo, ya que esta porción media del tendón está relativamente poco vascularizada, aspecto que puede contribuir a un mayor número de roturas en esta área. La zona proximal del tendón recibe un aporte vascular suplementario a partir de los vientres musculares que continúan hacia el tendón a través del endotendón. La zona distal también se nutre de vasos sanguíneos a través de un plexo arterial periostal existente en la zona posterior del calcáneo. En condiciones normales, la entesis fibrocartilaginosa es avascular, de manera que los vasos sanguíneos no pueden pasar directamente desde el hueso hacia el tendón a nivel de la unión osteotendinosa (Benjamin *et al.*, 2007).

El tendón de Aquiles y su paratendón reciben un aporte nervioso sensorial nociceptivo y propioceptivo. Este aporte es facilitado por ramas sensoriales de los músculos que lo forman y por ramas de los nervios cutáneos contiguos, sobre todo del nervio sural. El paratendón está más inervado que el propio tendón y contiene los corpúsculos de Pacini, con un papel significativo en la propiocepción (Benjamin *et al.*, 2007), y los corpúsculos de Ruffini y los de Golgi, que funcionan como sensores de presión (Platt, 2005). La integridad del aporte nervioso desempeña una función primordial en el proceso de cicatrización tendinosa, según se ha puesto de manifiesto en investigaciones experimentales. En comparación con los tendones que no habían sido denervados, se comprobó que la denervación periférica del tendón de Aquiles en ratas empeoró las propiedades biomecánicas de los tendones en cicatrización, transcurridas dos semanas de la tenotomía (Aspenberg y Forslund, 2000).

Aproximadamente, el peso seco del tendón es de un 30% de su masa total, mientras que el resto es agua. El tendón de Aquiles, de igual manera que los otros tendones, está constituido esencialmente por fibras de colágeno de tipo I (sobre un 80% del peso seco del tendón). Además, encontramos también fibras de elastina (un 2 ó 3% del peso seco)

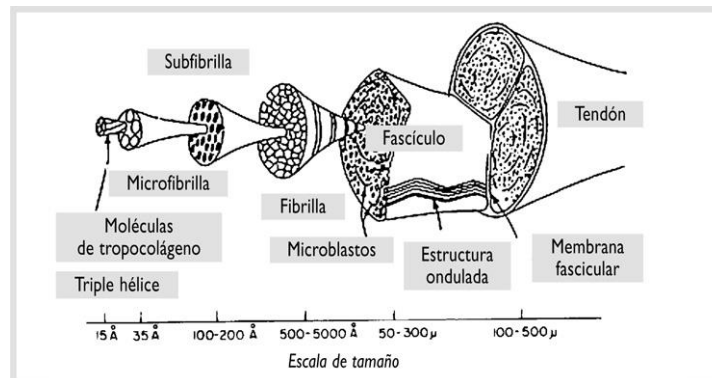
y proteoglicanos (aproximadamente un 1%) que componen parte de la matriz extracelular (Platt, 2005). La elastina favorece la flexibilidad del tendón, mientras que el colágeno, del que se han identificado más de 12 tipos, proporciona la fuerza tensil (O'Brien, 2005). Los colágenos de tipo I y III son formadores de fibras y componen la mayor parte del colágeno secretado al espacio extracelular. El colágeno tipo I constituye, aproximadamente, el 95% del colágeno existente en este tejido. El colágeno del cartílago articular es principalmente de tipo II y también forma fibras. Los colágenos tipo IV y V no son formadores de fibras, pero son los que integran en su mayoría las membranas basales (Kirkendall y Garret, 2004). En el tendón de Aquiles sano, el tipo de colágeno que predomina es el tipo I, mientras que en el tendón de Aquiles patológico existe una proporción substancial de colágeno de tipo III. Los fibroblastos que derivan de tendones de Aquiles que han sufrido una rotura generan tanto colágeno tipo I como tipo III cuando son cultivados. El colágeno tipo III tiene menor aguante a las fuerzas tensiles que el tipo I y eso provoca que el umbral de rotura del tendón disminuya (Maffulli, 1999).

Los tenocitos y tenoblastos secretan moléculas solubles de procolágeno al espacio extracelular, donde se convierten en tropocolágeno. A su vez, las moléculas de tropocolágeno se enlazan mediante puentes cruzados para formar moléculas insolubles de colágeno, que se agregan mediante uniones cruzadas covalentes para formar la típica estructura en triple hélice que hace fuerte a esta molécula (Kirkendall y Garret, 2004).

Siguiendo una ordenación jerárquica, las microfibrillas de colágeno de tipo I se organizan en fibrillas, que miden entre 50 y 90 nm, y posteriormente en fibras de colágeno, de unos 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas fibras de colágeno se unen para formar haces de fibras primarios (subfascículos) que, por su parte, se concentran para dar lugar a haces de fibras secundarios (fascículos) y haces de fibras terciarios, parecido a como se estructura un cable trenzado (Kannus, 2000) (Figura 2). Desde un punto de vista biomecánico, la estructura de colágeno más pequeña que puede ser testada es el fascículo (O'Brien, 2005), que está rodeada del endotendón. El endotendón es una fina membrana de tejido conectivo rico en elastina que permite la unión y cierto



movimiento de los haces de colágeno mientras penetra en el interior del tendón, facilitando a su vez, el aporte sanguíneo, linfático y nervioso (Kannus, 2000; O'Brien, 2005). En la capa más externa del tendón se sitúa el epitendón, una membrana fibrilar relativamente densa de colágeno. Por su cara interna, se une con el colágeno de los haces de fibras más externos y por su cara externa se continúa con el paratendón (Kannus, 2000).

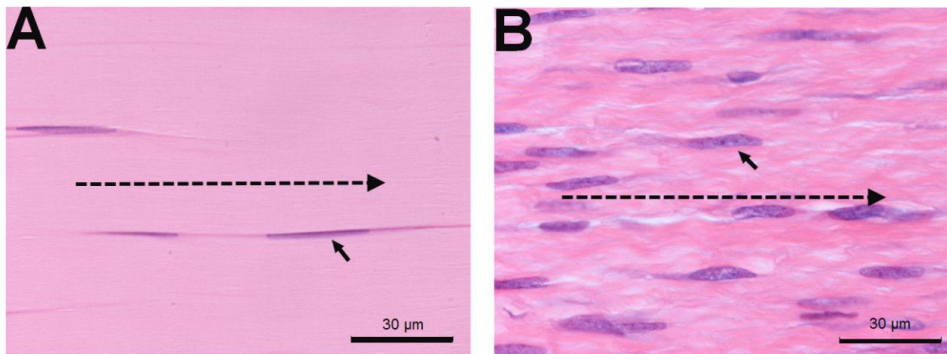


**Figura 2. Jerarquía estructural del tendón desde las moléculas de tropocolágeno a la presentación final (Kastelic et al., 1978).**

## Histología del tendón de Aquiles

Entre el 90 y 95% de los elementos celulares del tendón están constituidos por los tenocitos (un tipo especializado de fibroцитos) y los tenoblastos (un tipo especializado de fibroblastos), mientras que el restante 5 y 10% está formado por otras estirpes celulares, como los condrocitos, las células vasculares, los sinoviocitos y las células de músculo liso (Kannus, 2000; Doral *et al.*, 2010). En condiciones patológicas pueden aparecer otras estirpes celulares, como las células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas) (Kannus, 2000). El tendón de Aquiles normal goza de un patrón celular bien organizado con los tenocitos colocados y empaquetados entre los haces de colágeno y alineados a la perfección con respecto al eje longitudinal del tendón. Esta ordenación se debe a que tanto tenocitos como tenoblastos producen de manera uniforme y centrífuga la matriz extracelular, fibrilar y no fibrilar, y llega un momento en el que la célula se ve rodeada y compactada por dicha matriz extracelular (Maffulli, 1999) (Figura 3). Bajo microscopía óptica es posible apreciar la configuración

ondulada de las fibras de colágeno del tendón, como bandas regulares a lo largo de la superficie de la fibra de colágeno (Kannus, 2000).



**Figura 3. Cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina. Tendón de Aquiles normal con tenocitos (A) y en proceso de cicatrización con fibroblastos (B). Las líneas discontinuas de ambas imágenes indican la dirección del eje longitudinal del tendón de Aquiles (Fernández, 2012).**

Tanto en el tendón del animal neonato como en el tendón durante las primeras etapas del proceso de cicatrización existe una relación células/matriz extracelular muy alta. El principal componente celular son los tenoblastos, que varían en su morfología pero acostumbran a tener un núcleo de forma ovalada e hinchada. Es una estirpe celular caracterizada por poseer un gran retículo endoplásmico y un aparato de Golgi muy desarrollado, con un eje longitudinal que mide entre 70 y 20  $\mu\text{m}$ , y un eje transversal entre 8 y 20  $\mu\text{m}$ . Debido a estas particularidades en su forma, los tenoblastos son células con una alta tasa metabólica y los principales responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (Kannus, 2000). Tanto en el tendón adulto como en el tendón a medida que avanza su proceso de cicatrización, la relación células/matriz extracelular disminuye gradualmente. Los tenoblastos se van transformando en tenocitos (en algunas ocasiones se puede producir la transformación al contrario) adquiriendo un núcleo muy alargado y afinado. Estos tenocitos poseen un eje mayor de entre 30 y 80  $\mu\text{m}$  y un eje menor de entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ , y en comparación con el tenoblasto el ratio núcleo/citoplasma se incrementa drásticamente, disminuyendo el desarrollo del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico. El vasto núcleo del tenocito ocupa prácticamente toda la longitud de la célula y la cromatina nuclear se concentra en los márgenes de la membrana del núcleo. Los tenocitos son células metabólicamente

activas, pero a un nivel muy inferior al de los tenoblastos, según el análisis ultraestructural (Kannus, 2000).

Las células tendinosas sintetizan todos los componentes de la matriz extracelular: fibras de colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales. Al mismo tiempo, también se ocupan de los procesos de resorción e intercambio de los componentes de la matriz tendinosa. Con el fin de mantener una correcta homeostasis y estructura en el tendón, los tenocitos y tenoblastos actúan tanto anabólicamente como catabólicamente (Kannus, 2000). La tasa de intercambio de colágeno en un tendón adulto sano, incluyendo síntesis y catabolismo, es relativamente baja. Este hecho sumado al buen desarrollo de mecanismos anaerobios de producción de energía provoca que el tendón pueda soportar cargas y mantener la tensión por tiempo prolongado sin riesgo de isquemia y necrosis. Tanto la recuperación después de la actividad como los procesos de cicatrización son lentos debido a una baja tasa metabólica (Kannus, 2000).

### **Biomecánica del Tendón de Aquiles**

Las estructuras anatómicas que permiten el movimiento de las articulaciones son los tendones, situados entre los músculos y el hueso, que actúan como transmisores de la fuerza producida por la contracción muscular (Maffulli, 1999; Kannus, 2000). Concretamente, el de Aquiles es el tendón que está sujeto a las mayores fuerzas tensiles que se generan en el organismo humano, capaces de alcanzar más de 10 veces el peso corporal durante actividades como la carrera o el salto (O'Brien, 2005). Los tendones muestran un comportamiento viscoelástico en lugar de comportarse como conexiones rígidas (Maganaris *et al.*, 2007). La manera tradicional de estudiar las propiedades biomecánicas de los tendones se centraba en el estiramiento del propio tendón hasta su rotura, obteniendo así una curva de fuerza-elongación en la cual se pueden distinguir cuatro regiones (Maganaris *et al.*, 2007):

- La región I, o región de baja rigidez, se relaciona con fuerzas que provocan una disminución del grado de ondulamiento normal de la fibra de colágeno, pero que no producen daño en el tendón.
- La región II, o región lineal, en ella las cargas originan un estiramiento de las fibras que ya estaban alineadas, causando alguna rotura al final de esta fase.
- La región III, o región de alta rigidez, donde si se mantienen las fuerzas de elongación, de manera impredecible se producen roturas de fibras de colágeno a medida que aumenta la fuerza del estiramiento.
- La región IV de la curva de fuerza-elongación, donde al continuar con el estiramiento el tendón se rompe por completo (Maganaris *et al.*, 2007).

La forma de la curva fuerza-elongación obtenida varía entre diferentes especímenes, si bien es cierto que las cuatro regiones que acabamos de describir se presentan siempre que un tendón se somete a tensión hasta su rotura (Maganaris *et al.*, 2007).

La clave de la fuerza tensil de los tendones está en el colágeno, el colágeno tipo I representa entre el 70 y el 80% del peso en seco de un tendón normal (Wang *et al.*, 2012). Los haces de fibras de colágeno poseen una configuración ondulada cuando se encuentran en reposo. De este patrón de ondulamiento intratendinoso dependerá la plasticidad del tendón, que es lo que le permite actuar, hasta cierto punto, como un muelle que se estira cuando se somete a tensión, acumulando parte de esa energía y liberándola cuando recupera su forma inicial. Cuando la fibra de colágeno se somete a una fuerza de estiramiento superior al 2%, la configuración ondulada se pierde, y si el estiramiento ejercido no supera un 4%, el tendón recupera su apariencia ondulada. Con un estiramiento entre el 4 y 8%, las fibras de colágeno empiezan a romperse y las conexiones intermoleculares desaparecen, causando que las fibras no recobren su ondulamiento inicial de manera completa (Maffulli, 1999; Doral *et al.*, 2010). La viscoelasticidad del tendón procede de las proteínas del colágeno, del agua, y de la interacción entre el colágeno y los proteoglicanos (Wang *et al.*, 2012).

Las cargas mecánicas controladas tienen un efecto anabólico sobre el tendón lesionado estirándolo y mejorando la calidad de reparación, pero las cargas excesivas

resultan en lesiones tendinosas. Por otro lado, la inmovilización puede provocar cambios en el número, la forma y la orientación de las células tendinosas (Wang *et al.*, 2012).

## **Lesiones del tendón de Aquiles**

### *Epidemiología, etiología y patogenia*

En las últimas décadas, tanto el número como la incidencia de las lesiones tendinosas se han incrementado de manera exponencial. De hecho, las lesiones de tendón integran entre el 30% y 50% del total de lesiones relacionadas con el deporte, y el tendón de Aquiles es uno de los que se ve implicado de manera más habitual (Jarvinen *et al.*, 2005). Hasta los años 50, la incidencia de rotura del tendón de Aquiles era poco frecuente pero, desde entonces, se ha incrementado claramente en los países industrializados, especialmente durante las últimas dos décadas, debido al aumento de la actividad deportiva en nuestras sociedades sedentarias (Leppilahti y Orava, 1998; Schepisis *et al.*, 2002). La falta de preparación deportiva y de condición física contribuyen a la aparición de la mayor parte de roturas del tendón de Aquiles durante la práctica de actividades deportivas de recreo, en pacientes situados entre los 30 y 40 años (Leppilahti y Orava, 1998; Schepisis *et al.*, 2002).

El periodo de inactividad causado por la rotura del tendón de Aquiles oscila entre las 8 y las 10 semanas, produciendo costes derivados de la inactividad laboral del paciente, sumados a unos costes sanitarios importantes (Goel *et al.*, 2009). Este periodo podría incluso incrementarse por encima de los 6 meses si apareciesen complicaciones, como la re-rotura del tendón (Leppilahti y Orava, 1998).

La mayoría de los pacientes afectados por este tipo de lesión nunca antes habían presentado síntomas hasta el momento mismo de la rotura, de modo que la causa exacta de la rotura se desconoce (Jarvinen *et al.*, 2005). Aunque muchos de estos tendones rotos mostraban cambios degenerativos evidentes causados por un estilo de vida sedentario, tal como se ha revelado en estudios histopatológicos (Jarvinen *et al.*,

2005). Este proceso degenerativo aparece cuando el tendón se somete a breves periodos de intenso ejercicio físico (Jozsa *et al.*, 1989; Jarvinen *et al.*, 2005).

Entre las causas que predisponen a la rotura del tendón de Aquiles se han incluido mala alineación biomecánica del pie y el tobillo (hiperpronación, pie cavo, deformaciones en varus o valgus), factores relacionados con el ejercicio (sobrecarga, variaciones del plan de entrenamiento, calentamiento y/o estiramientos incorrectos), enfermedades sistémicas (obesidad, hipertensión, artritis reumatoide, gota), medicaciones (fluoroquinolonas, corticoides, anabolizantes y terapias hormonales), o incluso el uso de calzado inapropiado (Leppilahti y Orava, 1998; Jarvinen *et al.*, 2005; Weatherall *et al.*, 2010).

Existen dos teorías que sirven para explicar la patogénesis de la rotura del tendón de Aquiles, que son la teoría degenerativa y la teoría mecánica. La más aceptada por la comunidad científica es la teoría degenerativa, que defiende la existencia de un proceso degenerativo anterior en el tendón que hace que su umbral de rotura sea menor. Si a ello le sumamos macrotraumas o microtraumas repetidos, es cuando se produce la rotura del tendón (Yinger *et al.*, 2002; Weatherall *et al.*, 2010). Encontramos diversos factores que explican la degeneración propia del tendón, como una menor vascularización de la porción central del tendón de Aquiles (Chen *et al.*, 2009), cambios degenerativos ligados a la edad (Tuite *et al.*, 1997) o cambios degenerativos asociados al desuso (Yinger *et al.*, 2002). Tras el examen histopatológico de una biopsia tomada en el momento de la reparación quirúrgica, se han detectado marcados cambios degenerativos en el lugar de la rotura tendinosa (Jozsa y Kannus, 1997; Cetti *et al.*, 2003). También se ha señalado un aumento en la producción de colágeno de tipo III en los cultivos de tenocitos procedentes de tendones que han sufrido rotura, lo que produce una variación en la arquitectura normal del tendón y hace al tejido menos resistente a fuerzas de tensión (Waterston *et al.*, 1997). La segunda de las teorías, la mecánica, no es admitida como único factor en la patogenia de la rotura del tendón de Aquiles. Esta teoría plantea que la mala función del mecanismo inhibitorio normal de la unidad musculotendinosa, encargada de prevenir la lesión del tendón ante

contracciones musculares excesivas o incoordinadas, es la principal causa de rotura (Leppilahti y Orava, 1998).

La rotura del tendón puede ser causada por traumatismos directos o indirectos. Entre los traumatismos indirectos podemos destacar tres tipos:

- (I) empuje con la planta del pie apoyada mientras la rodilla se extiende, como en la salida de una carrera de velocidad.
- (II) dorsiflexión del tobillo imprevista, como cuando pisamos un hoyo.
- (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).

### *Diagnóstico y tratamiento*

Generalmente, la rotura del tendón de Aquiles se describe como un chasquido audible seguido de un dolor instantáneo y de la sensación de haber sido golpeado en la parte posterior de la pierna. El examen físico puede desvelar edema difuso y hematoma, e incluso se puede palpar una discontinuidad en el tendón (Leppilahti y Orava, 1998; Yinger *et al.*, 2002). Entre las pruebas que permiten diagnosticar la rotura encontramos el test de Thompson, que nos permite precisar la rotura completa del tendón (Maffulli, 1999; Longo *et al.*, 2009). Colocando al paciente tendido boca abajo con la rodilla flexionada a 90°, hallaremos la falta de plantaro-flexión cuando se aprieten los músculos gemelos (Yinger *et al.*, 2002; Weatherall *et al.*, 2010).

La ecografía es una técnica habitual para la identificación de discontinuidades en el tendón de Aquiles, ya que es relativamente barata, disponible en la mayoría de hospitales, no invasiva, rápida, repetible y que permite hacer un estudio dinámico del mismo (Oreilly y Massouh, 1993). Aunque la precisión del diagnóstico depende demasiado de la experiencia del ecografista, resultando difícil diferenciar entre roturas totales y parciales (Robinson, 2009). La ecografía también se utiliza en el seguimiento del proceso de cicatrización tras el tratamiento de la rotura del tendón (Maffulli *et al.*, 1990; Martinoli *et al.*, 1993; Rupp *et al.*, 1995).

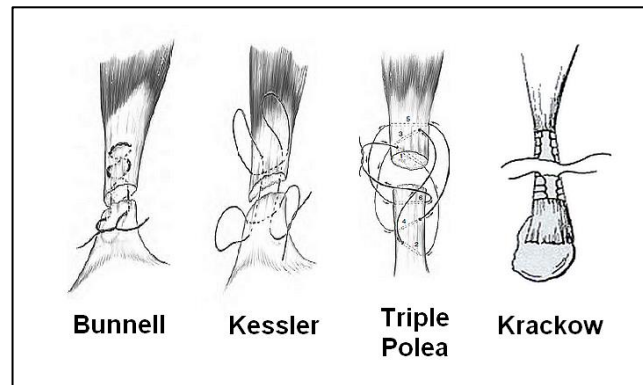
Otra técnica de gran utilidad es la resonancia magnética, utilizada para localizar roturas parciales o desgarros del tendón de Aquiles y para evaluar el estado del tendón tras la instauración de un tratamiento determinado (Yinger *et al.*, 2002).

La rotura del tendón de Aquiles puede ser tratada de manera conservadora o quirúrgica, aunque no hay acuerdo sobre cuál es el método preferible (Moller *et al.*, 2001; Kocher *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2005). El manejo quirúrgico presenta una menor tasa de re-rotura, no obstante, conlleva un riesgo potencial de complicaciones derivadas de la infección de la herida quirúrgica (Leppilahti y Orava, 1998; Weatherall *et al.*, 2010). Por contra, el manejo conservador elude el riesgo de infección quirúrgica, aunque comporta periodos de inmovilización más prolongados e incrementa significativamente la tasa de recidiva (Leppilahti y Orava, 1998; Kocher *et al.*, 2002; Weatherall *et al.*, 2010). Ambos tratamientos consiguen unos buenos resultados a largo plazo, siempre y cuando no se produzcan roturas postoperatorias (Moller *et al.*, 2001). La ventaja del tratamiento quirúrgico es que permite adelantar el programa de rehabilitación, lo que favorece la cicatrización tendinosa y limita la atrofia muscular (Leppilahti y Orava, 1998). Recientes investigaciones recomiendan el tratamiento quirúrgico acompañado de una rehabilitación funcional precoz como el modo más seguro y eficaz para manejar la rotura del tendón de Aquiles (Weatherall *et al.*, 2010). De manera que el tratamiento conservador queda restringido a pacientes sedentarios, con expectativas deportivas y funcionales limitadas, y a pacientes con enfermedades que podrían comprometer los procesos de cicatrización (diabetes y arterioesclerosis) (Yinger *et al.*, 2002).

Para el tratamiento quirúrgico de la rotura del tendón del Aquiles disponemos principalmente de técnicas de cirugía abierta y técnicas percutáneas, mínimamente invasivas (Movin *et al.*, 2005). Existen diferentes métodos dentro de la cirugía abierta, como las técnicas de reparación con refuerzos de fascia, las técnicas reconstructivas del tendón, o la reparación mediante la anastomosis término-terminal de los bordes tendinosos rotos, esta última elegida para casos que se diagnostican precozmente, y que persiguen recuperar la continuidad de los bordes del tendón roto, facilitando que cicatricen y que se recupere la función muscular (Movin *et al.*, 2005). Es interesante



reparar el paratendón para minimizar la formación de adherencias (Yinger *et al.*, 2002; Weatherall *et al.*, 2010). También encontramos diversos patrones de sutura para la reparación del tendón roto, que emplean material sintético no reabsorbible. Los más comunes son el Bunnell, Kessler, triple polea, o Krackow (Figura 4).



**Figura 4. Patrones más utilizados para la sutura término-terminal del tendón (Fossum, 2004).**

Para disminuir el riesgo de complicaciones relacionadas con la herida quirúrgica y reducir el tiempo de la intervención y de la hospitalización disponemos de técnicas de reparación mínimamente invasivas que permiten reconstruir el tendón a través de pequeñas incisiones cutáneas. Sin embargo, numerosos estudios presentan una mayor tasa de re-rotura con esta técnica debido a que la restauración es más débil que con la cirugía abierta (Yinger *et al.*, 2002; Movin *et al.*, 2005). Afortunadamente, en estudios recientes se han obtenido resultados esperanzadores en la técnica percutánea de reparación del tendón de Aquiles (Maffulli *et al.*, 2011).

En casos de re-rotura, en diagnósticos tardíos o cuando la integridad de la reparación es cuestionable, la reparación tendinosa con refuerzo permite reemplazar la fuerza de la anastomosis término-terminal. Gran parte de las técnicas de refuerzo utilizan colgajos de fascia de los músculos gastrocnemios, o bien del tendón plantar (Yinger *et al.*, 2002; Movin *et al.*, 2005). En algunos casos de rotura es necesario acudir a técnicas reconstructivas, utilizando 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 o injertos vasculares de tereftalato de polietileno) (Yinger *et al.*, 2002).

La instauración de un programa de rehabilitación precoz es, posiblemente, uno de los factores más importantes en la recuperación de la funcionalidad del tendón de Aquiles tras su rotura. Para obtener una recuperación más rápida y satisfactoria, es conveniente la movilización controlada de los tendones y el apoyo de peso progresivo durante las primeras fases de la cicatrización (Maffulli *et al.*, 2003; Suchak *et al.*, 2008).

Este tipo de lesión puede disminuir gravemente el rendimiento deportivo de los atletas afectados, si bien es cierto que existe una tendencia hacia la recuperación total de la actividad deportiva, con un nivel competitivo similar al que existía previamente a la rotura del tendón de Aquiles (Leppilahti y Orava, 1998; Parekh *et al.*, 2009).

### **Nuevas terapias para las lesiones del tendón de Aquiles**

Entre las nuevas terapias que han surgido recientemente para el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles, todavía en experimentación animal, encontramos el empleo de citoquinas y factores de crecimiento recombinantes (Sharma y Maffulli, 2005). Kurtz y colaboradores (1999) investigaron en un modelo experimental de cicatrización tendinosa en rata los efectos del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), y hallaron un mecanismo antiinflamatorio en los animales en los que se aplicó IGF-I, así como un menor déficit funcional y un tiempo de recuperación más corto (Kurtz *et al.*, 1999). Por su parte, Aspenberg y Forslund (1999), en un modelo de rotura del tendón de Aquiles en rata, implantaron esponjas de colágeno con factor de diferenciación del crecimiento 5 y 6, observando un incremento en la fuerza de los tendones tratados a las dos semanas (Aspenberg y Forslund, 1999). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un potente mitógeno endotelial que promueve la angiogénesis. En un modelo experimental de tenotomía del tendón de Aquiles en rata, se demostró que los animales tratados con VEGF en el momento de la reparación quirúrgica presentaban un considerable aumento de las características biomecánicas de los tendones transcurridas 2 semanas, aunque no así a las 4 semanas (Zhang *et al.*, 2003). Los tendones tratados mejoraron la fuerza mecánica con la inyección de proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMP), tanto en un modelo experimental de laceración del tendón de Aquiles en rata (Forslund *et al.*, 2003)

como en conejo (Forslund y Aspenberg, 2003). Por contra, este mismo tratamiento con CDMP en un animal mayor como la oveja no reveló un efecto beneficioso importante (Virchenko *et al.*, 2008). En un estudio experimental reciente en tendón de Aquiles de oveja donde se aplicó PRGF, se observaron mejorías tanto en la orientación de los núcleos de los fibroblastos como en la organización de las fibras de colágeno (Fernández *et al.*, 2013). Kashiwagi y colaboradores (2004) demostraron sobre un modelo experimental de tenotomía del tendón de Aquiles en rata que la administración local de factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) producía un aumento de procolágeno tipo I y III, y una mayor resistencia biomecánica de los tendones utilizados (Kashiwagi *et al.*, 2004).

Otros estudios en animales de experimentación, centrados en el uso de la terapia génica, han demostrado la posibilidad de modificar el proceso de cicatrización del tendón (Sharma y Maffulli, 2005). Estas terapias consisten en la modificación genética de una determinada población celular con el fin de promover la síntesis de una o varias proteínas por parte de estas células. Generalmente, el material genético que se desea incorporar al genoma de esas células es transportado a través de vectores virales o liposomas. Se han obtenido resultados prometedores en estudios más recientes en un modelo animal de rotura del tendón en los que se ha empleado la terapia génica junto con proteínas morfogénicas óseas (BMP) (Bolt *et al.*, 2007), y TGF- $\beta$  y VEGF (Hou *et al.*, 2009a; Hou *et al.*, 2009b).

El proceso de cicatrización tendinosa también se ha visto mejorado con el empleo de células mesenquimales derivadas de médula ósea. Young y colaboradores (1998), examinaron en un modelo experimental de defecto tendinoso en conejo el efecto de células mesenquimales derivadas de médula ósea transportadas en implantes de colágeno. Encontraron una notable mejoría en las cualidades mecánicas y estructurales de los tendones tratados, con unos haces de colágeno de mayor área de corte transversal y mejor alineados (Young *et al.*, 1998). Siguiendo este camino, otros autores también han encontrado una mejoría en los parámetros biomecánicos en un defecto en el tendón rotuliano de conejo gracias al empleo de implantes de colágeno sembrados con células mesenquimales derivadas de médula ósea (Awad *et al.*, 1999). La

ingeniería tisular es un campo emergente y asombroso, a pesar de las dificultades existentes en el uso de este tipo de terapias en patologías tendinosas como la rotura del tendón de Aquiles (Sharma y Maffulli, 2005; Juncosa-Melvin *et al.*, 2006).

Un tratamiento diferente que puede favorecer la cicatrización tendinosa a través de la liberación de ciertos factores de crecimiento es el empleo de fotoestimulación de baja energía a determinadas longitudes de onda. Reddy y colaboradores (1998) hallaron que la concentración de colágeno aumentó un 26% tras el tratamiento diario con láser de helio-neón en un modelo experimental de rotura tendinosa en conejos (Reddy *et al.*, 1998).

En diferentes investigaciones se ha demostrado que el uso de ondas de choque extracorpóreas mejora el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles, tanto en la experimentación sobre un modelo de tendón de conejo (Wang *et al.*, 2003) como sobre un modelo de tendón de rata (Orhan *et al.*, 2004). Del mismo modo, en varios estudios se ha demostrado que el empleo de la terapia de ultrasonidos ejerce efectos positivos en el proceso de cicatrización tendinosa y en las propiedades biomecánicas, en un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en ratas (Ng *et al.*, 2003; Yeung *et al.*, 2006).

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una de las terapias emergentes para el tratamiento de lesiones musculotendinosas sobre la que más se ha escrito en los últimos años. Hoy por hoy, encontramos divergencia de opiniones en cuanto a la utilidad clínica de este producto para el manejo de lesiones tanto tendinosas como de otra naturaleza y, de hecho, aún quedan muchos interrogantes por resolver (Engebretsen *et al.*, 2010; Andía *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2011).

En la actualidad, se están obteniendo resultados prometedores con estas nuevas terapias, y en combinación con las técnicas quirúrgicas clásicas y los nuevos programas de rehabilitación, mejoran sustancialmente las posibilidades de recuperación tanto de los atletas como del resto de la población, especialmente en lo relativo a lograr un nivel de actividad física parecido al que tenían antes de la rotura del tendón de Aquiles.

## Proceso cicatricial del tendón

Para tratar enfermedades vinculadas al tendón es esencial entender correctamente el mecanismo de cicatrización tendinosa. El daño en el tendón inicia una serie de señales moleculares que estimulan a los tenocitos para la producción de colágeno y otros componentes extracelulares, con el objetivo de reparar el tendón roto. Durante las fases de cicatrización, el tejido cicatricial que se produce debe ser sometido a una serie de estímulos mecánicos, que resultan fundamentales para conseguir un tejido con una correcta funcionalidad, a pesar de que el tendón normal suele ser en términos biomecánicos de mayor calidad que el tendón reparado. Durante el periodo de reparación, la falta de movilidad del tendón lleva a la formación de adherencias, que impiden un correcto deslizamiento del tendón sobre el paratendón, lo que produce un evidente efecto negativo sobre el resultado funcional final. No obstante, una movilización excesiva e inadecuada puede favorecer la rotura del tendón (James *et al.*, 2008). Para desarrollar estrategias de cicatrización satisfactorias o bien para acelerar o mejorar el proceso de regeneración tisular es imprescindible un conocimiento adecuado del proceso normal de cicatrización.

### *Etapas en la cicatrización tendinosa*

El inicio de la cicatrización comienza con una respuesta inflamatoria producida tras un daño en el tendón. El proceso de cicatrización sucede a lo largo de diferentes fases que se solapan entre sí y es muy variable en función del tipo y lugar del tendón afectado, según las características del daño ocasionado y según el manejo terapéutico. Las fases de la cicatrización tendinosa son: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación (Hope y Saxby, 2007).

### **Periodo inflamatorio**

Tras el daño tendinoso, tiene lugar de manera inminente la fase inflamatoria, con una duración de entre 4 y 7 días (Platt, 2005). En primer lugar, los bordes tendinosos rotos se retraen y el defecto se rellena con un hematoma. Mediante la agregación plaquetaria se produce la liberación de diversos mediadores proinflamatorios y factores de

crecimiento, lo que produce el reclutamiento leucocitario. Las primeras células que llegan al lugar de la lesión son los neutrófilos, donde liberan citoquinas que ejecutan una función quimiotáctica para los macrófagos. Tras las primeras 24 horas, la concentración de neutrófilos se reduce y, posteriormente, los macrófagos se convierten, hasta el final de la fase inflamatoria, en la estirpe leucocitaria predominante. Los macrófagos activados pueden liberar factores de crecimiento que estimulen la proliferación de los fibroblastos y la formación de matriz extracelular. La actividad fagocítica de los macrófagos elimina los restos de tejido necrótico y rompe el hematoma inicial (Hope y Saxby, 2007). Los fibroblastos se ocupan de rellenar el defecto entre los bordes del tendón durante la primera semana y, a partir del quinto día, se inicia la síntesis de colágeno (Platt, 2005). Los procesos de angiogénesis y la posterior formación de una red de capilares sanguíneos se emprenden por la liberación de algunos factores de crecimiento. Para una correcta cicatrización tendinosa, resulta elemental la restitución de una red capilar que garantice un transporte conveniente de oxígeno en el lugar de la lesión, ya que el proceso de síntesis de colágeno es altamente oxígeno-dependiente (Hope y Saxby, 2007).

### **Periodo proliferativo**

Esta segunda fase de la cicatrización se solapa con la fase inflamatoria inicial y se extiende alrededor de 3 ó 4 semanas tras la reparación (Platt, 2005). Transcurridos tres días del inicio 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 la sutura.

La síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la matriz extracelular se incrementa de manera significativa en el lugar de la lesión debido a la proliferación y reclutamiento de fibroblastos. En primer lugar, estos componentes se organizan de manera aleatoria, con predominio del colágeno de tipo III (James *et al.*, 2008). Las evidencias de neovascularización en forma de canales vasculares no se observan hasta los siete días de la reparación del tendón. La principal respuesta proliferativa tiene lugar a nivel del epitendón y las zonas más superficiales del lugar de reparación, a pesar de

que también se observa un aumento moderado de la celularidad del endotendón (Hope y Saxby, 2007).

Aproximadamente, a los 10 días de la reparación quirúrgica tiene lugar el pico máximo en la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas no-colágenas de la matriz extracelular. Procesos catabólicos básicos de resorción de los haces de colágeno, sumados a una reordenación de los fibroblastos a lo largo del eje longitudinal del tendón, aparecen entre la segunda y tercera semana tras la cirugía, lo que promueve una correcta orientación de los haces de colágeno elaborados por estas células (Hope y Saxby, 2007). Durante esta fase de degradación de colágeno, si la reparación tendinosa no es lo suficientemente fuerte como para soportar la movilización precoz del tendón, existe un riesgo importante de re-rotura. Durante estas primeras semanas, el incremento significativo en las propiedades biomecánicas del tendón coincide con el incremento en la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas. Transcurridas 3 ó 4 semanas tras la reparación tendinosa tiene lugar la mayor proliferación celular y vascular en el área lesionada (Hope y Saxby, 2007).

### **Periodo de remodelación**

Una correcta regeneración del tejido tendinoso cicatrizado tiene una importancia capital para la adecuada recuperación del tendón, y el resultado obtenido debe de ser un tejido cicatricial totalmente funcional, con unas propiedades biomecánicas que se parezcan lo más posible al tejido original. La fase de remodelación tiene su inicio en el momento en el que la fase proliferativa alcanza su pico máximo de celularidad (en torno a las 3 ó 4 semanas), aunque puede comenzar tan sólo 1 ó 2 semanas tras la lesión (Hope y Saxby, 2007). En esta fase, la celularidad del tejido de reparación sufre un descenso gradual, y las fibrillas de colágeno se alinean y organizan de manera progresiva en haces (Hope y Saxby, 2007; James *et al.*, 2008). Las colagenasas son las responsables de la reabsorción de las fibrillas de colágeno, principalmente las de tipo III, y éstas, son reemplazadas por fibras de colágeno de tipo I, con mayor fuerza tensil y más puentes cruzados, y se sitúan en paralelo con el eje longitudinal del tendón (Hope y Saxby, 2007; James *et al.*, 2008). A lo largo de esta fase, tiene lugar el cambio desde un

tejido de granulación celular a un tejido principalmente fibroso. Entre las fibras de colágeno que ellos mismos producen, quedan interpuestos los fibroblastos, que poseen un gran núcleo ovalado que se va elongando de manera progresiva, hasta adoptar una apariencia similar al de los tenocitos maduros (Hope y Saxby, 2007).

La fase de maduración es la fase final de la remodelación, en la que el tejido cicatricial comienza a adquirir un aspecto histológico más cercano al del tendón sano. Tanto la celularidad, como la vascularización y la actividad metabólica de los tenocitos sufren una mengua gradual; por contra, el grosor de los haces de colágeno aumenta. Se trata de una fase larga que puede durar incluso años, y a pesar de ello, hay que tener en cuenta que difícilmente las propiedades biomecánicas de tendón reparado alcanzarán los valores existentes anteriores a la lesión (Hope y Saxby, 2007).

### **Cicatrización tendinosa intrínseca y extrínseca. Mediación en la cicatrización**

El mecanismo de cicatrización tendinosa se puede explicar mediante dos modelos: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Sharma y Maffulli, 2006; Hope y Saxby, 2007). Esta última, la vía extrínseca, defiende que los fibroblastos y las células inflamatorias inundan el lugar de la lesión en el tendón procedentes de tejidos periféricos. Por el contrario, la vía intrínseca sostiene que la cicatrización sucede gracias a la migración y proliferación de células del propio endotendón y epitendón (James *et al.*, 2008).

Por lo que respecta al proceso de cicatrización tendinosa, antes de los años 70 existía la concepción de que el callo cicatricial se originaba exclusivamente a partir de la vaina sinovial, excluyendo a los bordes tendinosos seccionados del proceso (Hope y Saxby, 2007). De este modo, con la migración de vasos sanguíneos y fibroblastos desde la vaina sinovial hacia el tendón, parecía inevitable la formación de adherencias. Sobre el controvertido papel que jugaba el epitendón en la cicatrización del tendón, se defendía que el crecimiento fibroblástico que se producía desde la vaina sinovial hacia el tendón lesionado originaba todo el proceso de cicatrización tendinosa (Potenza, 1962). Pero a mediados de los 80 se confirmó que existía un mecanismo intrínseco de cicatrización del tendón, además de la vía extrínseca (Gelberman *et al.*, 1986). En un estudio experimental se observó que el tendón podía experimentar procesos de cicatrización *in*



*vitro* una vez aislado de su vaina sinovial (Manske *et al.*, 1985). Lundborg y colaboradores (1985) aislaron el tendón con una membrana semipermeable con un tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  (para así evitar el paso de células) y lo trasplantaron a un bolsillo subcutáneo, con el fin de estudiar si la cicatrización tendinosa podía ocurrir con independencia de la migración de fibroblastos desde tejidos adyacentes. Transcurridas seis semanas, advirtieron una proliferación de células desde el propio epitendón del tendón y la producción de colágeno, sin la existencia de una infiltración extrínseca de fibroblastos (Lundborg *et al.*, 1985). Los resultados de estas investigaciones sugirieron que el tendón también podía experimentar procesos de cicatrización primaria, ya que gozaba de capacidad intrínseca de cicatrización (Hope y Saxby, 2007).

La reparación del tendón es una combinación entre cicatrización intrínseca y extrínseca. La localización y extensión de la lesión, el grado de trauma quirúrgico y la movilización durante el periodo postoperatorio pueden afectar a la síntesis de colágeno, favoreciendo así una cicatrización más extrínseca o más intrínseca (Hope y Saxby, 2007). El modelo de cicatrización extrínseco es el responsable de la formación de las adherencias que suceden inicialmente, de la desorganización de la matriz de colágeno y de la alta celularidad del lugar de la lesión y, a continuación, se activa el modelo intrínseco, que es responsable de la reorganización de los haces de colágeno y del mantenimiento de la continuidad del patrón fibrilar (James *et al.*, 2008).

Diferentes tipos de mediadores físicos y químicos toman parte en el complejo proceso de cicatrización tendinosa. El inicio de la fase inflamatoria viene marcado por el daño mecánico en el tendón, que provoca la activación de respuestas tanto celulares como vasculares. La respuesta vascular empieza con una fuerte vasoconstricción, y pasará a una situación de vasodilatación que se mantendrá durante toda la fase inflamatoria gracias a los mediadores químicos (histamina, prostaglandinas) y a la influencia adicional del sistema nervioso autónomo (Hope y Saxby, 2007).

En lo referente a la respuesta de tipo celular, está controlada por una serie de mediadores que pueden inducir quimiotaxis y otros que pueden regular la proliferación celular, o bien por factores que modulan la síntesis y degradación proteica. Dentro de los mediadores, debemos señalar cinco factores de crecimiento que aparecen de

manera significativa 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  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y el factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF) (Hope y Saxby, 2007). Durante las primeras etapas de la fase inflamatoria, se expresa sobre todo IGF-I, promoviendo la proliferación y migración de los fibroblastos del tendón e incrementando la síntesis de colágeno y proteoglicanos (Wang, 2006). Es posible detectar PDGF en el lugar de la lesión transcurrido poco tiempo del daño tendinoso, provocando un estímulo en la síntesis de proteínas, y favoreciendo la producción de otros factores de crecimiento (IGF-I) por parte de las células implicadas en el proceso de reparación (Molloy *et al.*, 2003). En prácticamente todas las fases del proceso de cicatrización tendinoso, el TGF- $\beta$  se muestra como un factor de crecimiento activo que desarrolla una función importante en la reparación del tendón con efectos muy diversos, desde la estimulación de la migración de células extrínsecas hasta la deposición de matriz extracelular (Molloy *et al.*, 2003). La sobreexpresión de este factor de crecimiento causa una excesiva fibrosis cicatricial (Molloy *et al.*, 2003). El VEGF es un factor de crecimiento clave durante los procesos de angiogénesis, y se muestra más activo durante las fases de remodelación y maduración cicatricial estimulando la proliferación de células endoteliales e incrementando la permeabilidad capilar (Molloy *et al.*, 2003). Gracias a que la hipoxia incrementa los niveles de VEGF, la baja tensión tisular de oxígeno favorece los procesos de angiogénesis (Hope y Saxby, 2007).

Las enzimas denominadas metaloproteasas (MMPs) también desempeñan una función clave en los procesos de remodelación de la matriz extracelular del tendón, modificando sus niveles de concentración a lo largo del proceso. La acción de estas MMPs es inhibida por un grupo de moléculas conocidas como inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs), de modo que la remodelación de la cicatriz tendinosa es regulada por un balance entre las acciones de las MMPs y la actividad de las TIMPs. Un desequilibrio en esta relación puede causar alteraciones en el tejido cicatricial final (Hope y Saxby, 2007).

## Plasma Rico en Factores de Crecimiento

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un producto biológico autólogo, una fracción plasmática de la sangre del paciente con una concentración de plaquetas mayor que la existente en sangre circulante, obtenida tras un proceso de centrifugación. Las plaquetas incluidas en esa fracción de plasma pueden ser activadas de manera artificial para liberar el contenido del interior de sus gránulos, entre el que encontramos diversos factores de crecimiento (Marx *et al.*, 1998; Anitua, 1999).

La nomenclatura y la definición del PRP ha despertado un fuerte debate en los últimos años (Marx, 2001; Everts *et al.*, 2008; Anitua *et al.*, 2009). Se trata de un término vago y poco preciso para Anitua y sus colaboradores (2009), ya que dentro de este término se engloban un gran número de compuestos sanguíneos autólogos que

difieren en el protocolo de procesado y preparado y, por tanto, en sus particularidades cuantitativas y cualitativas. Por ello, es primordial definir con 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.*, 2009).

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

### **Las plaquetas en el proceso de cicatrización**

Existen multitud de mecanismos celulares y moleculares que intervienen en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos cuando éstos son dañados. En estas etapas, entran en juego diferentes tipologías celulares que producen y/o son sensibles a determinadas moléculas (citoquinas, factores de crecimiento y eicosanoides, entre otras), y cuyo último objetivo es la cicatrización y la rehabilitación del tejido dañado. Dentro del conglomerado celular, debemos destacar la trascendencia de las plaquetas en el proceso de cicatrización de los tejidos (Savage *et al.*, 1998; George, 2000).

A pesar de que son los elementos formes de menor tamaño que hay en la sangre, las plaquetas desempeñan una función clave en la hemostasia, proceso ampliamente estudiado (Savage *et al.*, 1998; George, 2000). Además de sus cualidades hemostáticas, también poseen una importante actividad pro-inflamatoria, reguladora y regenerativa, debido a su interacción 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 e Italiano, 2003; Anitua *et al.*, 2004).

Los megacariocitos, que conforman entre el 0,1 y el 0,5% de las células nucleadas de la médula ósea, son las células precursoras de las plaquetas. Los megacariocitos, ubicados en los senos capilares de la médula, emiten unas prolongaciones citoplasmáticas, denominadas proplaquetas, que están en contacto con la sangre circulante y que al escindirse del megacariocito son liberadas al torrente circulatorio, formando las plaquetas (Leven, 2000; Hartwig e Italiano, 2003).

Evidentemente, la proliferación de los megacariocitos es un paso imprescindible para el origen de las plaquetas. Algunas citoquinas (IL-3, IL-6 y IL-11) o la trombopoyetina alientan esta fase proliferativa. El citoplasma de los megacariocitos maduros experimenta una expansión constante al llenarse con proteínas del citoesqueleto ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, actina y polímeros de miosina, entre otras), gránulos específicos y contenido granular. El mecanismo fisiológico a través del cual se producen las plaquetas no está aún del todo esclarecido, aunque se conoce que su origen está en las elongaciones citoplasmáticas de los megacariocitos (Leven, 2000; Hartwig e Italiano, 2003).

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

Las mismas proteínas citoplasmáticas que existen en los megacariocitos componen el citoplasma plaquetario (Leven, 2000; Hartwig e Italiano, 2003). Los diferentes gránulos plaquetarios y mitocondrias son sostenidos por una estructura de filamentos de actina. Para el proceso de activación y secreción del contenido de los gránulos plaquetarios al espacio extracelular, es de vital importancia un correcto ensamblaje del citoesqueleto plaquetario (Gentry, 2000; Tablin, 2000; Hartwig e Italiano, 2003).

## **Gránulos plaquetarios**

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

### **Gránulos alfa**

Los gránulos alfa ( $\alpha$ ) son el grupo más heterogéneo en términos de estructura y composición de los gránulos plaquetarios. Tienen una forma esférica/ovoide, con unos 200 – 400 nm de diámetro (Harrison y Cramer, 1993) y en su interior podemos hallar una extensa variedad de sustancias que cumplen con importantes funciones en la fisiología normal del organismo (Tabla 1). Algunas de ellas son “específicas” de las plaquetas, merced a que sólo son sintetizadas en los megacariocitos, mientras que otras son consideradas “selectivas” de las plaquetas, ya que también aparecen en otros tipos celulares (Hartwig e Italiano, 2003; Reed, 2007).

Los gránulos  $\alpha$  liberan sustancias que se agrupan según su funcionalidad. Así, existen proteínas adhesivas con un papel crucial en la fase de formación y crecimiento del trombo durante la hemostasia, como el fibrinógeno, la fibronectina, la vitronectina, la trombospondina-1 y el factor de von Willebrand. Las plaquetas son una fuente importante de citoquinas, unas sustancias que ejercen un marcado efecto quimiotáctico sobre los leucocitos y que activan otras plaquetas y entre las que cabe destacar RANTES, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , el oncogen- $\alpha$  regulador de crecimiento, ENA-8, MCP-3, factor plaquetario-4 (PF-4) y tromboglobulina- $\beta$ . El factor plaquetario-4, aparte de atraer neutrófilos y fibroblastos, es un regulador negativo de la angiogénesis e impide la proliferación de las células endoteliales. Los gránulos  $\alpha$  abarcan determinados factores de la coagulación (Factor V/Va, Factor de von Willebrand, Factor XI) y otras sustancias

participantes en la producción de trombina y en la cascada de la coagulación. Del mismo modo, encontramos sustancias que ejercen una acción fibrinolítica, como el plasminógeno, el inhibidor-activador del plasminógeno tipo I (PAII), la macroglobulina  $\alpha_2$ , la osteonectina, la glicoproteína rica en histidina y la antiplasmina  $\alpha_2$ . Sustancias con acción proteolítica, como la metaloproteasa-4 (MP-4), han sido halladas en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas; al mismo tiempo, han sido identificadas sustancias con acción antiproteasa, como el inhibidor tisular de metaloproteasa-4 (TIMP-4), el inhibidor plaquetario del factor IX, la antitripsina- $\alpha_1$ , el inhibidor de la colagenasa derivado de plaquetas (PDCI) y la nexin-proteasa-2. Tanto las sustancias fibrinolíticas como aquellas con una acción antiproteolítica desempeñan una función crucial 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).

En el interior de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, también podemos localizar otras sustancias a las que se les han asignado propiedades bactericidas y fungicidas, como el condroitín 4-sulfato, la albúmina, las inmunoglobulinas (IgG) y las trombocidinas (Anitua *et al.*, 2004).

Los factores de crecimiento son seguramente uno de los grupos de mayor interés biológico que podemos encontrar dentro de los gránulos  $\alpha$ , ya que son trascendentales en los procesos de reparación-regeneración tisular. Entre ellos, hallamos el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), con sus diferentes isoformas (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), el factor de crecimiento transformante  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (TGF- $\beta_1$  y TGF- $\beta_2$ ), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial (EGF), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y el 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.**

<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	<b>PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), TGF- B 1, TGF- B 2, VEGF, BFGF, EGF, IGF-I, HGF, NGF</b>
<b>PROTEÍNAS ADHESIVAS</b>	<b>FIBRINÓGENO, FIBRONECTINA, VITRONECTINA, TROMBOSPONDINA-1, FACTOR DE VON WILLEBRAND</b>
<b>CITOQUINAS</b>	<b>RANTES, IL-8, MIP-1A, GROWTH-REGULATED ONCOGENE-A, ENA-8, MCP-3 PF-4, TROMBOGLOBULINA- B</b>
<b>FACTORES DE LA COAGULACIÓN</b>	<b>FACTOR V/VA, FACTOR DE VON WILLEBRAND, FACTOR XI, MULTIMERINA</b>
<b>SUSTANCIAS FIBRINOLÍTICAS</b>	<b>PLASMINÓGENO, PAI-I, MACROGLOBULINA-A2, OSTEONECTINA, GLICOPROTEÍNA RICA EN HISTIDINA, ANTIPLASMINA-A2</b>
<b>PROTEASAS Y ANTIPROTEASAS</b>	<b>MP-4, TIMP-4, INHIBIDOR PLAQUETARIO DEL FACTOR IX, ANTITRIPSINA-A1, PDCI, NEXIN-PROTEASA-2</b>
<b>OTRAS SUSTANCIAS</b>	<b>CONDROITÍN-4-SULFATO, ALBÚMINA, IGG, TROMBOCIDINAS</b>

### Gránulos densos

Los gránulos densos son el grupo más pequeño dentro de los gránulos plaquetarios, y deben su nombre al aspecto electrodenso que muestran bajo microscopía electrónica. Al inicio, estos gránulos se forman en los megacariocitos, y son como sacos vacíos que se van llenando con serotonina y nucleótidos de adenina en el transcurso del proceso de maduración (Youssefian y Cramer, 2000). Están constituidos por pequeñas moléculas no proteicas, entre las que destacan las altas concentraciones de nucleótidos de adenina (ADP/ATP). En su interior, los gránulos densos albergan un importante depósito de serotonina, además de contener cationes bivalentes, entre ellos el calcio. Una de las características de este tipo de gránulos plaquetarios es que concentran en su interior determinadas sustancias de carácter básico, como por ejemplo monoaminas (histamina,



catecolaminas), debido al pH ácido existente en su interior (6.1), mantenido gracias a la acción de una bomba de protones ATP-asa (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

La migración plaquetaria se ve favorecida por el ADP, mientras que el ATP interviene en la respuesta de las plaquetas al colágeno (Anitua *et al.*, 2004). El calcio es un cofactor esencial para la agregación plaquetaria y la formación de fibrina, y goza de gran importancia en la cicatrización de heridas (Lansdown, 2002). La serotonina posee receptores en las células del endotelio vascular y su liberación provoca un aumento en la permeabilidad capilar (de Clerck *et al.*, 1984). La histamina ejerce efecto fundamental en la respuesta inflamatoria (Mannaioni *et al.*, 1997).

### **Gránulos lisosomales**

El tercer grupo dentro de los gránulos plaquetarios son los lisosomas, con un tamaño intermedio entre los gránulos densos y los gránulos alfa, miden entre 175-250 nm de diámetro. En su interior encontramos glucosidasas, proteasas, hidrolasas y proteínas catiónicas con actividad bactericida, y también han sido halladas otras enzimas hidrolíticas como la colagenasa y elastasa (Rendu y Brohard-Bohn, 2001).

### ***Respuesta plaquetaria tras un daño tisular***

Tras el desgarro de un vaso sanguíneo, se sucede una interacción energética de diferentes tipos celulares, en la que las plaquetas padecen una serie de cambios en su morfología y en su estructura interna que provocan la formación del tapón hemostático primario y la retracción del coágulo (Gentry, 2000; Tablin, 2000). Ciertos receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, como las integrinas, se unen al tejido subendotelial expuesto y regulan la capacidad de comunicación intercelular en el transcurso de la formación del tapón hemostático, del proceso inflamatorio y de la fase de reparación celular. De este modo, alrededor del defecto en la pared vascular se forma una agregación plaquetaria. El fibrinógeno y el factor de von Willebrand lanzados por las propias plaquetas resultan determinantes para mantener unido el tapón plaquetario (George, 2000; Anitua *et al.*, 2004).

Las plaquetas son el origen de sustancias que ejercen funciones de vital importancia en los procesos de reparación-regeneración tisular, influyendo de un modo determinante sobre el crecimiento, la morfogénesis y la diferenciación celular en los procesos de inflamación y angiogénesis. Debido a su gran capacidad para liberar estas sustancias, las plaquetas constituyen una fuente natural de factores de crecimiento y citoquinas que pueden emplearse, desde el punto de vista terapéutico, para acelerar los procesos de cicatrización tisular (Anitua *et al.*, 2004).

El proceso de activación plaquetaria es este conjunto de sucesos que conduce a la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios. Las plaquetas son células muy reactivas que liberan las sustancias almacenadas en sus gránulos, mediante un proceso de exocitosis, como respuesta ante diversos estímulos. Para que esto suceda, un determinado agonista (trombina, ADP, colágeno, tromboxano A<sub>2</sub>) debe interactuar con ciertos receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, lo que dará inicio a la señal de transducción que pondrá en marcha el proceso de activación. Seguidamente, el calcio acumulado en el interior del retículo endoplásmico rápidamente se libera al citoplasma, ocasionando el movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática. Al contactar la membrana plasmática con la membrana del gránulo, se produce la fusión de las mismas, tras la cual se origina el vaciado del contenido de los gránulos al espacio extracelular. Este proceso es conocido como reacción de liberación, y precisa energía servida por el glucógeno y por las mitocondrias existentes en el citoplasma plaquetario (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Reed, 2007).

Cada tipo de gránulos plaquetarios goza de una cinética de liberación diferente. Primero, tiene lugar la liberación del contenido de los gránulos alfa; a continuación, los gránulos densos; por último, se liberan los productos proteolíticos del interior de los gránulos lisosomales (Tablin, 2000).

Mediante un proceso dependiente del Ca<sup>2+</sup>, las plaquetas activadas son capaces de convertir la protrombina en trombina (Anitua *et al.*, 2004), un potente agente mitógeno encargado de impulsar determinadas respuestas celulares, además de desempeñar una función significativa en el mecanismo hemostático (Bachli *et al.*, 2003).

Las plaquetas son el origen de los eicosanoides, sintetizados a raíz del ácido araquidónico liberado de su membrana fosfolipídica y entre los que destaca el tromboxano A<sub>2</sub>, implicado en los procesos de reparación vascular. La esfingosina-1-fosfato es otro metabolito de interés, liberado de las plaquetas activadas durante la formación del coágulo, y que destaca por sus cualidades mitogénicas. De las plaquetas también deriva el factor de activación plaquetario (PAF), otro lípido bioactivo con una importante función en la quimiotaxis leucocitaria, en la activación de las células endoteliales y en la adherencia plaquetaria (Weyrich *et al.*, 2002; Anitua *et al.*, 2004).

Para una correcta reparación-regeneración tisular es necesaria la liberación de las sustancias almacenadas dentro de los gránulos, los metabolitos activos derivados de la activación plaquetaria y la trombina generada.

### **Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son sustancias polipeptídicas solubles y difusibles que ejercen una función reguladora de la proliferación, diferenciación y metabolismo celular a través de su interacción con receptores específicos de la membrana de las células diana. De este modo, tienen lugar una serie de fenómenos intracelulares que influyen en la expresión de genes que codifican funciones metabólicas, como la división celular o la síntesis de determinadas proteínas. A ello hemos de sumar que los factores de crecimiento pueden causar la migración de otras células hasta el lugar donde se encuentran, ejerciendo un potente estímulo quimiotáctico para células como los leucocitos y fibroblastos, esenciales en los procesos de reparación-regeneración tisular (Canalis, 1992; Kiritsy y Lynch, 1993; Lind, 1996).

Existe una amplia variedad de tipos celulares capaces de sintetizar los factores de crecimiento, que son capaces de ejercer su efecto sobre el metabolismo celular a nivel local, o bien pasar a circulación sistémica. Los factores de crecimiento que están en circulación pueden hallarse libres, unidos a proteínas, o bien encontrarse en el interior de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, de los cuales se verán liberados tras del proceso de activación plaquetaria (Canalis, 1992; Grageda, 2004). A nivel local, son capaces de

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).

Es habitual que distintos tipos celulares sean capaces de sintetizar un mismo factor de crecimiento (Canalis, 1992), cuyas acciones dependen de un buen número de variables, como 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. En suma, la acción de los factores de crecimiento no será igual en todos los tejidos ni en todas las situaciones (Kiritsy y Lynch, 1993).

La primera ocasión que se logró aislar un factor de crecimiento derivado de las plaquetas humanas y estudiar sus características citoproliferativas fue en el año 1979 (Antoniades *et al.*, 1979; Kaplan *et al.*, 1979). Más recientemente, se ha demostrado que los gránulos  $\alpha$  plaquetarios albergan gran abundancia de factores de crecimiento, que pueden ser específicos de las plaquetas, o hallados también 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- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, VEGF, bFGF, EGF, IGF-I, HGF y NGF (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Anitua *et al.*, 2004; Marx, 2004; Reed, 2007).

### ***Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)***

El PDGF procede del interior de las plaquetas, motivo por el que recibe su nombre (Antoniades *et al.*, 1979). Principalmente, se encuentra almacenado en los gránulos  $\alpha$  (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Anitua *et al.*, 2004; Marx, 2004; Reed, 2007), aunque también puede ser hallado 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). Se trata de un polipéptido de naturaleza catiónica que perdura estable hasta alcanzar temperaturas cercanas a los 100°C. Tiene un punto isoeléctrico

muy básico (10.2) y un peso molecular de 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 es una proteína dimérica, dicho de otra manera, está compuesta por dos subunidades. Actualmente, se advierten cuatro tipos de subunidades diferentes: PDGF-A y PDGF-B (Deuel *et al.*, 1981; Ross *et al.*, 1986), las dos primeras en ser reconocidas; y las nuevas PDGF-C y PDGF-D, detectadas posteriormente (Li y Eriksson, 2003; Reigstad *et al.*, 2005).

Los cuatro tipos de PDGF gozan de una estructura parecida, y son capaces de formar puentes disulfuro gracias a una región rica en cistina, uniendo así dos cadenas polipeptídicas antiparalelas. De este modo, la proteína puede obtener una conformación tridimensional, formándose cinco PDGFs, ya sean homodímeros o bien heterodímeros (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Los PDGFs se muestran inactivos en sus formas monoméricas (Reigstad *et al.*, 2005), y todos comparten los mismos receptores tirosín-kinasa; el receptor del factor de crecimiento originario de las plaquetas alfa (PDGFR- $\alpha$ ) y beta (PDGFR- $\beta$ ). El PDGFR- $\alpha$  reconoce tanto PDGF-A como PDGF-B, de modo que puede ligarse a PDGF-AA, -AB y -BB. No obstante, el PDGFR- $\beta$  únicamente reconoce la subunidad PDGF-B, y gozará de alta afinidad por PDGF-BB, se unirá a PDGF-AB con baja afinidad, y no se acoplará a PDGF-AA (Bennett y Schultz, 1993). Ambos receptores pueden combinarse para formar homodímeros o heterodímeros, obteniéndose así tres combinaciones (PDGFR- $\alpha\alpha$ , - $\alpha\beta$ , - $\beta\beta$ ) con afinidad variable hacia los distintos PDGFs (Li y Eriksson, 2003; Reigstad *et al.*, 2005).

Existe un alto grado de flexibilidad en las posibles combinaciones, debido a que la expresión de ambos receptores y de cada uno de los diferentes PDGFs está bajo control independiente. Una  $\alpha_2$ -macroglobulina se combina de manera reversible con el PDGF, creando un compuesto que evita la unión del PDGF a sus receptores, además de protegerlo de la degradación proteolítica y eliminarlo de la circulación (Reigstad *et al.*, 2005).

Una de las funciones principales del PDGF es activar las células de origen mesenquimal (Pierce *et al.*, 1991). Estudios *in vitro* han expuesto un notable efecto mitogénico sobre fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso vascular y células

de la glía (Kiritsy y Lynch, 1993), además de otros muchos efectos biológicos. También goza de un potente efecto quimiotáctico sobre fibroblastos, células de músculo liso y células inflamatorias (Kiritsy y Lynch, 1993). El PDGF promueve 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 como la endocitosis o la migración celular, relacionados con la remodelación tisular (Kiritsy y Lynch, 1993).

El PDGF es uno de los primeros factores de crecimiento detectables en el foco de lesión tras un daño tisular, por ello, las investigaciones sobre su función en los procesos de reparación-regeneración son muy numerosas (Hsu y Chang, 2004)

El PDGF desempeña una función esencial en los procesos de cicatrización tendinosa, como han comprobado Duffy y sus colaboradores (1995) en un estudio sobre un modelo experimental canino, en el que hallaron niveles elevados de PDGF durante la cicatrización del tendón flexor digital (Duffy *et al.*, 1995). Se piensa que el PDGF actúa primordialmente durante las fases más precoces de la cicatrización tendinosa, estimulando la síntesis de otros factores de crecimiento, como IGF-I (Molloy *et al.*, 2003), aunque estudios *in vitro* han demostrado que también interviene durante la fase de remodelación tisular (Yoshikawa y Abrahamsson, 2001). El PDGF impulsa la síntesis de colágeno y de otras proteínas de la matriz extracelular tendinosa de un modo dosis dependiente (Molloy *et al.*, 2003).

En un estudio *in vivo* realizado sobre la cicatrización ligamentosa de un modelo experimental en rata, Letson y Dahners (1994) emplearon tanto PDGF solo como combinaciones de PDGF con IGF-I y bFGF, y hallaron que los parámetros biomecánicos de los ligamentos tratados con PDGF experimentaron mejoría, pero no así los casos en los que se combinaron los diferentes factores de crecimiento (Letson y Dahners, 1994). Posteriormente, otras investigaciones realizadas sobre un modelo experimental en conejo han confirmado que la aplicación de PDGF-BB en el sitio de lesión ligamentosa mejora el nivel biomecánico de la cicatrización, pero no su nivel histopatológico (Hildebrand *et al.*, 1998). Recientemente, en un modelo experimental canino se ha

demostrado que la funcionalidad del tendón reparado mejora con la liberación de PDGF-BB durante el proceso de cicatrización tendinosa (Thomopoulos *et al.*, 2009).

Los receptores para el PDGF son expresados a nivel articular por los condrocitos. (Bowen-Pope *et al.*, 1991). Para los condrocitos articulares normales, cultivados y reimplantados este factor de crecimiento es mitógeno (Ljung *et al.*, 1995). En un estudio experimental en ratas, se aplicó de manera intraarticular PDGF-BB, produciéndose un aumento transitorio y precoz de la actividad osteogénica en las capas profundas del cartílago articular (Hulth *et al.*, 1996).

Los osteoclastos desempeñan un papel clave en los procesos de remodelación ósea, y el PDGF se sirve de ellos para estimular precisamente la resorción ósea. Otros factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$ , regulan la síntesis local de PDGF en la matriz ósea (Grageda, 2004). En estudios *in vivo*, se ha comprobado como el PDGF aumenta la formación de hueso ectópico y también la actividad de la fosfatasa alcalina sobre un transportador de matriz ósea desmineralizada (Howes *et al.*, 1988). Así mismo, se han obtenido efectos beneficiosos en la cicatrización de hueso mediante el uso de aplicaciones locales de PDGF sobre modelos experimentales de osteotomía en conejos (Nash *et al.*, 1994; Vikjaer *et al.*, 1997).

El PDGF actúa como agente quimiotáctico y mitogénico para estirpes celulares involucradas 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). Durante la fase más tardía de remodelación, el PDGF promueve procesos de angiogénesis, y regula la expresión de metaloproteasa de la matriz tipo-1 (MMP-1) y de su inhibidor natural (TIMP-1). Este factor de crecimiento impulsa la proliferación fibroblástica, la migración epitelial, los procesos de vascularización y la infiltración neutrofílica durante el proceso cicatricial (Pierce *et al.*, 1991; Reigstad *et al.*, 2005). La velocidad de cicatrización y la fuerza tensil del tejido cicatricial se verán mejoradas merced a la aplicación tópica de PDGF sobre la herida (Hsu y Chang, 2004).

### *Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ )*

Existe un gran número de factores de crecimiento relacionados desde un punto de vista estructural que pueden ser incluidos en la familia TGF- $\beta$ , cada uno de ellos con capacidad para regular importantes procesos celulares. Los componentes de esta superfamilia comparten una región de residuos de cisteína que crea una estructura común mantenida mediante puentes disulfuro (Massagué, 1998). Dentro del gran grupo, hallamos subfamilias, como la de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que llevan a cabo funciones fundamentales durante el desarrollo embrionario y, más adelante, en la etapa postnatal y adulta (Chen *et al.*, 2004). Las activinas, las inhibinas y la sustancia inhibidora mülleriana de los mamíferos son otras estirpes destacadas. Todas estas proteínas coinciden entre un 25% y un 35% de la homología secuencial del TGF- $\beta$  (Kiritsy y Lynch, 1993; Massagué, 1998).

Inicialmente, los componentes de la familia TGF- $\beta$  fueron identificados en células transformadas (neoplásicas), de ahí su nomenclatura, pero también fueron hallados en diferentes tejidos no neoplásicos, aspecto que indica el importante papel fisiológico de estas sustancias en la modulación del crecimiento celular (Assoian *et al.*, 1984).

Se han detallado tres isoformas del TGF- $\beta$  en los mamíferos: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. La molécula bioactiva es un homodímero formado por dos polipéptidos de 12.500 Daltons cada uno, unidos por un puente disulfuro, integrando así una molécula de 25.000 Daltons (Assoian *et al.*, 1982; Clark y Coker, 1998). Los TGF- $\beta$ s son secretados como precursores peptídicos latentes (LTGF- $\beta$ ) y para poder unirse a sus receptores requieren una activación previa (Clark y Coker, 1998; Todorovic *et al.*, 2005), ya sea por proteasas como la plasmina y la trombina, o bien debido a interacciones físicas con proteínas como la trombospondina-1 o las integrinas. El óxido nítrico (NO) es otro activador del TGF- $\beta$  (Clark y Coker, 1998; Blobel, 2000; Todorovic *et al.*, 2005). Las actividades fisiológicas del TGF- $\beta$  son mediadas por la interacción de cinco receptores (T $\beta$ Rs), aunque los principales son T $\beta$ R-I y T $\beta$ R-II (Massagué, 1998; Huang y Huang, 2005).



Las mayores reservas de TGF- $\beta$  se hallan en los gránulos  $\alpha$  plaquetarios, en concentraciones de 40 a 100 veces superiores si las comparamos con otros tejidos no neoplásicos (Assoian *et al.*, 1984). También en el hueso se han localizado notables concentraciones de TGF- $\beta$ , y los osteoblastos son las células que presentan mayor cantidad de T $\beta$ Rs, hecho que deja entrever la trascendencia de este factor de crecimiento sobre el metabolismo óseo (Robey *et al.*, 1987; Lind, 1996). El TGF- $\beta$  también puede ser secretado por linfocitos (Kehrl *et al.*, 1986), macrófagos (Assoian *et al.*, 1987) y fibroblastos (Lyons *et al.*, 1988).

El TGF- $\beta$  es un péptido encargado de regular funciones biológicas significativas, tales como la proliferación, la migración y el metabolismo celular. Dependiendo de su concentración, del tipo celular al cual es expuesto y del ambiente tisular en el que se encuentra, este factor de crecimiento puede tanto estimular como inhibir la diferenciación y proliferación celular (Kiritsy y Lynch, 1993). De modo que activa las células de origen mesenquimal, mientras que inhibe aquellas de origen ectodérmico (Lind, 1996). El TGF- $\beta$  también contribuye al crecimiento y desarrollo tanto embrionario como adulto, en la respuesta inflamatoria y en los procesos de reparación tisular (Clark y Coker, 1998). Así mismo, este factor de crecimiento resulta esencial en la regulación del sistema inmune, ya que participa en procesos relacionados con la apoptosis, la selección y la activación de las células T (Huang y Huang, 2005).

En estudios *in vitro* se ha observado que el TGF- $\beta$  es un fuerte mitógeno para los osteoclastos (Centrella *et al.*, 1987), no obstante, es un inhibidor de células epiteliales, endoteliales y del crecimiento de linfocitos T y B (Kiritsy y Lynch, 1993). El efecto de estimulación o de inhibición que ejerza el TGF- $\beta$  dependerá en gran parte de los otros factores de crecimiento que puedan estar actuando de manera simultánea en ese mismo ambiente celular (Roberts *et al.*, 1985).

El TGF- $\beta$  posee otras muchas y esenciales funciones biológicas. Por ejemplo, es bien conocido su fuerte efecto quimiotáctico sobre monocitos (Wahl *et al.*, 1987) y fibroblastos (Postlethwaite *et al.*, 1987). También se ha comprobado que estimula la síntesis de colágeno y fibronectina por parte de los fibroblastos en condiciones *in vitro* (Roberts *et al.*, 1986; Ignatz y Massagué, 1986), al mismo tiempo que impide la

producción de proteasas y potencia la secreción de sustancias inhibidoras de las proteasas (Kiritsy y Lynch, 1993). Asimismo, el TGF- $\beta$  regula las acciones de otros muchos factores de crecimiento, influyendo en la dirección de sus efectos, ya sea de manera positiva o negativa (Kiritsy y Lynch, 1993).

El TGF- $\beta$  interviene activamente a lo largo de todas las etapas de la cicatrización tendinosa, desarrollando acciones significativas en la zona de reparación tisular, como la estimulación de la migración de células extrínsecas, la regulación de la actividad de las proteasas, la estimulación de la producción de colágeno y el cese de la proliferación celular (Molloy *et al.*, 2003).

Poco después de producirse un daño en el tendón, la expresión de ARNm de TGF- $\beta$ 1 se incrementa drásticamente, y se piensa que este factor de crecimiento desempeña una función clave en la respuesta inflamatoria inicial tras el daño tisular (Sciore *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* en cultivo celular de epitendón y endotendón revelaron que las tres isoformas de TGF- $\beta$  provocaban un aumento notable en la producción de colágeno tipo I y III (los tipos de colágeno más abundantes en el tendón) y en la viabilidad celular (Klein *et al.*, 2002).

Unas dosis elevadas de TGF- $\beta$ 1 exógeno pueden provocar efectos deletéreos sobre la reparación del tendón, como la formación de adhesiones y fibrosis, lo que conlleva una considerable disminución del rango de movilidad tendinosa, según se ha podido comprobar en estudios *in vivo* sobre un modelo experimental de daño tendinoso (Molloy *et al.*, 2003). Para eludir este efecto, dicho factor de crecimiento ha sido aplicado con éxito junto con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- $\beta$ 1, logrando mejoras en la movilidad del tendón (Chang *et al.*, 2000). En un estudio *in vivo* de reparación tendinosa, se ha obtenido un éxito desigual con el empleo de otros miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  (proteínas morfogenéticas óseas), ya que una de las sustancias testadas indujo la formación de espículas óseas, lo que hizo reducir la fuerza mecánica del tendón (Aspenberg y Forslund, 2000).

Las propiedades quimiotácticas que el TGF- $\beta$  ejerce sobre las células inflamatorias, junto con la estimulación de la síntesis de matriz extracelular y la inducción de neovascularización, convierten a este factor de crecimiento en esencial en la

cicatrización de las heridas (Bennet y Schultz, 1993). En modelos experimentales de defectos cutáneos, la administración exógena de TGF- $\beta$  ha conseguido revertir factores perjudiciales para la cicatrización de heridas, como la edad o los glucocorticoides (Beck *et al.*, 1991; Beck *et al.*, 1993). No obstante, algunos autores vinculan el TGF- $\beta$  con una fibrosis excesiva de las heridas, resultando en una deposición excesiva y desordenada de colágeno (Border y Ruoslahti, 1992), ya que en modelos experimentales de heridas cutáneas, se hallaron niveles elevados de TGF- $\beta$  en los casos de formación de cicatriz patológica (Chang *et al.*, 1995).

De igual manera, el TGF- $\beta$  estimula la formación de tejido óseo a través de un aumento en la proliferación de células precursoras de osteoblastos, además de impulsar la síntesis de colágeno en la matriz ósea (Grageda, 2004). Este factor de crecimiento tiene la capacidad de inhibir la formación de osteoclastos y, en consecuencia, producir una inhibición de la resorción ósea (Mohan y Baylink, 1991; Anitua, 1999; Grageda, 2004). Estudios experimentales *in vivo* de defectos óseos han expuesto las propiedades osteoinductoras del TGF- $\beta$  aplicado sobre una matriz ósea desmineralizada (Kibblewhite *et al.*, 1993). Así, en un modelo experimental de fractura, la aplicación exógena de TGF- $\beta$  originó un aumento del tamaño del callo óseo y mejoras en varios parámetros biomecánicos (Lind *et al.*, 1993). Del mismo modo, el empleo de TGF- $\beta$  ha demostrado mejorar la osteointegración y la fijación mecánica de implantes insertados en el hueso trabecular de perros adultos (Sumner *et al.*, 1995; Lind *et al.*, 1996). Por contra, otras investigaciones no exponen unos resultados tan eficaces en la formación de hueso tras la aplicación del factor de crecimiento (Sampath *et al.*, 1987; Ripamonti *et al.*, 1996). La combinación de PDGF y TGF- $\beta$  sobre una matriz ósea desmineralizada ha expuesto efectos positivos en la neoformación ósea al usarse en pequeños animales (Grageda, 2004).

En lo referente al cartílago articular, el TGF- $\beta$  tiene una función reguladora del anabolismo de los condrocitos, promoviendo la proliferación celular y la síntesis de algunos componentes de la matriz extracelular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Grimaud *et al.*, 2002). Actúa directamente sobre los condrocitos fomentando la síntesis de proteoglicanos (Nixon *et al.*, 1998; van Osch *et al.*, 1998) y se encarga de regular los

efectos de otros factores de crecimiento e interleuquinas. De modo que el TGF- $\beta$  fomenta una buena homeostasis del cartílago al contrarrestar la mayoría de los efectos negativos que la IL-1 ejerce sobre el tejido articular (Pujol *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado la trascendencia del TGF- $\beta$  en la patogénesis de la osteoartritis (Román-Blas *et al.*, 2007).

### ***Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)***

La familia IGF está compuesta por dos miembros: el IGF de tipo I, también conocido como somatomedina C, y el IGF de tipo II, o factor de crecimiento esquelético. El IGF-I es una cadena polipeptídica formada por 70 aminoácidos (7.7 kD), con una configuración espacial sostenida por tres puentes disulfuro (Mohan y Baylink, 1991). Por su parte, el IGF-II formado por 67 aminoácidos (7.5 kD) posee también una región con tres puentes disulfuro (Mohan y Baylink, 1991). Los dos tipos de IGF 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).

Ambos IGFs son sintetizados por un gran número de tejidos en el individuo adulto, aunque el IGF-II lo hace principalmente durante el desarrollo fetal, mientras que la síntesis de IGF-I alcanza niveles altos en tejidos adultos tales como hígado, corazón, pulmón, riñón, páncreas, cartílago, cerebro y músculo (Bennett y Schultz, 1993). Tras su síntesis, el IGF-I puede intervenir localmente sobre los tejidos adyacentes (efecto autocrino/paracrino), o bien desempeñar su función sobre tejidos alejados (efecto endocrino) (Hsu y Chang, 2004). Ciertos influjos hormonales regulan la síntesis de IGFs, en especial la hormona de crecimiento (GH), que impulsa la síntesis de IGF-I básicamente a nivel hepático (Canalis, 1992; Bennet y Schultz, 1993). Tras ser sintetizado principalmente en el hígado, el IGF se libera al torrente sanguíneo, donde las plaquetas lo capturan merced a un mecanismo de endocitosis y lo almacenan en el interior de los gránulos  $\alpha$  (Duan, 2002).

Ambos factores de crecimiento insulínico poseen receptores diferentes. El receptor del IGF-I (IGFR-I) está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ , unidas por puentes disulfuro, con una estructura similar al de la insulina. El IGFR-I se une con

afinidad alta al IGF-I, con baja afinidad al 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 une a insulina (Bennett y Schultz, 1993).

El IGF puede unirse con seis proteínas (IGFBPs) que 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). Los efectos biológicos del IGF quedan condicionados por este balance dinámico entre la forma libre y la forma unida a proteínas (Bennett y Schultz, 1993).

Los IGFs son proteínas anabólicas con una gran variedad de cometidos biológicos, entre los que debemos destacar la replicación celular, la síntesis de glucógeno, de proteínas y de glicosaminoglicanos, y el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la membrana celular (Kiritsy y Lynch, 1993).

Uno de los ámbitos preferentes de actuación del IGF es el sistema locomotor, impulsando un incremento en la formación de cartílago y hueso, así como el descenso en la degradación de la matriz extracelular de estos tejidos. Los IGFs tienen un papel esencial en el mantenimiento de la masa ósea y en la estimulación del crecimiento esquelético (Canalis, 1992). Ambos IGFs actúan de manera similar a la hora de promover el crecimiento, pero parece ser que el IGF-I es hasta tres veces más potente que el IGF-II (Canalis, 1992; Grageda, 2004).

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

Durante el proceso de cicatrización tendinosa, el IGF-I desarrolla distintas funciones, y su misión principal consiste en impulsar la proliferación y migración de fibroblastos y otras células al lugar del daño, originando un incremento en la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular durante las fases de remodelado (Molloy *et al.*, 2003). Esta actividad estimulante del IGF-I crea sinergia con otras moléculas, como por ejemplo PDGF-BB. La división celular en fibroblastos de tendón y células de la

superficie tendinosa aumenta con la aplicación de ambos factores de crecimiento juntos, en comparación con sus efectos aislados, según se ha comprobado en estudios *in vitro* (Tsuzaki *et al.*, 2000).

Aprovechando la actividad mitogénica que ejerce sobre los tenocitos, se han intentado desarrollar aplicaciones terapéuticas del IGF-I para promover la cicatrización tendinosa (Hsu y Chang, 2004). Mediante la aplicación exógena del IGF-I en un modelo experimental de tendones flexores en conejo, se consiguió un estímulo en la síntesis de ADN, colágeno y proteoglicanos, además de un impulso en la proliferación celular (Abrahamsson *et al.*, 1991). La inyección de este factor de crecimiento en un modelo experimental de tendinitis inducida por colagenasa mejoró la cicatrización tendinosa, tanto desde el punto de vista histológico como biomecánico (Dahlgren *et al.*, 2002). En un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles, y mediante una única aplicación perilesional de IGF-I, se mitigó el déficit funcional y se incrementó la recuperación funcional del tendón dañado, sin disminuir sus propiedades biomecánicas. En el foco de cicatrización tendinosa, el IGF-I adquiere una función antiinflamatoria, según los estudios realizados (Kurtz *et al.*, 1999).

El IGF interviene en todas las fases de la cicatrización de las heridas, pero especialmente durante los estadios inflamatorios y proliferativos (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, originando altas concentraciones de IGF-I en el fluido de la herida (Kiritsy y Lynch, 1993). En un modelo experimental porcino de herida cutánea de espesor parcial, la aplicación tópica de IGF-I prácticamente no influyó en la cicatrización de la herida. No obstante, la combinación de IGF-I con PDGF-BB aumentó de manera notable la cicatrización cutánea (Lynch *et al.*, 1989). Ambos IGFs ejercen un efecto sinérgico con PDGF incrementando los procesos de cicatrización cutánea (Kiritsy y Lynch, 1993).

La acción más destacada que el IGF ejerce sobre el hueso se produce sobre el cartílago de la placa de crecimiento. El crecimiento longitudinal del hueso se controla por la hormona de crecimiento (GH) mediante el aumento 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). Varias investigaciones no han obtenido resultados destacables sobre la estimulación de la cicatrización ósea *in vivo* y la formación de hueso con el uso de IGFs. Tanto en un modelo experimental de crecimiento óseo en cámara con la aplicación de IGF-I a nivel local (Aspenberg *et al.*, 1989) como con una aplicación local continua de IGF-I sobre un modelo experimental de osteotomía (Kirkeby y Ekeland, 1992) no se consiguieron efectos beneficiosos. Por contra, estudios experimentales en ratas han hallado un aumento en la formación de hueso tras la aplicación sistémica de IGF-I (Spencer *et al.*, 1991).

Los condrocitos se encargan de sintetizar el IGF-I, que posteriormente se almacena en la matriz extracelular del cartílago (Gaissmaier *et al.*, 2008). Sus efectos sobre la proliferación y el desarrollo de los condrocitos del cartílago de crecimiento son más conocidos que los de cualquier otro factor de crecimiento (Takigawa *et al.*, 1997). Además, favorece la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II, y al mismo tiempo impide la destrucción de matriz extracelular (Verschure *et al.*, 1996; van Osch *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* revelaron que la aplicación de IGF-I sobre cultivos celulares de condrocitos incrementó la síntesis de proteoglicanos, hecho que coincide con un aumento en la expresión de su receptor (Verschure *et al.*, 1996).

### **Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)**

Los FGF, también conocidos como “factores de crecimiento ligados por heparina” (HBGF), son un grupo compuesto por un gran número de proteínas que abarcan desde el FGF-1 al FGF-23 (Olsen *et al.*, 2003). Los dos miembros más estudiados son el FGF-1, o factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), y el FGF-2, o factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y sus nombres hacen referencia a sus diferentes puntos isoeléctricos, siendo su pH 5.6 y 9.6, respectivamente (Canalis, 1992; Bennett y Schultz, 1993; Lind, 1996). Tanto el aFGF como el bFGF tienen un peso molecular aproximado de 17.000 Da, y el análisis bioquímico señala que comparten un 55% de homología secuencial (Canalis, 1992). Tanto en el suero sanguíneo como en otros tejidos tales como hipófisis, cerebro, retina, corteza adrenal, ovario y hueso se aíslan los FGFs

(Canalis, 1992). Las principales fuentes de bFGF son las células del endotelio vascular, los macrófagos y las plaquetas (Kiritsy y Lynch, 1993).

Los miembros de la familia FGF tienen la capacidad de ser ligados por la heparina y el heparán-sulfato, así que es habitual que el análisis inmunohistoquímico de los tejidos en busca de bFGF muestre la agrupación de este factor de crecimiento al heparán-sulfato de la matriz extracelular y de la membrana basal (Bennett y Schultz, 1993). Como consecuencia, el bFGF se protege de la degradación proteolítica por la unión a la heparina y al heparán-sulfato. Este hecho conlleva que los componentes de la matriz extracelular que contengan heparina sean capaces de regular la actividad del FGF actuando así como lugares de almacenamiento y liberación de este factor de crecimiento (Bennett y Schultz, 1993).

Han sido identificados un mínimo de cuatro receptores para el FGF, conocidos como FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 (Bennett y Schultz, 1993).

Los FGFs actúan sobre una amplia variedad de estirpes celulares realizando funciones mitogénicas, quimiotácticas y angiogénicas (Kiritsy y Lynch, 1993). Tanto el aFGF como el bFGF tienen un fuerte 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). También desempeñan una actividad angiogénica, esencial para los procesos de neovascularización durante la reparación-regeneración tisular (Lind, 1996).

En lo referente a la reparación tendinosa, el bFGF impulsa la proliferación de los fibroblastos del tendón (Hsu y Chang, 2004). Los valores de este factor de crecimiento aumentan durante las primeras 8 semanas tras el daño tendinoso, hallándose principalmente en los tenocitos del epitendón y en las células inflamatorias y fibroblastos de la vaina tendinosa (Hsu y Chang, 2004). La aplicación de bFGF provoca un aumento en la proliferación celular y en la síntesis de colágeno tipo III, según se ha puesto de manifiesto en un estudio *in vivo* sobre un modelo experimental de daño tendinoso en rata (Chan *et al.*, 2000). Sobre un modelo de defecto en la banda craneomedial del ligamento cruzado craneal canino (área de bajo poder cicatricial) se obtuvo una rápida cicatrización de los defectos, con aparición de nuevo tejido de



granulación, gracias al uso de transportadores impregnados en bFGF (Kobayashi *et al.*, 1997).

Tras sufrir un daño tisular, el bFGF participa en la respuesta proliferativa y angiogénica, además de fomentar la síntesis de colágeno, hecho que puede favorecer la creación de adherencias que reduzcan el deslizamiento del tendón a través de su vaina (Hsu y Chang, 2004).

Los FGFs impulsan 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 como condrocitos, osteoblastos o mioblastos. También promueve la migración de células al lugar de la lesión, incita la neovascularización, e impulsa la formación del tejido de granulación (Bennett y Schultz, 1993; Kiritsy y Lynch, 1993; Hsu y Chang, 2004). La administración exógena de bFGF en un modelo experimental porcino de herida cutánea de espesor parcial produjo una aceleración en el ritmo de reepitelización (Hebda *et al.*, 1990). Otro grupo de investigación expuso que el empleo de bFGF sobre ese mismo modelo experimental ocasionó un aumento en el espesor de la epidermis (Lynch *et al.*, 1989).

En lo referente al tejido óseo, los FGFs ejercen principalmente un efecto proliferativo sobre los osteoblastos, y no tanto un efecto de estímulo para la síntesis de proteínas. De modo que los FGFs producen un incremento en el número de células con capacidad osteogénica para favorecer la formación de hueso (Lind, 1996). En un estudio experimental *in vivo* se incorporó bFGF a la matriz ósea desmineralizada y el conjunto se implantó a nivel intramuscular en ratas, obteniéndose un incremento en la formación de hueso (Aspenberg y Lohmander, 1989). En un modelo experimental de fractura en ratas, la administración de bFGF originó un incremento en la formación de callo y en el contenido mineral del hueso (Lind, 1996).

El bFGF tiene la capacidad de promover la proliferación y diferenciación de condrocitos en el cartílago, tanto *in vitro* como *in vivo* (Gaissmaier *et al.*, 2008). Tras la aplicación de bFGF en diversos modelos experimentales de defecto de cartílago, los resultados mostraron una aceleración en la formación de cartílago sobre la superficie

articular, con una mejora en sus propiedades biomecánicas y en la formación de hueso subcondral (Chuma *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2005).

El uso de bFGF ha resultado provechoso en varios modelos experimentales, tanto en la aceleración de la cicatrización de úlceras duodenales (Szabo *et al.*, 1994), como en la mejora de la circulación colateral y la función miocárdica tras un infarto (Hughes *et al.*, 2004).

### ***Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)***

Descubierto en 1962 en extractos de saliva de ratón, el EGF ha sido uno de los factores de crecimiento estudiados de manera más amplia y minuciosa (Kiritsy y Lynch, 1993). Hablamos de un polipéptido con un peso molecular de 6200 Da y con una estructura espacial compuesta por tres bucles mantenidos por tres puentes disulfuro, estructura fundamental para su actividad biológica y que lo distingue de otros factores de crecimiento (Bennett y Schultz, 1993). Los valores plasmáticos de EGF son prácticamente indetectables, pero es posible hallar cantidades significativas de este factor de crecimiento en el interior de las plaquetas (Pesonen *et al.*, 1989). Los receptores para el EGF han sido localizados en diferentes estirpes celulares, y tienen un dominio con actividad tirosín-kinasa (Bennett y Schultz, 1993).

El EGF muestra su efecto principalmente sobre las células epiteliales, aunque también puede actuar sobre queratinocitos, fibroblastos, células de la glía, condrocitos y células de músculo liso (Kiritsy y Lynch, 1993).

El EGF impulsa la mitogénesis, produciendo tanto en los fibroblastos como en las células endoteliales un incremento en la síntesis de ADN, ARN y proteínas. De igual manera, estimula los procesos de neovascularización, la migración de células epiteliales y favorece el crecimiento y la diferenciación de queratinocitos (Kiritsy y Lynch, 1993; Lind, 1996).

EL EGF tiene una función importante durante las fases tempranas de cicatrización tras el daño tendinoso. Aunque el 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).

Durante los primeros estadios de la cicatrización de las heridas, el EGF liberado por las plaquetas actúa de manera local (Bennett y Schultz, 1993). Varios experimentos han demostrado que el tratamiento con EGF mejora la cicatrización en distintos tipos de heridas, a través de un estímulo en la migración y división de las células epiteliales (Bennett y Schultz, 1993). La histología de estas heridas indica un aumento en el número de fibroblastos. A pesar de que el EGF no estimula la síntesis de ARNm para proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, presumiblemente sí incrementa los fibroblastos en el foco de reparación tisular gracias a un efecto mitógeno y quimiotáctico, originando una producción mayor de colágeno en conjunto (Bennett y Schultz, 1993). Algunos estudios clínicos que han empleado EGF revelan un aumento en el ritmo de epitelización en heridas de espesor parcial y un incremento en la cicatrización de heridas crónicas (Brown *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1991).

Otros estudios han resuelto que la aplicación local de EGF en lesiones corneales produce un incremento en la proliferación del epitelio corneal (Kiritsy y Lynch, 1993).

La acción de EGF sobre el cultivo de osteoblastos es más moderada (Lind, 1996). En un estudio experimental donde se aplicó EGF por vía sistémica a ratones, incrementaron tanto la formación de hueso perióstico y endóstico como la actividad osteoblástica (Marie *et al.*, 1990).

En el plano referente a los condrocitos, la aplicación de EGF produce un aumento en la síntesis de ADN (Ribault *et al.*, 1997).

### ***Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)***

El VEGF fue descubierto a principios de la década de los 80, y fue nombrado "*vascular permeability factor*". Se trataba de una sustancia secretada por las células tumorales que aumentaba la permeabilidad de los vasos sanguíneos, y que clínicamente causaba el acumulo de líquido ascítico (Senger *et al.*, 1983).

En la actualidad, conocemos cinco isoformas de VEGF formadas por 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos, que derivan de diferentes cortes del ARNm de VEGF y que se diferencian entre sí por el tamaño. Las isoformas predominantes son el VEGF<sub>121</sub> y el VEGF<sub>165</sub>, pero todas ejercen funciones biológicas similares (Hsu y Chang, 2004).

El VEGF ha cobrado importancia debido al papel que desempeña en la angiogénesis tumoral, pero este factor de crecimiento no sólo es producido por las células neoplásicas, si no también por numerosas estirpes celulares, entre las que cabe destacar a plaquetas, neutrófilos, células del endotelio vascular, queratinocitos, tenocitos y astrocitos (Hsu y Chang, 2004).

La actividad biológica del VEGF depende de la unión y activación de sus receptores (VEGFR), de los que se conocen tres isoformas: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Los tres receptores se expresan fundamentalmente en células endoteliales (Hsu y Chang, 2004).

Este factor de crecimiento desempeña una función crucial en el desarrollo embriológico del sistema cardiovascular, en la angiogénesis de la retina y en otros procesos que precisan fases de neovascularización (Hsu y Chang, 2004). Además de ello, también está implicado en los estados de angiogénesis patológicos, como el crecimiento tumoral (Kim *et al.*, 1993).

Tras la unión a sus correspondientes receptores, el VEGF estimula la síntesis de enzimas como la colagenasa y la gelatinasa, que ayudan a romper la membrana basal vascular. Además, también promueve la expresión de  $\alpha$ -integrinas (esenciales en la neovascularización), originando así vasodilatación y un aumento en la permeabilidad vascular y en la migración de células endoteliales y monocitos (Hsu y Chang, 2004).

De igual manera que el resto de factores de crecimiento, el VEGF es esencial en los procesos de reparación-regeneración tisular. Aunque ejerce un papel importante en las fases precoces de migración y proliferación celular, el VEGF se muestra más activo tras el proceso inflamatorio, sobre todo en las fases proliferativa y de remodelado, donde actúa como un eficaz agente estimulante de la angiogénesis (Molloy *et al.*, 2003).

Este factor de crecimiento ha sido hallado en fibroblastos sinoviales y en tenocitos, y se cree que ejerce una función importante en la angiogénesis del tendón. Sus

receptores (VEGFR-1) participan en la microvasculatura tendinosa (Hsu y Chang, 2004). Los valores de VEGF en el tendón de Aquiles intacto son insignificantes, pero aumentan tras producirse la rotura tendinosa (Pufe *et al.*, 2001).

Una mayor presencia del VEGF en el lugar de la lesión se corresponde con un patrón de crecimiento vascular bien definido desde los vasos sanguíneos de la periferia del tendón hacia el foco de lesión, suministrando así células extrínsecas, nutrientes y factores de crecimiento al área lesionada (Molloy *et al.*, 2003).

El tratamiento con inyección perilesional de VEGF en un estudio sobre un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en rata indicó un aumento en la fuerza tensil de los tendones tratados en comparación con los controles no inyectados (Zhang *et al.*, 2003). El aceleramiento de los procesos de angiogénesis es el mecanismo terapéutico más adecuado en el que el VEGF promueve una mejor cicatrización tendinosa (Hsu y Chang, 2004).

En la cicatrización de las heridas, el VEGF es el factor encargado de los procesos de angiogénesis en el tejido de granulación (Hsu y Chang, 2004). Se ha demostrado que el VEGF mejora la cicatrización en heridas isquémicas al ser administrado de manera tópica (Corral *et al.*, 1999).

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

Se cree que el VEGF también es básico en el cartílago de la placa de crecimiento, donde mantiene la formación de hueso subcondral (Gaissmaier *et al.*, 2008).

### ***Factor de Crecimiento Neurotrófico (NGF)***

Es un factor de crecimiento perteneciente a la familia de las neurotrofinas, sobresale por ser una sustancia capaz de regular el crecimiento y la diferenciación del tejido nervioso durante el desarrollo embrionario (Nico *et al.*, 2008), además de ejercer sus efectos sobre otras estirpes celulares, como las células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, mastocitos), los fibroblastos y las células endoteliales, todas ellas con un papel destacado en los procesos de reparación-regeneración tisular (Kawamoto y

Matsuda, 2004). El NGF posee tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y parece ser que su bioactividad reside en la subunidad  $\beta$ , con un peso molecular de 26.500 KDa (Nimni, 1997).

Este factor de crecimiento tiene la capacidad de favorecer la migración y la proliferación de las células endoteliales, remodelar la matriz extracelular y promover la maduración de los vasos sanguíneos neoformados. Además de ello, tiene una participación decisiva en la angiogénesis de varios procesos patológicos, como determinadas enfermedades cardiovasculares y neoplásicas (Nico *et al.*, 2008).

En lo referente a la piel, fibroblastos, queratinocitos, mastocitos y otros tipos celulares residentes se encargan de la producción de NGF. Varios estudios experimentales sobre un modelo de defecto cutáneo en ratón han resuelto que la aplicación tópica de NGF acelera la cicatrización, incluyendo aquellos en los que la cicatrización está comprometida (diabéticos) (Kawamoto y Matsuda, 2004). Este factor de crecimiento favorece 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).

En un modelo experimental de fractura de hueso en conejo, se ha demostrado un incremento en la expresión de NGF durante el proceso de cicatrización ósea (Kawamoto y Matsuda, 2004). En el cartílago en desarrollo, la síntesis de ADN y los glucosaminoglicanos aumentan por la intervención de NGF (Kawamura y Urist, 1988).

En los tenocitos humanos se han hallado neurotrofinas como el NGF (Bagge *et al.*, 2009), pero aún no tenemos datos sobre la actividad que este factor de crecimiento lleva a cabo en los procesos de reparación tendinosa.

### ***Factor de Crecimiento Hepatocítico (HGF)***

Tras producirse un daño tisular, este factor de crecimiento multifuncional se secreta por determinadas células mesenquimales (Nayeri *et al.*, 2005). También podemos hallar HGF en el interior de los gránulos alfa plaquetarios (Anitua *et al.*, 2005). Hablamos de una proteína mitogénica para células endoteliales y que además impulsa la migración celular. HGF tiene un efecto angiogénico debido a que incrementa la expresión de

VEGF, y ambos factores ejercen una acción sinérgica sobre las células endoteliales, más acentuada en combinación que por separado (Anitua *et al.*, 2005).

Varias investigaciones han aplicado HGF en el tratamiento de úlceras crónicas en las extremidades (Nayeri *et al.*, 2005). Los resultados apuntan a que la utilización de HGF en heridas cutáneas disminuye la neovascularización y la formación de tejido de granulación en el lecho de la herida (Yoshida *et al.*, 2003). Por contra, el HGF no ha sido examinado en modelos experimentales de reparación tendinosa.

### **¿Cómo se obtiene el Plasma Rico en Plaquetas (PRP)?**

En el año 1994, Tayapongsak y colaboradores publicaron unos resultados prometedores sobre el uso de un pegamento de fibrina autólogo en pacientes sometidos a reconstrucción ósea maxilofacial (Tayapongsak *et al.*, 1994). Pero no fue hasta 1997 cuando apareció la primera referencia bibliográfica que describía el empleo de un concentrado autólogo de plaquetas con la finalidad de promover los procesos de cicatrización tisular (Whitman *et al.*, 1997). Estudios posteriores evidenciaron que esa red de fibrina autóloga, además de su acción osteoinductiva y de servir para compactar y facilitar la manipulación del injerto de hueso, almacenaba una fuente de factores de crecimiento que favorecían los procesos de cicatrización (Anitua, 1999).

En sus estudios, Whitman y colaboradores (1997) hallaron una alternativa al pegamento de fibrina que hasta entonces se empleaba en determinados procedimientos quirúrgicos, especialmente en cirugía oral y maxilofacial, al que llamaron "gel de plaquetas". El pegamento de fibrina es un biomaterial que mimetiza la última fase de la coagulación sanguínea en el lugar sobre el cual se aplica; en otras palabras, convierte el fibrinógeno en fibrina, y de este modo permite la adhesión de superficies tisulares, la hemostasis y fomenta los procesos de cicatrización (Matras, 1985). Este pegamento de fibrina es una combinación de dos elementos: por un lado, un concentrado de fibrinógeno, factor XIII (factor estabilizante de la fibrina) y fibronectina; por otro, se añade trombina, cloruro de calcio y un inhibidor de la fibrinólisis, lo que acaba creando el tapón de fibrina (Matras, 1985). Los pegamentos de

fibrina han sido comercializados en Europa, aunque nunca han llegado a ser aprobados por la FDA debido a los riesgos de transmisión de enfermedades virales que existían (Whitman *et al.*, 1997). Debido a que el riesgo biológico reside especialmente en la fuente de fibrinógeno, las investigaciones han apuntado al avance de numerosas técnicas para el preparado de pegamento de fibrina a partir de una fuente de fibrinógeno autóloga (Tayapongsak *et al.*, 1994). Pero obtener un pegamento de fibrina autólogo era caro y poco funcional, ya que precisaba una donación con tres semanas de antelación, y el crioprecipitado de fibrinógeno obtenido debía de ser descongelado el mismo día de la cirugía (Whitman *et al.*, 1997). El "gel de plaquetas", además de ser obtenido de una manera más fácil que el pegamento de fibrina, aporta factores de crecimiento que son liberados por las plaquetas tras su activación (Whitman *et al.*, 1997). Toda la teoría de la aplicación del PRP se apoya precisamente en este concepto.

### ***Obtención de PRP por aféresis***

Desde la publicación de los primeros trabajos de Whitman y colaboradores en 1997, y de Marx y colaboradores en 1998, la metodología para la obtención del PRP ha evolucionado mucho. Los citados autores utilizaban 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 modo que lograron 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. Un aparato de aféresis en el propio quirófano separaba la sangre en sus tres componentes básicos: el plasma pobre en plaquetas (PPP), la capa leucocitaria (que contiene los leucocitos y parte de las plaquetas) y los eritrocitos. La sangre era centrifugada a 5.600 rpm, y las diferentes densidades de sus componentes situaban a los eritrocitos en el nivel más bajo, a la capa leucocitaria en un nivel intermedio, y al PPP en lo más alto. Tras retirar el PPP, los otros dos componentes eran sometidos a una segunda centrifugación a menor velocidad (2.400 rpm) con el fin de obtener una separación más precisa entre capa leucocitaria y eritrocitos. Se obtenía así un volumen de plasma en el cual estaban concentradas la capa leucocitaria y las plaquetas, la fracción considerada como PRP. Los autores conseguían la activación de



las plaquetas gracias a la adición de una mezcla de cloruro cálcico al 10% y trombina bovina. El resto de los componentes sanguíneos podían ser retornados al paciente si se creía conveniente. El recuento plaquetario medio del PRP obtenido mediante este método era de 750.000/ $\mu$ L, aproximadamente (Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998). Sin embargo, otros autores que empleaban igualmente PRP obtenido por aféresis, lograron unas concentraciones plaquetarias más elevadas, entre 1.250.000 y 1.500.000/ $\mu$ L (Zimmermann *et al.*, 2001; Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2003). El contenido leucocitario del PRP obtenido era muy bajo, entre 160-180/ $\mu$ L (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2003). En lo referente a la concentración de factores de crecimiento hallada en las muestras de PRP, los niveles de PDGF-AB rondaban entre 125-190 ng/mL, los de TGF- $\beta$ 1 entre 133-268 ng/mL, y los de IGF-I se mantuvieron en torno a 85 ng/mL (Zimmermann *et al.*, 2001; Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2003).

Si la comparamos con otros sistemas de obtención de PRP, la metodología de aféresis conlleva mayores gastos de producción, ya que requiere alta tecnología y personal cualificado, además de no resultar práctica en clínicas pequeñas. También juega en su contra que se precisa la extracción de un gran volumen de sangre (>450 mL) para la obtención del concentrado plaquetario, lo cual puede originar riesgos para la salud de determinados pacientes (Westphal, 1984). A favor del sistema de aféresis, encontramos que existe un riesgo muy bajo de contaminación bacteriana de la muestra durante todo el procesado (Vasconcelos *et al.*, 2003).

### ***Obtención de PRP mediante sistema de centrifugación simple en tubo: PRGF System® (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)***

En el año 1999, Anitua detalló una técnica más simple, rápida y económica para la obtención de PRP, que posteriormente patentó como Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), en la que únicamente empleaba de 10 a 20 mL de la sangre del paciente, extraída en el mismo quirófano en tubos de 5 mL con anticoagulante citrato sódico al 3.8%. Tras centrifugar los tubos a 460G durante 8 minutos, la sangre quedaba dividida en tres fases: los eritrocitos, en el fondo del tubo; el PRGF, que quedaba en el medio; y el plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF), en la parte superior del

tubo. De cada uno de los tubos de 5 mL se desechaba el mililitro más superficial (que únicamente contenía un 15% de la concentración de plaquetas). El plasma restante era aspirado, sin incluir ni el "buffy coat" ni los eritrocitos, dando lugar al PRGF. Las plaquetas contenidas en este aspirado eran activadas mediante la adición de un 5% de cloruro de calcio al 10% (Anitua, 1999).

Anitua y colaboradores desarrollaron un protocolo mucho más refinado para la obtención de PRGF. Esta metodología permite la obtención de PRGF y fibrina autóloga, a partir de una pequeña muestra de sangre del paciente, y siguiendo un método de centrifugación y aspiración manual en tubos de ensayo previamente publicados por el propio Dr. Anitua (Anitua, 1999).

El PRGF System<sup>®</sup> está formado por los siguientes dispositivos: 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  $\mu$ L y de 20-200  $\mu$ L; puntas de pipeta desechables de 100  $\mu$ L y de 500  $\mu$ L con filtro (Figura 5).



**Figura 5. Material utilizado para la obtención y preparación de PRGF, según la metodología BTI (BTI Biotechnology Institute).**

La fase de pipeteado, llevada a cabo en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación microbiológica del PRGF (Figura 6). Se emplea un pipeteado cuidadoso y preciso, evitando crear turbulencias, y aspirando siempre desde la superficie.



**Figura 6. Tras la centrifugación se aísla el PRGF con la ayuda de una micropipeta.**

Este protocolo desarrollado por Anitua es más práctico y económico que las técnicas de aféresis, pero necesita unas medidas estrictas de asepsia a lo largo de todo el proceso de manipulación y aislamiento del PRGF para garantizar la seguridad biológica del producto final y evitar la contaminación bacteriana (Vasconcelos *et al.*, 2003).

El PRGF System® y todos sus componentes han sido aprobados por las autoridades sanitarias europeas para la obtención de factores de crecimiento plasmáticos y su aplicación en diversas especialidades médicas (<http://bti-biotechnologyinstitute.com/es>).

Comparado con el método de aféresis o con los dispositivos semiautomáticos, este protocolo de obtención de PRP concentra un menor número de plaquetas (500.000/ $\mu$ L), y una cantidad prácticamente despreciable de leucocitos (65/ $\mu$ L) (Weibrich *et al.*, 2005). Del mismo modo, también aglutina un menor número de factores de crecimiento: PDGF-AB= 47.0 ng/mL; TGF- $\beta$ 1= 73.3 ng/mL; IGF-I= 78 ng/mL (Weibrich *et al.*, 2005). Ciertos investigadores han sugerido que los procesos de cicatrización tisular dependen principalmente de la concentración plaquetaria del PRP (Marx, 2004). No obstante, se han logrado resultados clínicos igualmente satisfactorios con la aplicación de preparados plaquetarios obtenidos mediante distintas metodologías, y con diferentes concentraciones plaquetarias y de factores de crecimiento (Marx *et al.*, 1998; Anitua, 1999; Carlson y Roach, 2002; Anitua *et al.*, 2004).

## ***Obtención de PRP mediante sistemas de doble centrifugación en tubo***

### **Método de Landesberg**

Landesberg y colaboradores propusieron en el año 2000 un protocolo manual, rápido y simple para la obtención de PRP, empleando 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 analizaron el efecto que la velocidad y el tiempo de centrifugación ejercen sobre a la capacidad de extracción de plaquetas. Recomiendan una primera centrifugación a 200 G durante 10 minutos, tras la cual el plasma sobrenadante se recoge y se deposita en un tubo sin anticoagulante. Este segundo tubo se somete a otra centrifugación, también a 200 G durante 10 minutos, tras la que se obtiene un sedimento plaquetario en el fondo del tubo que, tras ser resuspendido en un volumen determinado de plasma residual, constituirá el PRP (Landesberg *et al.*, 2000).

La concentración plaquetaria del PRP obtenido mediante esta metodología logra unos valores de entre 550.000 y 900.000/ $\mu$ L. La concentración de PDGF-AB resulta ser de 39.8 ng/mL, y la de TGF- $\beta$ 1 de 42 ng/mL (Landesberg *et al.*, 2000).

### **Curasan PRP® Kit (Fa.Cubasan, Kleinostheim, Germany)**

Con este sistema, la sangre es extraída directamente en unos tubos de ensayo con émbolo, comercializados con el nombre de Monovette (Sarstedt®), que permiten extraer la sangre haciendo succión con el émbolo, o bien usando el propio vacío del tubo. Los tubos usados para la extracción son de 8.5 mL y contienen citrato sódico como anticoagulante. Una gran ventaja de este método es que permite la centrifugación sin necesidad de transferir la sangre a otro tubo de ensayo. Se precisa una centrífuga estándar de laboratorio (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich y Kleis, 2002).

La sangre se centrifuga durante 10 minutos a 2.400 rpm, lo que causará un fraccionamiento de la sangre en plasma, capa leucocitaria y eritrocitos. Acto seguido, el plasma sobrenadante (donde se hallan las plaquetas) se transfiere a otro Monovette, utilizando para ello una aguja larga y una conexión de entrada. Este plasma se

centrifuga de nuevo a 3600 rpm durante 15 minutos, con el objetivo de generar un sedimento que contenga las plaquetas. Tras esta segunda centrifugación, el plasma sobrenadante (PPP) es extraído del tubo hasta dejar alrededor de 0.5 mL. Este volumen 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 mediante este protocolo goza de una elevada concentración plaquetaria, que varía entre 1.000.000 y 2.500.000/ $\mu\text{L}$ , y una concentración leucocitaria entre 14.800 y 33.100/ $\mu\text{L}$ . En el PRP obtenido, los niveles de PDGF-AB se sitúan entre 233.7 y 314.1 ng/mL, la concentración de TGF- $\beta$ 1 oscila entre 79.7 y 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).

### **Friadent-Schütze PRP<sup>®</sup> Kit (Friadent-Schütze, Vienna, Austria)**

Este método utiliza 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) centrifugados a 2400 rpm durante 10 minutos. El plasma sobrenadante se extrae mediante la cánula de un tubo Monovette (Sarstedt<sup>®</sup>) y sometido a una segunda centrifugación a 3600 rpm durante 15 minutos. Con ello se consigue agrupar la mayor parte de las plaquetas en el sedimento de estos segundos tubos. El PPP sobrenadante se extrae, hasta dejar un volumen residual aproximado de 0.8 mL, que será utilizado para resuspender el sedimento plaquetario, y así obtener el PRP (Weibrich *et al.*, 2003).

El tiempo aproximado que este sistema necesita para procesar la sangre es de unos 40 minutos, logrando una concentración plaquetaria de 1.440.000 plaquetas/ $\mu\text{L}$ , y una concentración leucocitaria que ronda los 21.700 leucocitos/ $\mu\text{L}$ . La concentración de los principales factores de crecimiento es la siguiente: PDGF-AB, 251.6 ng/mL; TGF- $\beta$ 1, 196.8 ng/mL; y IGF-I, 72.8 ng/mL (Weibrich *et al.*, 2003).

Este sistema guarda gran parecido con Curasan PRP<sup>®</sup> Kit, ya que ambos utilizan los mismos elementos consumibles (jeringas, agujas), emplean una centrifuga estándar de laboratorio y se sirven de un mismo procesado de la sangre para la obtención del PRP. Encontramos la principal diferencia en que Friadent-Schütze PRP<sup>®</sup> Kit se vale de tubos

de ensayo de vidrio siliconados en su cara interior, mientras que Curasan PRP<sup>®</sup> Kit emplea tubos Monovette (Sarstedt<sup>®</sup>). También varía la eficiencia de extracción plaquetaria, que en Friadent-Schütze PRP<sup>®</sup> Kit se sitúa sobre el 50%, mientras que en Curasan PRP<sup>®</sup> Kit no alcanza el 18%. Esta diferencia se debe a que las plaquetas se adhieren a la cara interna de los tubos Monovette y por tanto no pueden ser aisladas en el PRP, hecho que queda minimizado gracias a los tubos de ensayo de vidrio siliconados que emplea Friadent-Schütze PRP<sup>®</sup> Kit (Weibrich *et al.*, 2003).

Weibrich y colaboradores (2002) establecieron la concentración de los principales factores de crecimiento del PRP preparado (PDGF-AB; TGF- $\beta$  1; IGF-I) según diferentes metodologías (PRGF<sup>®</sup> System - PCCS<sup>®</sup> Kit – Curasan PRP<sup>®</sup> Kit). Además, intentaron correlacionar el recuento plaquetario y/o leucocitario del PRP con la concentración de factores de crecimiento. El PRGF<sup>®</sup> System exhibe una moderada concentración plaquetaria y excluye la presencia de leucocitos y, de los tres métodos de obtención PRP analizados, es el que consigue menores concentraciones tanto de PDGF-AB como de TGF- $\beta$  1. El protocolo PCCS<sup>®</sup> Kit consigue 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- $\beta$  1 son notablemente superiores en el PRP obtenido con PCCS<sup>®</sup> Kit al obtenido con PRGF<sup>®</sup> System. Por su parte, el Curasan PRP<sup>®</sup> Kit logra una alta concentración plaquetaria y la mayor concentración leucocitaria de los métodos analizados. Asimismo, este método obtiene los niveles más elevados de PDGF-AB en el PRP. La concentración de TGF- $\beta$  1 es superior a la conseguida con el método de Anitua, pero inferior a la que proporciona PCCS<sup>®</sup> Kit. La concentración de IGF-I es muy parecida en las tres metodologías de obtención de PRP estudiadas (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich *et al.*, 2005). La concentración de PDGF-AB y TGF- $\beta$  1 entre los diferentes compuestos plaquetarios pueden ser un reflejo del contenido celular del PRP. De este modo, el PRP obtenido con PCCS<sup>®</sup> Kit, con una mayor concentración en plaquetas, resulta ser el que mayor concentración en TGF- $\beta$  1 posee; mientras que el PRP obtenido con Curasan PRP<sup>®</sup> Kit, con los niveles leucocitarios más altos, contiene las cotas más elevadas de PDGF-AB. Todo ello apunta a un origen principalmente leucocitario de PDGF-AB, y un

origen esencialmente plaquetario de TGF- $\beta$  1. Los valores similares de IGF-I en los tres preparados indican un origen común, como puede ser el propio plasma sanguíneo (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2005). Al comparar el estudio de Appel y colaboradores (2002) con el de Weibrich y colaboradores (2002), encontramos notables diferencias en la determinación de la concentración plaquetaria y en la concentración de factores de crecimiento del PRP, a pesar de emplear la misma metodología para la obtención de PRP (Curasan PRP<sup>®</sup> Kit).

En la comparación que Weibrich y colaboradores (2003) realizaron entre los protocolos de Friadent-Schütze PRP<sup>®</sup> Kit y Smart PReP<sup>®</sup> PRP System concluyeron que este último presentaba un manejo fácil, un procesado veloz de la sangre y un riesgo mínimo de contaminación bacteriana del PRP, además de conseguir unos valores mejores de eficiencia de extracción plaquetaria (Weibrich *et al.*, 2003).

### ***Obtención de PRP mediante sistemas semiautomáticos comerciales***

Después de que Anitua presentara su método de obtención de PRGF, han aparecido distintos dispositivos comerciales semiautomáticos que facilitan la obtención de un concentrado plaquetario en el propio quirófano y empleando un volumen de sangre relativamente pequeño. Estos procedimientos aíslan la capa leucocitaria y las plaquetas existentes en torno a ella, sometiendo a la sangre a una doble centrifugación tras la cual se obtiene un volumen de plasma en el que se agrupan gran parte de las plaquetas comprendidas en la muestra de sangre procesada (Appel *et al.*, 2002, Marlovits *et al.*, 2004, Mazzucco *et al.*, 2008) .

Una gran ventaja de estos dispositivos es que minimizan el riesgo de contaminación bacteriana del PRP en comparación con métodos que emplean una centrífuga en tubo de ensayo (Vasconcelos *et al.*, 2003). Además, el PRP derivado contiene unas concentraciones elevadas plaquetarias, leucocitarias y de factores de crecimiento (Zimmermann *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2003a; Weibrich *et al.*, 2003b; Zimmermann *et al.*, 2003; Eppley *et al.*, 2004). Esta elevada concentración de leucocitos es uno de los puntos de discusión entre los diferentes tipos de PRPs, ya que el papel exacto que juegan los leucocitos contenidos en el PRP

empleado en los tratamientos de reparación-regeneración tisular aún está por determinar. De hecho, hay autores que sostienen que los leucocitos pueden ir en contra de los procesos de reparación-regeneración en ciertos tejidos (Anitua *et al.*, 2004).

Seguidamente, trataremos los principales dispositivos semiautomáticos comerciales para la obtención de PRP.

### **Platelet Concentrate Collection System (PCCS® Kit) (3i-Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA)**

Este sistema consta de una centrífuga modificada que posee un rotor oscilante con cuatro pocillos especialmente diseñados para poder insertar en ellos los consumibles del PCCS® Set, que son unos dispositivos formados por dos bolsas plásticas flexibles interconectadas por una línea con un clamp, y unidas a un soporte plástico rígido. Al mismo tiempo, 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).

Para la preparación del PRP es necesario extraer 60 ml de sangre entera con anticoagulante (ACD-A), que es transferida a la bolsa de plástico del dispositivo consumible a través de la válvula número 1 y, seguidamente, se cierra el clamp de la línea de comunicación entre ambas bolsas. La sangre se centrifuga durante 3 minutos y 45 segundos a 3.000 rpm. A continuación, se abre el clamp para transferir el plasma sobrenadante, que contiene las plaquetas, hacia la segunda bolsa del dispositivo consumible, inyectando aire a través de la válvula número 2 hasta que 1 mL de eritrocitos han pasado a través de la línea de transferencia. Tras cerrar nuevamente el clamp, el conjunto se centrifuga por segunda ocasión durante 13 minutos a 3.000 rpm, con el objetivo de sedimentar las plaquetas en la segunda bolsa. Inyectando aire por la válvula número 3, y tras abrir de nuevo el clamp, logramos pasar el plasma sobrenadante (PPP) hacia la primera bolsa, mientras que en la segunda dejamos el sedimento de plaquetas y alrededor de 5 ml de plasma. Con un suave masaje del



sedimento plaquetario realizado durante unos 3 minutos con los dedos pulgar e índice, las plaquetas son resuspendidas en el plasma residual. Esta suspensión es el PRP, que se transfiere a una jeringa a través de la válvula número 4 (Appel *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich y Kleis, 2002).

Todo este proceso dura unos 30 minutos y permite una concentración plaquetaria de entre 1.100.000 y 2.200.000/ $\mu\text{L}$ , con una eficiencia de extracción plaquetaria que ronda el 50% y una concentración leucocitaria de entre 5.500 y 14.800/ $\mu\text{L}$ . En referencia a los factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido con PCCS<sup>®</sup> Kit, los niveles de PDGF-AB se sitúan entre 156.7 y 251.8 ng/mL, los de TGF- $\beta$ 1 entre 144.7 y 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).

### **Gravitational Platelet Separation (GPS<sup>®</sup> System) (Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany)**

El GPS<sup>®</sup> System consta de una centrífuga de sobremesa y unos tubos de centrifugado especiales de un solo uso, puede ser llevada a cabo en el propio quirófano y tarda, como en el método anterior, unos 30 minutos. Primeramente, en una jeringa de 60 mL, se aspiran 6 mL de anticoagulante (ACD-A) y se completa la jeringa con 54 mL de sangre del paciente. La sangre con el anticoagulante se vierte en los tubos GPS<sup>®</sup>, que son centrifugados a 3.200 rpm durante 12 minutos, logrando separar la sangre en sus diferentes fracciones: los eritrocitos quedan en la parte inferior del tubo; sobre ellos se sitúa una boya de separación; seguidamente, la capa leucocitaria (que contendrá leucocitos y la mayor parte de plaquetas); y en la superficie hallamos el PPP. A continuación, se empuja el émbolo manualmente hacia abajo hasta separar el PPP del PRP. El PPP se extrae mediante una jeringa, a través de una conexión existente en un lateral de la parte superior del tubo, y el último paso consiste en agitar el tubo y aspirar el PRP a través de una conexión en el centro de la tapa del tubo (Marlovits *et al.*, 2004; Saleh y Cox, 2004).

La concentración plaquetaria alcanzada con este protocolo es de aproximadamente 1.600.000/ $\mu\text{L}$  y los niveles leucocitarios de 31.100/ $\mu\text{L}$ , debido al incremento del recuento

de células blancas en el PRP. A excepción del IGF-I, las concentraciones de factores de crecimiento en el PRP obtenido son superiores a las presentes en el plasma sanguíneo: los valores de TGF- $\beta$ 1 se sitúan en 120 ng/mL; 72 ng/mL para IGF-I; 955 pg/mL para VEGF; y 470 pg/mL para EGF (Eppley *et al.*, 2004).

### **Smart PReP<sup>®</sup> System (Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany)**

El Smart PreP<sup>®</sup> System es un protocolo que realiza una doble centrifugación de la sangre y que tiene una duración aproximada de 20 minutos. Además, es un dispositivo que disminuye los posibles errores humanos, ya que resulta fácil de manipular y requiere poco entrenamiento del personal (Weibrich *et al.*, 2003).

Este método se sirve de una centrífuga específica (SMP-1000i<sup>®</sup> Harvest Technologies) con un rotor oscilante que contiene dos pocillos para centrifugar unos dispositivos especiales donde se coloca la sangre del paciente. La empresa suministra unos sets estériles que contienen todo lo necesario para la extracción de sangre (jeringas, agujas) y unos dispositivos especiales para el procesado de la muestra consistente en dos cámaras de plástico unidas e interconectadas entre sí, la "cámara de sangre", donde quedará depositada la sangre; y la "cámara de plasma", en la que hallaremos el PRP resultante del proceso de centrifugación (Weibrich *et al.*, 2003).

Para la obtención del PRP mediante este método se necesitan 52 mL de sangre en mujeres y 48 mL en hombres, y esto se debe a que se trata de un proceso hematocrito-dependiente, y el hematocrito de los varones suele ser más elevado que el de las mujeres (Weibrich *et al.*, 2003). La sangre se extrae con una jeringa de 60 mL que previamente contenga 7 mL de anticoagulante (ACD-A). El contenido de esta jeringa se transfiere a la "cámara de sangre" y, a su vez, en la "cámara de plasma" se inyectan 2 mL de anticoagulante (ACD-A). La centrífuga se equilibra y seguidamente se procede a la doble centrifugación, que dura un total de 12 minutos. De este modo, los eritrocitos quedan ubicados en la cámara de sangre, y en la cámara de plasma se hallarán las plaquetas, los leucocitos y algunos eritrocitos, además del plasma sobrenadante (PPP). Este PPP se aspira hasta dejar 7 ó 10 mL, según el volumen de PRP que se desee

obtener. Precisamente, en este plasma no aspirado se resuspende el sedimento plaquetario, para obtener así el PRP. Por último, el PRP es aspirado del fondo de la cámara de plasma con una jeringa y una cánula (Weibrich *et al.*, 2003).

Con este sistema se obtiene un PRP con una concentración plaquetaria cercana a 1.250.000/ $\mu\text{L}$ , una concentración leucocitaria de 19.261/ $\mu\text{L}$  y una eficiencia en la extracción de plaquetas del 63.4%. Por lo que respecta a los factores de crecimiento presentes en el PRP obtenido, el PDGF-AB alcanza una concentración de 208.3 ng/mL, el TGF- $\beta$ 1 presenta una concentración de 77.2 ng/mL, y IGF-I se sitúa en 91.4 ng/mL (Weibrich *et al.*, 2003).

Recientemente, Harvest Technologies ha presentado la evolución de Smart PreP<sup>®</sup> System, el llamado Smart PreP<sup>®</sup>2 APC<sup>+</sup> System. La principal diferencia entre ambos sistemas se halla en los dispositivos de plástico donde se deposita y procesa la sangre para la obtención del PRP. Los sistemas suministrados por Harvest Technologies han sido registrados como productos terapéuticos (<http://www.harvesttech.com>).

### **Plateltex<sup>®</sup> (Plateltex, Bratislava, Slovakia)**

Esta metodología se lleva a cabo mediante una doble centrifugación, empleando para ello una centrífuga de laboratorio con rotor oscilante 0-90°. La sangre se extrae en tubos de ensayo de 8.0 mL, que contienen ACD-A como anticoagulante, y se somete a una primera centrifugación suave a 180G durante 10 minutos. Tras aspirar el plasma sobrenadante, se procede a un segundo centrifugado, esta vez a 1000G durante 10 minutos, que permitirá la formación de un sedimento plaquetario y la separación del plasma sobrenadante (PPP). Este sistema busca eliminar la cantidad suficiente de PPP para que, al resuspender el sedimento plaquetario, se logre un PRP con una concentración plaquetaria cercana a 2.000.0000/ $\mu\text{L}$  (Mazzucco *et al.*, 2008).

Este sistema alcanza una eficiencia en la extracción plaquetaria cercana al 80%, y proporciona un PRP con una concentración plaquetaria en torno a 1.600.000/ $\mu\text{L}$ . La concentración de PDGF-AB es de 60 ng/mL (Mazzucco *et al.*, 2008).

### **Secquire PRP® System (PPAI Medical, Fort Myers, FL, USA)**

Se trata de otro sistema seguro y rápido. Tras la extracción de la sangre del paciente, convenientemente mezclada con el anticoagulante, se procede al centrifugado, colocando el dispositivo en un contenedor de polipropileno transparente con una graduación para medir volumen. En la tapadera del contenedor hallamos tres puertos: el primero sirve para depositar la sangre en el interior del dispositivo; los otros dos, poseen un fino tubo que va hasta el fondo del contenedor, con uno se extraerá el sedimento de eritrocitos, y con el otro se aspirará el PRP (Figura 7). La sangre quedará dividida en tres fracciones tras ser centrifugada: los eritrocitos, en el fondo del contenedor; la capa leucocitaria, en el medio; y el plasma, en la superficie. Con una jeringa conectada al puerto central, se aspiran los eritrocitos del fondo del contenedor, sin crear turbulencias y respetando la capa leucocitaria. Seguidamente, con otra jeringa colocada en el otro puerto de aspiración, se recoge el plasma existente justo por encima de la capa leucocitaria (PRP) (<http://secquire.com>).



**Figura 7. Secquire PRP® System (<http://www.secquire.com>).**

### **Arthrex ACP® System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)**

Este método busca la obtención de un plasma autólogo rico en plaquetas, denominado "plasma autólogo acondicionado" (ACP). Posee una doble jeringa diseñada para la extracción y centrifugación de la sangre y el aspirado del ACP, todo ello

mediante una única centrifugación. En primer lugar, con la jeringa grande se aspira 1 mL de anticoagulante (ACD-A) para, a continuación, extraer 9 mL de sangre del paciente. Este dispositivo en doble jeringa, se introduce en una centrífuga especialmente diseñada y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. De este modo, los eritrocitos se hallan en el fondo de la jeringa, con el plasma situado justo encima. A continuación, con la jeringa pequeña ubicada dentro de la grande, se aspiran 3 mL de ACP, con atención de no aspirar eritrocitos. Estos 3 mL de plasma son los que se aplican en la zona a tratar.

No existen publicaciones en la literatura científica en las que se reflejen los siguientes datos, pero según informa el folleto de Arthrex ACP<sup>®</sup> System, el ACP obtenido alcanza una concentración plaquetaria de aproximadamente 550.000/ $\mu$ L, sin la presencia de leucocitos. Además, logra multiplicar por 25 la concentración de PDGF-AB (60 ng/mL) y cuadruplicar la de TGF- $\beta$ 1 (145 ng/mL), si se compara con los valores de sangre periférica, mientras que la concentración de IGF-I (125 ng/mL) sufre poca variación con respecto a los niveles existentes en sangre ([www.arthrex.com](http://www.arthrex.com)).

### Otros dispositivos comerciales

Otros dispositivos comerciales semiautomáticos para la obtención de PRP autólogo son: Vivostat<sup>®</sup> PRF Preparation Kit (Vivolution A/S, Birkerød, Denmark) (Leisner *et al.*, 2006). Fibrinet<sup>®</sup> Autologous Fibrin & Platelet System (Cascade Medical Enterprises Ltd, Plymouth, UK) (Leisner *et al.*, 2006; Mazzucco *et al.*, 2009). Regen PRP<sup>®</sup> Kit (RegenLab, Mollens-VD, CH) (Mazzucco *et al.*, 2009).

A continuación y a modo de resumen en la Tabla 2 se encuentra la comparación de los diferentes sistemas para la obtención de PRP, donde se muestran algunas características cualitativas y cuantitativas de los diferentes PRPs comercializados y descritos en la bibliografía.

**Tabla 2: Métodos de obtención de PRP. (\*) Referencias bibliográficas a lo largo del texto.**

MÉTODO	PLAQUETAS (x10 <sup>3</sup> /mL)	LEUCOCITOS (x10 <sup>3</sup> /mL)	PDGF-AB (nG/mL)	TGF- B 1 (nG/mL)	IGF-I (nG/mL)	VOLUMEN SANGRE (mL)
AFÉRESIS	750 - 1500	0.16 – 0.18	125 - 190	133 - 268	86	> 450
PRGF -ENDORET®	500	≈ 0	47.0	73.3	78.0	10 – 20
LANDESBURG	550 - 900	N/D	39.8	42	N/D	5
PCSS®	1100-2200	5.5 – 14.8	156.7-251	144-467	78 – 91	54
CURASAN PRP®	1000 -2500	14.8 – 33.1	233-314.1	79.7-499	69-101	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
FRIADENT- SCHÜTZE PRP®	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®	430	N/D	140	N/D	N/D	10

*N/D = No determinado*

## Uso del PRP en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas

Fue a mediados de los años 90 cuando apareció la aplicación terapéutica del PRP. Los autores Tayapongsak, Whitman y Marx, junto a sus respectivos equipos de colaboración, utilizaron este concentrado plaquetario autólogo en forma gelificada en cirugía reconstructiva oral y maxilofacial. Este grupo de pioneros buscaban 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 no sólo lograba este objetivo, sino que también optimizaba el proceso de curación debido a los factores de crecimiento que aportaba (Tayapongsak *et al.*, 1994; Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998).

Los primeros resultados animaron a otros autores a continuar con el uso de PRP dentro del campo de la cirugía oral y maxilofacial. Poco después, otras ramas de la Medicina y la Cirugía (como la cirugía plástica o cardiovascular) empezaron a mostrar interés por el empleo terapéutico del PRP, aumentando exponencialmente sus aplicaciones en la última década. Aunque el empleo del PRP ha vivido un mayor desarrollo en los últimos años en el campo de la cirugía ortopédica y traumatológica. El objetivo esencial de la aplicación del PRP ha sido promover y mejorar el proceso de cicatrización en los diferentes tejidos, utilizándose en numerosas ocasiones junto con otros tratamientos (Floryan y Berghoff, 2004; Sampson *et al.*, 2008).

### **Cartílago y lesiones articulares**

En las últimas décadas, se ha incrementado significativamente la incidencia de lesiones condrales debido a la creciente participación de la población en actividades deportivas (Kon *et al.*, 2011). El cartílago tiene una capacidad de regeneración limitada y su tratamiento supone un auténtico desafío para el cirujano. Habitualmente, estos tratamientos tan sólo alcanzan mejoras clínicas o funcionales temporales (Kon *et al.*, 2011). En los últimos años, se ha propuesto el empleo del PRP como tratamiento adyuvante en las lesiones condrales, debido al creciente interés en torno al empleo del PRP en el manejo de otras enfermedades ortopédicas. El papel fisiológico que juegan las plaquetas en la reparación tisular es fundamental para establecer el concepto de aplicación del PRP para mejorar la reparación del cartílago y los procesos patológicos que afectan a la articulación. La homeostasis y el funcionamiento del cartílago articular están regulados por numerosos factores de crecimiento que actúan de manera coordinada (Fortier *et al.*, 2011), y su aplicación terapéutica puede suponer un incremento en la reparación de defectos cartilaginosos focales o en situaciones donde el daño del cartílago sea mucho más extenso y difuso, como en la osteoartritis (Fortier *et al.*, 2011). Diversas investigaciones *in vivo* e *in vitro* han desplegado una larga lista de factores de crecimiento decisivos en el proceso de reparación del cartílago, ya sea a través del estímulo de la síntesis de proteoglicanos, agrecanos 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). Los factores de crecimiento más destacados son TGF- $\beta$ 1, BMP-2, BMP-7, IGF-I, FGF, y PDGF (Fortier *et al.*, 2011), y se encuentran principalmente en el interior de los gránulos alfa de las plaquetas (Anitua *et al.*, 2004). Algunos de estos factores de crecimiento han sido estudiados de manera independiente, aunque parece poco probable que el efecto individual conduzca a la obtención de un efecto beneficioso global sobre la salud de la articulación, debido a que el proceso de reparación del cartílago es un proceso complejo en el que, generalmente, los diferentes factores de crecimiento actúan entre sí (Fortier *et al.*, 2011). El PRP puede resultar una opción terapéutica interesante para tratar procesos que afectan al cartílago articular debido a que contiene una mezcla compleja de factores de crecimiento autólogos en un equilibrio fisiológico. Además, una vez que forma el coágulo, puede formar un entramado tridimensional que rellena el defecto cartilaginoso dando lugar al proceso de neocondrogénesis *in situ* (Fortier *et al.*, 2011).

### **Estudios experimentales**

Existen pocas publicaciones que profundicen en el empleo del PRP con la finalidad de reparar el cartílago, ya que es un concepto relativamente nuevo. Los cultivos de condrocitos expuestos a PRP provocan un aumento en la proliferación celular y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular del cartílago, como proteoglicanos o colágeno de tipo II (Akeda *et al.*, 2006). Mishra y colaboradores (2009) hallaron que la diferenciación condrogénica de cultivos de células mesenquimales era causada por una exposición al PRP. En otro estudio también se localizó el efecto proliferativo que el PRP ejercía tanto sobre cultivo de condrocitos como de células mesenquimales (Drengk *et al.*, 2009). En su estudio, Anitua y colaboradores (2007b) observaron que los cultivos de sinoviocitos procedentes de individuos con osteoartritis expuestos a PRP originaban un aumento en la síntesis y excreción de ácido hialurónico en comparación con los controles, apuntando que el PRP podría ser usado potencialmente como una fuente de condroprotección y de lubricación articular. Gaissmaier y colaboradores (2005) analizaron el efecto del sobrenadante de plaquetas humanas en cultivo de condrocitos

articulares humanos, y descubrieron un incremento en la proliferación de los condrocitos. En una investigación similar que evaluaba el efecto del PRP sobre cultivo de condrocitos humanos procedentes de individuos con osteoartrosis, se advirtió que el PRP causó una disminución en la expresión génica de varias sustancias proinflamatorias que favorecían la degradación de la matriz cartilaginosa y fomentaban el progreso de la enfermedad articular (van Buul *et al.*, 2011).

Con el fin de examinar el efecto del PRGF en el proceso de reparación del cartílago, también se han realizado varios estudios *in vivo* sobre modelos animales con defectos cartilaginosos inducidos. En uno de los primeros trabajos realizados en esta dirección, Serra y Soler (2006) utilizaron un modelo experimental de defecto condral de espesor completo en el cóndilo femoral de conejos. En su trabajo de Tesis Doctoral, Soler comprobó que la administración intraarticular de PRGF resultó efectiva para la reparación del defecto condral, rebajando el tiempo de cicatrización obtenido por tratamientos convencionales, como el condroitín sulfato o el ácido hialurónico, y obteniendo un efecto sinérgico entre PRGF y ácido hialurónico, logrando un beneficio más pronunciado mediante inyecciones conjuntas (Soler, 2006). Por su parte, Serra describió en su Tesis Doctoral que el tejido de reparación creado tras la administración intraarticular de PRGF tenía unas características histológicas muy parecidas a las del cartílago hialino, y unas propiedades biomecánicas equivalentes a las de un material viscoelástico y muy similares a las del cartílago articular sano (Serra, 2006; Serra *et al.*, 2013).

En un estudio, Sun y colaboradores (2010) crearon un defecto osteocondral sobre un modelo experimental en conejo, estableciendo tres grupos de estudio: en el primero, el defecto quedó sin tratar; en el segundo, colocaron un transportador de ácido poli-lactoglicólico; en el último grupo, colocaron ese mismo transportador junto con PRP, y fue el que presentó un mayor grado de regeneración cartilaginosa, además de un incremento en la producción de glicosaminoglicanos en la matriz extracelular. En un modelo de defecto condral en conejo, Wu y colaboradores (2007) comprobaron que las inyecciones intraarticulares de PRP favorecían el crecimiento de los condrocitos y la posterior formación de nuevo tejido cartilaginoso.

Estudios recientes sobre modelos de defecto condral en oveja han desvelado resultados dispares. En su estudio, Milano y colaboradores (2010) advirtieron que el tratamiento con PRP provocó una mejora notable tanto en la apariencia macroscópica del cartílago reparado como en sus propiedades biomecánicas. Además, resolvieron que para el tratamiento intraarticular de estas lesiones resultaba más beneficiosa la aplicación del PRP en forma de gel que en forma líquida. Por su parte, Kon y colaboradores (2010) toparon con un empeoramiento del proceso regenerativo al añadir PRP a una nueva matriz de nanopartículas de colágeno-hidroxiapatita que se colocaba sobre el defecto condral.

### *Estudios clínicos*

En el año 2003, Sánchez y colaboradores realizaron el primer estudio clínico que describió el tratamiento de problemas condrales (Sánchez *et al.*, 2003), un caso clínico en el que emplearon PRGF para tratar una avulsión de cartílago en un futbolista, logrando una cicatrización del cartílago completa y rápida, con un retorno prematuro a la actividad física (Sánchez *et al.*, 2003). En estudios posteriores, Sánchez y colaboradores han publicado que para el tratamiento de la osteoartrosis de rodilla con PRGF se deben aplicar tres inyecciones semanales; por su parte, Giannini y colaboradores han aplicado PRP de manera intraarticular. En ambos casos, los resultados apuntan a un mejor control del dolor y a una mejora de la actividad física (Sánchez *et al.*, 2008; Giannini *et al.*, 2008).

Kon y colaboradores (2009) publicaron una investigación llevada a cabo sobre 100 pacientes (115 rodillas) tratados con cuatro inyecciones intraarticulares de PRP administradas cada 21 días. En el estudio se incluyeron pacientes con lesiones condrales degenerativas, y con procesos de osteoartrosis tanto incipientes como avanzados. Los resultados apuntaban a que la administración de PRP era segura, reducía el dolor y mejoraba la funcionalidad y calidad de vida de los pacientes con patología articular degenerativa. Se revelaron algunos efectos adversos menores que no se alargaron más de dos días, como un dolor moderado o una efusión articular después de la inyección. También se señaló que el efecto tenía una duración media de nueve meses, ya que se

observó una tendencia al empeoramiento transcurridos uno y dos años del tratamiento, aunque 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 los últimos años, se han llevado a cabo estudios similares en osteoartrosis de rodilla con resultados que apuntan en la misma dirección. Sampson y colaboradores en 2010, aplicando un tratamiento intraarticular de PRP, Wang-Saegusa y colaboradores en 2011, con infiltraciones intraarticulares de PRGF, y Spaková y colaboradores en 2012, con inyecciones intraarticulares de PRP, han obtenido en sus investigaciones una mejoría en la funcionalidad de la articulación, sin que se detectasen efectos adversos.

Varios autores han planteado que el PRP podría ser utilizado como transportador de condrocitos, y que esta unión podría ser inyectada de manera mínimamente invasiva justo en la zona del defecto condral. Una vez gelificado, el PRP mantendría las células justo en el lugar de la lesión y, al mismo tiempo, proporcionaría una fuente autóloga de factores de crecimiento capaces de fomentar los procesos de reparación cartilaginosa (Wu *et al.*, 2009).

A día de hoy, todavía necesitamos más estudios de investigación que aporten luz sobre la utilidad clínica de estos productos para tratar problemas articulares, a pesar de que el empleo de factores de crecimiento para el tratamiento de problemas de cartílago o de osteoartritis parece prometedor. Asimismo, sería necesario realizar ensayos clínicos aleatorios, prospectivos, controlados, multicéntricos y a doble ciego con el objetivo de aclarar si realmente estas terapias biológicas con PRP son de utilidad en el tratamiento de trastornos articulares (Foster *et al.*, 2009; Fortier *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2011).

## **Lesiones ligamentosas**

La rodilla es la articulación que padece lesiones relacionadas con el deporte con más frecuencia, afectando principalmente a sus estructuras ligamentosas, como es el caso del ligamento cruzado anterior (Kon *et al.*, 2011), cuya lesión, ya sea por rotura total o parcial, constituye una entidad clínica de gran trascendencia en traumatología y

ortopedia, y en la mayor parte de las ocasiones requiere tratamiento quirúrgico, acompañado de un largo periodo de rehabilitación. Esta lesión puede comprometer seriamente la vida deportiva del atleta, ya que puede causar una disminución permanente de la funcionalidad de la rodilla, ocasionando graves pérdidas de rendimiento. Además, la rodilla acabará por desarrollar un proceso de osteoartrosis en gran parte de los individuos lesionados (Kon *et al.*, 2011). Sólo en EEUU se operan más de 100.000 ligamentos cruzados cada año, con un coste total anual cercano a los mil millones de dólares (Sánchez *et al.*, 2009c).

La reconstrucción del ligamento cruzado anterior se realiza, en medicina humana, mediante la sustitución del ligamento roto por un autoinjerto de tendón. La prevención del deterioro del autoinjerto de tendón y la aceleración del proceso de ligamentización (transformación del tendón en una estructura similar al ligamento) son los principales objetivos de las nuevas terapias biológicas (Kon *et al.*, 2011). Conseguir un anclaje seguro y fuerte del injerto, que permita una vuelta precoz a la actividad física, es uno de los mayores retos en la cirugía de reconstrucción (Kon *et al.*, 2011). El injerto de hueso-tendón rotuliano-hueso es uno de los más utilizados, ya que presenta un muy buen anclaje, debido a que se produce la osteointegración de los extremos del injerto sobre unos túneles previamente perforados en el fémur y tibia. Pero este tipo de injerto ha sido ligado con problemas de morbilidad de la zona donante. Por ello, algunos autores prefieren usar un injerto tendinoso de los isquiotibiales, con la desventaja de que su anclaje debe producirse directamente entre tendón y hueso, siendo más lento y albergando más posibilidades de fallar que cuando este anclaje se produce entre hueso y hueso (Kon *et al.*, 2011). A día de hoy, se emplean injertos tanto de hueso-tendón rotuliano-hueso como de tendón isquiotibial, y en ambos tipos de cirugías, se utiliza el PRP para intentar conseguir una cicatrización más rápida de los extremos del injerto con el hueso (hueso-hueso y tendón-hueso, respectivamente), y una ligamentización más veloz y eficaz del injerto empleado para sustituir al ligamento roto (Mei-Dan *et al.*, 2010a).

El ligamento colateral medial de la rodilla es otra estructura que se lesiona con relativa frecuencia, y tiene gran importancia entre la población de atletas, ya que

pueden provocar pérdidas de rendimiento deportivo. El uso de PRP está dirigido a acelerar y mejorar el proceso de cicatrización de este ligamento, disminuyendo el tiempo de recuperación y rehabilitación, incrementando el bienestar del paciente, y mejorando la estabilidad de la rodilla (Kon *et al.*, 2011).

### *Estudios experimentales*

Antes del empleo del PRP o incluso de la técnica quirúrgica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior, varios estudios experimentales evaluaron el efecto de algunos factores de crecimiento exógenos sobre el proceso de cicatrización ligamentosa. De esta forma, un grupo de investigación analizó el efecto de la aplicación conjunta de TGF- $\beta$ 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. Los autores advirtieron que en los injertos tratados con factores de crecimiento se inhibía el deterioro de sus propiedades biomecánicas (Sakai *et al.*, 2002; Azuma *et al.*, 2003). Asimismo, Yasuda y colaboradores (2004) aplicaron una combinación de TGF- $\beta$ 1 y EGF exógenos sobre el injerto hueso-tendón rotuliano-hueso en un modelo de reconstrucción del ligamento cruzado anterior en perro, y observaron una mejoría tanto en las propiedades estructurales como en el aspecto histológico del autoinjerto transcurridos tres meses de la cirugía (Yasuda *et al.*, 2004).

Murray y colaboradores (2006), pioneros en el uso del PRP para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior, realizaron un defecto central en el ligamento cruzado anterior en un modelo animal y lo rellenaron usando una matriz de colágeno-PRP. Observaron un mayor porcentaje de relleno del defecto y unas mejores propiedades biomecánicas que en los controles. Este hallazgo sugería que esa matriz con PRP podría incrementar el proceso de cicatrización del ligamento (Murray *et al.*, 2006). Los mismos resultados se obtuvieron en un modelo porcino de rotura del ligamento cruzado anterior, tratado con un hidrogel de colágeno-PRP (Murray *et al.*, 2007a). No obstante, este mismo grupo de investigación ha observado que el uso de PRP sin la combinación con una matriz de colágeno resulta insuficiente para mejorar las propiedades

biomecánicas del ligamento reparado (Murray *et al.*, 2009). Mastrangelo y colaboradores (2011), en un modelo porcino similar al descrito anteriormente, hallaron que con concentraciones plaquetarias más bajas (3 veces en comparación con 5 veces los niveles basales) se mantenían los efectos beneficiosos que esta matriz colágeno-PRP ejercía sobre las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados (Mastrangelo *et al.*, 2011).

En 2007, Murray y colaboradores realizaron un interesante estudio en el que compararon la cicatrización de ligamentos extraarticulares (ligamento colateral medial de la rodilla) y de ligamentos intraarticulares (ligamento cruzado anterior). Crearon defectos quirúrgicos en dichos ligamentos sobre un modelo experimental canino, y advirtieron una cicatrización más eficaz en los ligamentos extraarticulares que en los ligamentos intraarticulares. Este hecho puede ser debido a que en los ligamentos intraarticulares no exista una matriz que mantenga unidos los bordes del ligamento lesionado, pero sí hallamos fibrinolisinasa intraarticulares que impiden la formación de un coágulo de fibrina para rellenar el defecto (Murray *et al.*, 2007b). También observaron que el empleo de un hidrogel de colágeno-PRP en la zona de lesión provocaba un incremento en el llenado del defecto ligamentoso, con un tejido de reparación muy parejo al que se encontró en los defectos creados sobre ligamentos extraarticulares. Este hecho apunta a que el uso del hidrogel mejora el proceso de cicatrización de lesiones ligamentosas intraarticulares, equiparando el proceso con el de los ligamentos extraarticulares (Murray *et al.*, 2007b).

Recientemente, en un estudio de la reconstrucción del ligamento cruzado anterior en perros Beagle se valoró el efecto del PRP en los patrones de expresión génica, observándose que el PRP altera la expresión de algunos genes diana, especialmente durante los momentos iniciales de la remodelación del injerto (Xie *et al.*, 2013).

Con respecto a la lesión del ligamento colateral medial de la rodilla, el empleo de factores de crecimiento no ha proporcionado resultados claros. Estudios sobre un modelo de rotura del ligamento colateral medial de conejo se resolvieron de manera dispar. Hildebrand y colaboradores (1998) observaron una mejoría en las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados con PDGF (Hildebrand *et al.*, 1998), mientras

que Spindler y colaboradores expusieron que la aplicación única de una combinación de PDGF y TGF- $\beta$ 2 no causó ningún cambio destacable en las propiedades biomecánicas de los ligamentos tratados. Observaron incluso que la administración continuada de TGF- $\beta$ 2 degradaba los parámetros mecánicos de los ligamentos tratados (Spindler *et al.*, 2002; Spindler *et al.*, 2003).

### *Estudios clínicos*

El Dr. Mikel Sánchez fue pionero en el empleo de PRGF en la reconstrucción quirúrgica del ligamento cruzado anterior en casos clínicos y, junto con sus colaboradores, describieron en 2003 como el ligamento roto era eliminado mediante artroscopia y era reconstruido con un autoinjerto de tendón previamente tratado con PRGF. De modo que publicaron una serie de 50 casos retrospectivos donde registraban un aumento de la cicatrización y una disminución de las complicaciones, además de mejorar la funcionalidad de los pacientes (Sánchez *et al.*, 2003). El autoinjerto estaba impregnado de factores de crecimiento liberados por las plaquetas, favoreciendo así la neovascularización y la ligamentización, esenciales para que el autoinjerto reprodujese las funciones biomecánicas del ligamento sustituido (Anitua *et al.*, 2006a). Estos autores han divulgado recientemente un estudio de casos-control donde los injertos tendinosos de isquiotibial fueron tratados con PRGF, y en los que realizaron una biopsia durante una artroscopia de revisión tras varios meses de la cirugía. Las artroscopias revelaron un mejor aspecto de los injertos tratados con PRGF que los no tratados, y las biopsias evidenciaron un mayor grado de ligamentización en los injertos tratados con PRGF y un aspecto histológico más parecido al del ligamento normal (Sánchez *et al.*, 2010).

Radice y colaboradores (2010) confirmaron mediante resonancia magnética los hallazgos de Sánchez y colaboradores, realizando un estudio de casos-control con 50 pacientes sometidos a cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior. La resonancia magnética mostró que los injertos tratados con PRP necesitaban un 48% menos de tiempo para lograr el mismo aspecto en resonancia magnética que los injertos sin tratar, lo que hacía entrever el potencial de aceleración de los tratamientos con PRP en el proceso de ligamentización del injerto. En su estudio, Orrego y



colaboradores (2008) comprobaron que los injertos de tendón usados para la reconstrucción del ligamento en los que se empleó PRP presentaban un mejor proceso de maduración a los seis meses de la cirugía. Por su parte, Vogrin y colaboradores (2010) presentaron 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. Mediante resonancia magnética de contraste, se cuantificó el grado de revascularización del injerto tendinoso en la zona osteoligamentosa a nivel del túnel óseo y en la zona ligamentosa a nivel intraarticular. Los individuos tratados con PRP presentaban un mayor grado de revascularización en la zona osteoligamentosa del injerto que los no tratados. Sin embargo, se toparon con que la zona ligamentosa intraarticular no se revascularizaba en ninguno de los dos grupos (Vogrin *et al.*, 2010).

En otro estudio en el que 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, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los casos tratados con PRP y los que no lo fueron (50 pacientes por grupo) tras un seguimiento de dos años, ni en términos inflamatorios, ni tras la resonancia magnética (Valenti Nin *et al.*, 2009). En otro estudio clínico prospectivo, aleatorio y controlado, se analizó el efecto de la aplicación de PRP en la reconstrucción quirúrgica del ligamento cruzado anterior, usando en este caso un autoinjerto de tendón isquiotibial. Los autores emplearon 40 pacientes, divididos aleatoriamente en 4 grupos de estudio. En un grupo no se administró PRP, en otro grupo se colocó PRP en el túnel femoral, en otro 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. Transcurridos tres meses de la cirugía, y con el fin de valorar el grado de fusión en la interfase tendón-hueso del túnel femoral, todos los pacientes se sometieron a una resonancia magnética de rodilla. Los autores no hallaron diferencias en la intensidad de la señal de resonancia magnética entre ninguno de los grupos (Silva y Sampaio, 2009). Ventura y colaboradores en 2005 y Figueroa y colaboradores en 2010, en sus respectivos estudios, tampoco encontraron diferencias significativas ni clínicas ni funcionales con la

aplicación de PRP en la reconstrucción del ligamento cruzado anterior mediante injerto de isquiotibial.

La disparidad de resultados que encontramos entre los diferentes estudios descritos puede ser debida a las diversas metodologías de obtención del PRP, que provocan una variación en su composición celular y plaquetaria, y en su concentración de factores de crecimiento. Podríamos hallar otra explicación en las diferentes pautas de administración del PRP que se han seguido (Figueroa *et al.*, 2010). De modo que, al no existir ningún protocolo ni metodología de aplicación definidos, resulta complicado saber con certeza la eficacia de la aplicación de PRP en la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior.

En el ámbito de la medicina deportiva, el uso del PRP para el tratamiento de lesiones ligamentosas agudas ha ganado popularidad. Dos importantes especialistas en lesiones deportivas, el Dr. Mandelbaum y el Dr. Gerhardt, han realizado un estudio no publicado sobre un grupo de 22 futbolistas profesionales tratados con una aplicación de PRP dentro de las 72 horas posteriores tras sufrir una lesión aguda del ligamento colateral medial de la rodilla, y han observado que los individuos tratados con PRP regresaron a la actividad deportiva un 27% antes que los individuos del grupo control, que siguieron un tratamiento convencional (Foster *et al.*, 2009).

Mei-Dan y colaboradores han observado un retorno más rápido a la actividad física en deportistas profesionales con lesiones en el ligamento tibioperoneo anterior tratadas con inyecciones ecoguiadas de PRP (Mei-Dan *et al.*, 2010a). Los mismos autores han publicado el caso clínico de un judoca olímpico que ganó la medalla de oro del Campeonato del Mundo, transcurridos tan sólo seis meses de padecer una lesión en los ligamentos colaterales mediales del codo, tratado con dos aplicaciones de PRP (Mei-Dan *et al.*, 2010b).

Los mecanismos de cicatrización del ligamento son extraordinariamente complejos y, en gran parte, desconocidos. Algunos factores de crecimiento pueden resultar útiles en una determinada fase de la cicatrización, pero no así en otras etapas (Paoloni *et al.*, 2011). La administración de PRP sobre un ligamento ofrece un gran número de sustancias bioactivas repentinamente y en concentración variable, pero se desconocen

buena parte de los mecanismos biológicos que desencadena esta aplicación. A pesar de que encontramos estudios experimentales sobre modelos animales que muestran un efecto beneficioso, 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).

## Lesiones óseas

Sólo en los Estados Unidos se producen más de seis millones de fracturas, de las que entre un 10 y un 15 % sufren trastornos de la cicatrización ósea que originan dolor y molestias. Por ello, se busca desarrollar alternativas para mejorar la cicatrización ósea y se persigue la creación de sustitutos óseos que sean biológicamente compatibles, no tóxicos, que proporcionen un soporte físico sobre el cual se produzca angiogénesis y crecimiento de nuevo hueso, que sean reabsorbibles, microporosos y fáciles de manipular, además de tener propiedades osteoinductivas y osteoconductoras (Anitua *et al.*, 2006a). El empleo del PRP puede resultar muy eficaz en procedimientos que buscan la regeneración ósea, ya que ayuda a completar estas propiedades.

Tras la activación del PRP, las plaquetas liberan una gran cantidad de sustancias que ejercen un papel esencial en el proceso de cicatrización ósea: factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1, PDGF, IGF, o proteínas como la trombospondina y la osteonectina (Anitua *et al.*, 2006a). Las plaquetas existentes en el hematoma de la fractura marcan el inicio de la regeneración ósea con la liberación tanto de PDGF, encargado de estimular la mitogénesis de los osteoblastos del endostio y periostio y de promover la formación de yemas capilares hacia la zona lesionada en los capilares adyacentes, como de TGF- $\beta$ 1, que activa a los fibroblastos e incita la proliferación de los osteoblastos. Los fibroblastos forman la matriz extracelular de colágeno, utilizada como armazón para el crecimiento capilar y posterior osteogénesis. Los factores de crecimiento estimulan la celularidad en el área de reparación. Mientras las plaquetas alcanzan el final de su ciclo vital, los macrófagos, procedentes del efecto quimiotáctico de determinados factores de crecimiento secretados por las plaquetas, son los principales responsables del proceso

de reparación y de los procesos de comunicación intercelular gracias a la síntesis de nuevos factores de crecimiento (Mehta y Watson, 2008).

Para una buena regeneración del hueso, además de un correcto proceso de angiogénesis, es necesario que exista un adecuado aporte sanguíneo local (Carano y Filvaroff, 2003), ya que un desarrollo inadecuado de los vasos sanguíneos puede causar una disminución en la formación de hueso (Glowacki, 1998). El PRP aglutina tanto sustancias angiogénicas, por ejemplo el VEGF, como proteínas anti-angiogénicas, tales como el factor plaquetario-4 (PF-4) y las endostatinas. Para que un correcto proceso de neovascularización del tejido reparado, resulta crucial el equilibrio entre ambos tipos de sustancias (Anitua *et al.*, 2006a).

### *Estudios experimentales*

Han y colaboradores (2009) analizaron el efecto del PRP combinado con injerto óseo, tanto *in vivo* como *in vitro*, en una investigación que giraba en torno a la idea de usar el PRP como una fuente autóloga de factores de crecimiento capaz de incrementar la calidad y la cantidad de hueso neoformado.

Dentro del campo de la cirugía oral y maxilofacial se han llevado a cabo los primeros estudios *in vivo* sobre la acción del PRP en la cicatrización ósea. Marx y colaboradores (1998) examinaron el efecto del PRP combinado con injerto de esponjosa en un modelo experimental de reconstrucción de defectos mandibulares, y determinaron que se producía una cicatrización ósea más rápida y una formación de hueso más denso (Marx *et al.*, 1998). La acción combinada del PRP junto con sustitutos óseos, ya sea orgánicos o inorgánicos, logró una mejora significativa en la manipulación y adaptación del injerto a la zona del defecto de hueso, merced a que la fibrina actúa como pegamento biológico y mantiene ligadas las partículas de sustituto óseo (Anitua *et al.*, 2006a). En otros estudios se comprobó que la adición de PRP a xenoinjerto (Aghaloo *et al.*, 2004) y la utilización de fostato  $\beta$ -tricalcico mejoraron la formación de hueso en la cicatrización ósea (Suba *et al.*, 2004). No obstante, hay estudios que señalan la eficacia limitada o incluso negativa del PRP en combinación con ciertos transportadores. En un modelo

experimental sobre ratón inmunocomprometido, el PRP presentó un efecto inhibitor de la osteoinductividad de la matriz ósea desmineralizada (Ranly *et al.*, 2007).

Simman y colaboradores (2008) emplearon PRP sobre un modelo experimental de fractura de fémur en ratas, advirtiendo una aceleración en la cicatrización ósea, debido a una modulación de la expresión génica del TGF- $\beta$ 1 y del BMP-2. Por su parte, Gandhi y colaboradores (2006) administraron de manera percutánea PRP en el callo de fractura en una línea de ratas Wistar con diabetes mellitus, un tipo de ratas con una menor expresión de factores de crecimiento en el foco de fractura, obteniendo una mejora en la cicatrización y una formación del tejido óseo histológicamente muy similar al de las ratas normales.

En un estudio sobre la regeneración ósea en un modelo experimental en conejos, Weibrich y colaboradores (2004) demostraron que para conseguir un efecto biológico beneficioso era necesaria una concentración plaquetaria en torno a 1.000.000/ $\mu$ L. Mayores concentraciones inhibieron la regeneración ósea, mientras que concentraciones menores únicamente lograron un beneficio subóptimo.

Varios estudios han demostrado el efecto positivo que tiene el PRP mezclado con injertos autólogos de hueso (Kim *et al.*, 2001) y sustituto óseo inorgánico en el tratamiento de defectos óseos en conejos (Kasten *et al.*, 2008).

La aplicación de PRP junto con injerto óseo autólogo también mostró efectos positivos sobre un modelo experimental de defecto mandibular en cabras (Fennis *et al.*, 2002). Por contra, Mooren y colaboradores (2007) no encontraron diferencias histológicas entre el uso de injerto óseo y el uso del injerto combinado con PRP, en un modelo experimental de defecto óseo de tamaño crítico en el hueso frontal de cabras (Mooren *et al.*, 2007).

La eficacia del PRP en la cicatrización ósea ha sido puesta en duda en diversos estudios en los que se ha usado el perro como animal de experimentación. Tanto Jensen y colaboradores como Rabillard y colaboradores no han encontrado en sus respectivos estudios un incremento significativo en el proceso de regeneración ósea con el empleo de PRP (Jensen *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005; Rabillard *et al.*, 2009).

Del mismo modo que en casos anteriores, también se ha estudiado el efecto del PRP en la regeneración ósea en ovejas, con resultados poco concluyentes (Sarkar *et al.*, 2006), y en mini-pigs, con resultados positivos en la combinación de PRP tanto con injerto óseo autólogo (Hakimi *et al.*, 2010) como con gránulos de fosfato de calcio (Jungbluth *et al.*, 2010).

En la actualidad, el papel que el PRP puede desarrollar en la cicatrización ósea continúa siendo un campo muy fértil desde el punto de vista de la investigación. Como acabamos de comprobar, existen estudios experimentales que muestran que el empleo de PRP puede resultar muy prometedor pero, al mismo tiempo, hallamos otros estudios en los que este efecto beneficioso no queda demostrado. Algunos autores han sugerido que esta disparidad de resultados es debida, en parte, a la gran variedad de métodos de preparación del PRP que se han utilizado en los diferentes estudios (Anitua *et al.*, 2006a; Intini, 2009).

### *Estudios clínicos*

El efecto del PRP en la cicatrización ósea, en problemas ortopédicos, en cirugía espinal, y especialmente en el campo de la en cirugía oral y maxilofacial ha sido analizado en diversos estudios clínicos. De hecho, es una práctica habitual usar el PRP junto 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).

Uno de los principales usos clínicos del PRP se lleva a cabo en los procesos de no-uniión ósea, circunstancia que complica el tratamiento y que tiene lugar cuando cesa el proceso cicatricial normal del hueso sin que se llegue a producir la unión ósea (Sánchez *et al.*, 2009b). El primer estudio en esta dirección fue el de Eppley y colaboradores, los cuales determinaron que, los niveles de PDGF y TGF- $\beta$  en el hematoma fracturario eran inferiores en los 7 pacientes con no-uniión que en los 24 pacientes con fracturas frescas. Tras el procedimiento quirúrgico de revisión de los casos con no-uniión se aplicó PRP en el foco de lesión, y se observó una cicatrización ósea a las 8,5 semanas del tratamiento. A pesar de que el estudio no fue ni aleatorio ni prospectivo, proporciona evidencias que

apoyan el empleo de PRP en casos de no-uni6n (Eppley *et al.*, 2004). Estudios sobre la aplicaci6n de PRP con autoinjerto de esponjosa, y en cirugía electiva de fusi6n 6sea, tambi6n se han obtenido resultados satisfactorios con esta terapia (Bibbo *et al.*, 2005; Gandhi *et al.*, 2005).

Un estudio clínico prospectivo evalu6 el efecto de la inyecci6n de PRP en 20 pacientes que presentaban no-uni6n atr6fica. Tras estabilizar las no-uniones mediante el uso de un fijador externo unilateral, se aplic6 una inyecci6n percutánea de PRP en el foco de lesi6n. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el tiempo medio de consolidaci6n radiográfico entre los individuos tratados con PRP y los controles (Mariconda *et al.*, 2008). Por contra, otros estudios concluyen que para conseguir la cicatrizaci6n 6sea en casos clínicos de no-uni6n la aplicaci6n percutánea de PRP es una opci6n terapéutica interesante (Bielecki *et al.*, 2008). Otros estudios se han centrado en la aplicaci6n de PRGF en procesos de no-uni6n 6sea, obteniendo en ambos casos resultados satisfactorios (Sánchez *et al.*, 2009b; Seijas *et al.*, 2010).

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que existe una clara asociaci6n entre diabetes mellitus y trastornos de la cicatrizaci6n 6sea (Alsousou *et al.*, 2009). En un estudio clínico se inyect6 de manera percutánea PRP en el foco de fractura de pacientes diabéticos, consiguiendo niveles de cicatrizaci6n 6sea comparables a los de individuos normales, si bien sus propiedades biomecánicas a largo plazo s6lo se consiguieron normalizar parcialmente (Grant *et al.*, 2005).

En un estudio clínico aleatorio y controlado, elaborado por Dallari y colaboradores (2006), se evalu6 la eficacia del PRP tras una osteotomía proximal de la tibia en pacientes con osteoartrosis de rodilla. Los estudios radiogríficos para evaluar la osteointegraci6n fueron mejores en los grupos en los que se aplic6 PRP en todos los tiempos. Tambi6n se comprob6, tras una biopsia, un notable aumento en la formaci6n 6sea en los pacientes tratados con PRP, aunque no se hallaron diferencias clínicas ni funcionales entre los diferentes grupos de estudio un a6o despu6s (Dallari *et al.*, 2006).

En un estudio sobre los procedimientos de osteogénesis por distracci6n en casos clínicos en los que era necesaria la elongaci6n de extremidades, concluyeron que el tratamiento mediante una combinaci6n de PRP junto con células mesenquimales de

médula ósea produjo una aceleración en la formación de hueso nuevo 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).

Asimismo, el PRP ha sido empleado también en cirugía espinal, concretamente en casos de fusión espinal. Lowery y colaboradores resolvieron que el PRP favorecía la fusión ósea cuando se usaba en combinación con el autoinjerto de esponjosa (Lowery *et al.*, 1999).

Actualmente, no hallamos publicados aún estudios clínicos sólidos en cuanto a su metodología, 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.

## **Lesiones musculares**

Uno de los problemas ortopédicos más habituales y que impiden a la persona afectada desarrollar una actividad física normal son las lesiones musculares, ya sean causadas por contusión o por tirón muscular, que suelen aparecer en practicantes de deportes que implican contacto, carreras explosivas, saltos y aceleraciones bruscas (Kon *et al.*, 2011). El tratamiento de este tipo de lesiones sigue siendo conservador en la mayoría de los casos, a pesar de su importancia, y abundan recomendaciones como el reposo, aplicación de hielo, vendajes compresivos y elevación de la zona lesionada (Mishra *et al.*, 2009b; Sánchez *et al.*, 2009c). Gran parte de las proteínas bioactivas que intervienen en los procesos de cicatrización tisular se encuentran en el PRP, que ha sido propuesto como un tratamiento potencial para acelerar el proceso cicatricial y aumentar la calidad del tejido reparado (Sánchez *et al.*, 2009c; Kon *et al.*, 2011).

### ***Estudios experimentales***

Factores de crecimiento como el b-FGF, el IGF-I y el NGF son capaces de incrementar la regeneración y mejorar la fuerza en el músculo lesionado, según se ha revelado en varios estudios experimentales (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 demostrado mejorar la cicatrización e incrementar la fuerza muscular (Menetrey *et al.*, 2000). La aplicación de b-FGF y de VEGF causó un incremento local de la angiogénesis en un modelo experimental de daño muscular en el gastrocnemio de ratas (Efthimiadou *et al.*, 2006). Por su parte, la neutralización de b-FGF, IGF-I y TGF- $\beta$ 1 en el músculo de ratón lesionado produjo una disminución de la respuesta cicatricial, lo que advierte el importante papel de estos factores de crecimiento en el proceso de cicatrización muscular (Lefaucheur *et al.*, 1996).

Lamentablemente, hallamos muy pocos estudios experimentales *in vivo* en los que se evalúe el efecto del PRP sobre el proceso de cicatrización muscular. En uno de ellos, Hammond y colaboradores (2009) inyectaron PRP en un modelo experimental de daño muscular en el músculo tibial craneal de ratas, y observaron que la administración local de PRP rebajaba el periodo de recuperación, debido a que los factores de crecimiento contenidos en el PRP impulsaban la miogénesis (Hammond *et al.*, 2009).

### ***Estudios clínicos***

Cugat y colaboradores (2005) fueron de los primeros autores en presentar casos clínicos del empleo de PRGF para el manejo de lesiones musculares en un grupo de 14 atletas profesionales. La zona de la lesión fue localizada ecográficamente y se evacuó el hematoma. A continuación, se inyectó el PRGF de manera ecoguiada justo en la zona donde estaba el hematoma. Los pacientes que siguieron este tratamiento volvieron antes a la actividad deportiva, en comparación con los tiempos esperados en los tratamientos convencionales, y los estudios ecográficos de seguimiento ratificaron una cicatrización progresiva de la lesión muscular (Cugat *et al.*, 2005). En 2005, Sánchez y colaboradores presentaron 20 casos clínicos de deportistas profesionales con lesiones musculares tratadas con inyecciones ecoguiadas de PRGF, obteniendo una reducción de los tiempos de recuperación y evitando recaídas (Sánchez *et al.*, 2005).

Todos estos resultados clínicos preliminares son esperanzadores, ya que revelan importantes descensos en el tiempo de recuperación, pero aún deben ser aclarados una serie de aspectos esenciales con respecto a la pauta de tratamiento de estas

aplicaciones de PRP. Se cree que la vía más razonable para administrar el PRP es mediante la aplicación intralesional, no obstante, aún queda por dilucidar en qué momento, qué volumen, qué dosis, y con qué frecuencia deben ser administradas estas inyecciones de PRP (Kon *et al.*, 2011). También han surgido preocupaciones en cuanto a la concentración de determinados factores de crecimiento contenidos en el PRP. Concentraciones elevadas de algunos factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1 han sido relacionadas con la formación de fibrosis cicatriciales extensas, causando perjuicio e incluso produciendo una contracción fibrótica de la cicatrización muscular (Chan *et al.*, 2005). Algunos investigadores han aconsejado precaución ante el empleo de estos tratamientos en deportistas con lesiones musculares, ya que estas cicatrices fibróticas pueden acrecentar la tasa de recidivas (Foster *et al.*, 2009).

La utilización del PRP en la reparación de lesiones musculares padeció un duro revés en el año 2010, fecha en la que la World Anti-Doping Agency (WADA) 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 estimó que la aplicación intramuscular de PRP podría suponer una fuente sistémica de factores de crecimiento capaz de aumentar el rendimiento físico de los deportistas de una manera fraudulenta (Borrione *et al.*, 2010). Se llegó incluso a sugerir que las aplicaciones locales de PRP podían tener efectos sistémicos, con capacidad para influir en la homeostasis de determinados factores de crecimiento y citoquinas circulantes y como consecuencia, efecto sobre los controles antidoping (Banfi *et al.*, 2006). Otros autores consideran improbable que la administración local de PRP produzca un mejor 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). Tras un fuerte debate, la WADA aclaró que las formulaciones del PRP, tal y como se conocen hoy día, no incrementaban de manera significativa el crecimiento muscular más allá de la propia respuesta fisiológica del músculo, y que su uso terapéutico no violaba el espíritu del deporte. Finalmente, en 2011, la WADA retiró de su lista de sustancias prohibidas la aplicación intramuscular de inyecciones de PRP.

Recientemente, Harmon (2010) ha publicado una serie de consideraciones a tener en cuenta sobre aspectos importantes de la fisiopatología de la cicatrización muscular en caso de administrar PRP para el tratamiento de lesiones musculares. El autor recomienda no aplicar el PRP en las primeras 24 horas tras el daño, empleando en su lugar un producto pobre en leucocitos para mitigar así los posibles efectos proinflamatorios liberados por estas células, y que un PRP con una alta proporción de plasma causaría un incremento en la cicatrización y una disminución en la fibrosis, debido a sus mayores niveles de IGF-I (Harmon, 2010).

La aplicación del PRP para el manejo de lesiones musculares es muy prometedora pero, por desgracia, aún existen numerosas lagunas acerca de la respuesta fisiológica del tejido muscular dañado frente al PRP, por lo que se requieren estudios experimentales básicos que ayuden a comprender estos mecanismos de reparación tisular del músculo. En la actualidad, no hallamos estudios clínicos con suficiente potencia estadística que investiguen de manera seria y fiable el efecto de las inyecciones de PRP en el proceso de cicatrización muscular (Andía *et al.*, 2011).

## **Lesiones meniscales**

Los meniscos son dos estructuras semicirculares de naturaleza fibrocartilaginosa que se encuentran entre el fémur y la tibia, esenciales para la buena biomecánica de la rodilla, y que resultan dañados de manera habitual durante la práctica deportiva (Scordino y DeBerardino, 2012). La comunidad científica está realizando grandes esfuerzos por intentar encontrar terapias que fomenten el proceso de reparación del menisco, ya que es una estructura relativamente avascular y con una cicatrización comprometida (Scordino y DeBerardino, 2012). Una de estas terapias emergentes es el tratamiento con PRP.

Debido a los resultados prometedores que se están alcanzando con el uso de PRP en lesiones de ligamento y de tendón, recientemente ha surgido la idea de usar PRP para casos de lesión en el menisco (Ishida *et al.*, 2007), apuntando a que el PRP incrementa la regeneración del menisco tanto *in vitro* como *in vivo*. Analizaron la expresión de ARN

mensajero de proteínas de la matriz extracelular producidas por células meniscales cultivadas con PRP, hallando un incremento significativo de la cantidad de ARN mensajero, en comparación con células meniscales cultivadas sin PRP. Los autores también 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, observando una mejor reparación del menisco, en comparación con aquellos que habían sido tratados con plasma pobre en plaquetas o sólo con hidrogel (Ishida *et al.*, 2007).

Lamentablemente, aún no tenemos estudios clínicos en esta dirección. Es una cuestión que deberá de ser investigada en el futuro, y cuyos resultados ayudarán a una mejor comprensión del papel que las terapias con PRP pueden desarrollar en el manejo terapéutico de lesiones meniscales (Scordino y DeBerardino, 2012).

## **Lesiones tendinosas**

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

Una de las principales causas de morbilidad de carácter musculoesquelético son los problemas de tendón, que provocan entre el 30 y el 50 % de las lesiones deportivas (Andía *et al.*, 2010). Por ello, la comunidad científica realiza grandes esfuerzos en la búsqueda de terapias que ayuden a mejorar el tratamiento de este tipo de lesiones. Los excelentes resultados cosechados mediante la aplicación de PRP en los procesos de cicatrización tisular han captado la atención de los profesionales sanitarios que se ocupan de las lesiones deportivas, quienes ya han incorporado estos nuevos tratamientos a su arsenal terapéutico. Es probable que sea en las lesiones del tendón donde más rápidamente se haya extendido su uso clínico, a pesar de que cuando se

empezaron a emplear apenas existían estudios experimentales al respecto (Engebretsen *et al.*, 2010).

Una de las causas que hacen que el proceso de cicatrización en el tendón se pueda ver comprometido es que se trata de un tejido pobremente vascularizado (Fenwick *et al.*, 2002), además de que consume relativamente poca energía y tiene una baja tasa metabólica. Este hecho hace que el tejido tendinoso tolere perfectamente condiciones de tensión durante largo periodo de tiempo pero, por el contrario, ralentiza los procesos que requieren gran actividad metabólica, como el proceso de cicatrización (Sánchez *et al.*, 2009c).

La acción del PRP sobre el proceso de cicatrización tendinosa es similar a la que tiene lugar en la cicatrización de cualquier otro tejido. Al ser activadas, las plaquetas contenidas en el PRP liberan el contenido de sus gránulos plaquetarios, que contienen importantes factores de crecimiento, como PDGF, TGF- $\beta$ , b-FGF, EGF, VEGF, HGF, IGF-I, que cumplen una función importante en el proceso de cicatrización del tendón (Molloy *et al.*, 2003). Factores de crecimiento como PDGF y TGF- $\beta$  poseen un fuerte efecto quimiotáctico y proliferativo sobre fibroblastos, a la vez que estimulan la síntesis de matriz extracelular por parte de estas células (Woo *et al.*, 1999). Las terapias con PRP proporcionan además otras proteínas bioactivas y estructurales que favorecen la adhesión intercelular y la formación de una matriz tridimensional en el lugar de la lesión, tales como la fibrina, la fibronectina o la vitronectina, facilitando así, una correcta cicatrización del tendón (Andía *et al.*, 2010).

### ***Estudios experimentales***

Los estudios experimentales que encontramos a día de hoy sobre el efecto del PRP en el proceso de cicatrización tendinosa continúan siendo escasos. A pesar de ello, los estudios exponen que el tratamiento con PRP mejora de un modo esperanzador los procesos de cicatrización del tendón.

Para la correcta cicatrización del tendón, es primordial la migración de células mesenquimales y fibroblastos periféricos hacia la región de reparación tendinosa, influenciada por determinados factores de crecimiento y otras sustancias quimiotácticas

(Andía *et al.*, 2010). Kajikawa y colaboradores (2008) revelaron que el PRP es capaz de estimular la migración de células hacia el tendón en fase de reparación, usando un modelo experimental de defecto del tendón rotuliano en ratas. En un grupo de animales aplicaron el PRP de manera local, y emplearon un marcador fluorescente que identificaba las células circulantes que habían acudido hasta la zona en reparación. El estudio histológico de los tendones mostró que, tanto a los 3 como a los 7 días, en los animales tratados con PRP la afluencia de células fue notablemente mayor que en los animales control (Kajikawa *et al.*, 2008). Mediante técnicas inmunohistoquímicas, estos mismos autores también evaluaron la producción de colágeno tipo I y tipo III, y observaron que la inmunorreactividad para estos tipos de colágeno era mayor en los tendones tratados con PRP que en los tendones control, lo que apuntaba un aumento del proceso de cicatrización precoz del tendón (Kajikawa *et al.*, 2008).

Para obtener una cicatrización satisfactoria, es imprescindible una buena neovascularización y proliferación celular en la zona de reparación durante las primeras fases del proceso de cicatrización. Estudios experimentales *in vitro* han revelado que el PRGF incita la replicación celular en cultivos de tenocitos y la síntesis de sustancias angiogénicas, como el VEGF y el HGF, que actúan sobre las células endoteliales promoviendo la angiogénesis (Anitua *et al.*, 2005; Anitua *et al.*, 2006b; Anitua *et al.*, 2007a). Lyras y colaboradores (2009) llevaron a cabo un estudio experimental *in vivo* en el que inyectaron PRP sobre un modelo de rotura de tendón de Aquiles en conejo, y estudiaron histológicamente la neovascularización en la zona de reparación. Durante las dos primeras semanas de cicatrización, la angiogénesis fue muy superior en los tendones tratados con PRP que en los que habían sido infiltrados con solución salina y, transcurridas cuatro semanas, presentaron un mejor tejido de reparación desde el punto de vista histológico (Lyras *et al.*, 2009b).

Lograr de manera rápida un gran número de fibroblastos conlleva un incremento proporcional en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Andía *et al.*, 2010). Anitua y colaboradores realizaron estudios *in vitro* en los que cultivaron tenocitos humanos en presencia de PRGF, y hallaron un notable aumento 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). En los cultivos de fibroblastos expuestos a PRGF, también se indujo la síntesis de valiosas proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno o el ácido hialurónico (Anitua *et al.*, 2009b). El PRGF-Endoret estimuló la migración de los fibroblastos del tendón y mejoró las propiedades biológicas del ácido hialurónico (Anitua *et al.*, 2012). Estos autores también analizaron la acción que el PRGF ejercía sobre la proliferación celular *in vivo*. Para ello, aplicaron inyecciones semanales de PRGF en el tendón de Aquiles de ovejas que no presentaban patologías tendinosas. Transcurridas cuatro semanas, se eutanasiaron los animales y se estudiaron histológicamente los tendones. Los tendones inyectados con PRGF mostraron un aumento notable en la densidad celular y una mayor neovascularización en comparación con los tendones infiltrados con solución salina (Anitua *et al.*, 2006b).

El PRP ejerce un efecto positivo sobre los procesos anabólicos de los tenocitos, según se ha comprobado en varios estudios *in vitro*. Schnabel y colaboradores (2007) demostraron en su estudio que los cultivos de tenocitos procedentes del tendón flexor digital superficial de caballo tratados con 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). Posteriormente, estos autores comprobaron que el PRP liberaba factores de crecimiento de una manera constante durante al menos 4 días y que los cultivos celulares de tendón expuesto a PRP presentaban un patrón de expresión de genes más beneficioso para los procesos de reparación tendinosa que los cultivos expuestos a aspirados de médula ósea (McCarrel y Fortier, 2009).

En un estudio *in vitro* realizado por otro grupo de investigadores se encontró que los cultivos de tenocitos humanos 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) analizaron la acción de los tenocitos cultivados sobre unas matrices sintéticas en las que se añadía PRP, y se demostró que se producía una mayor proliferación celular y se incrementaba

la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (Visser *et al.*, 2010). Además, en un estudio presentado en 2011 se informó que los cultivos de tenocitos expuestos a PRP no experimentaban los efectos adversos que fármacos como el ciprofloxacino o la dexametasona desplegaban sobre esta estirpe celular (Baboldashti *et al.*, 2011).

Morizaki y colaboradores (2010) realizaron un interesante estudio *in vitro* de reparación de tendones flexores caninos. En el grupo control se llevó a cabo una sutura simple, pero se utilizaron otros protocolos en varios grupos de estudios: 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. Precisamente, este último grupo cosechó los mejores resultados de resistencia biomecánica (Morizaki *et al.*, 2010), lo que dejó entrever la eficacia de la combinación PRP/células mesenquimales de médula ósea a la hora de tratar los problemas tendinosos.

Aspenberg y Virchenko (2004) realizaron uno de los primeros estudios *in vivo* sobre el efecto del PRP en las lesiones de tendón, creando un modelo experimental de defecto en el tendón de Aquiles de ratas, e inyectando percutáneamente un concentrado plaquetario. El callo tendinoso de los animales tratados mostró un incremento en sus propiedades biomecánicas cercano al 30% en la primera semana, y esta mejoría se mantuvo hasta la tercera semana. De estos resultados, los autores extrajeron que el PRP podría resultar útil en el tratamiento de lesiones tendinosas (Aspenberg y Virchenko, 2004). Virchenko y colaboradores volvieron a analizar el efecto de la aplicación local de PRP sobre un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en rata, obteniendo de nuevo un mejor proceso de cicatrización y unas mejores propiedades biomecánicas en los tendones tratados con PRP que en los tendones no tratados (Virchenko y Aspenberg, 2006, Virchenko *et al.*, 2006). Resultó esencial que los tendones tratados con PRP fueran sometidos a estímulos mecánicos adecuados para obtener un correcto proceso de cicatrización tendinosa, según señalaron estos mismos autores en uno de sus estudios (Virchenko y Aspenberg, 2006).

La acción del PRP en la cicatrización tendinosa también ha sido abordada por Lyras y colaboradores, que han empleado en sus estudios modelos experimentales de defectos



quirúrgicos creados en el tendón rotuliano de conejos (Lyras *et al.*, 2009a; Lyras *et al.*, 2010a), 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 su estudio sobre el defecto central en el tendón rotuliano de conejos, observaron que los tendones tratados con PRP mostraban un aumento notable de sus propiedades biomecánicas y un mejor aspecto histológico tras las primeras semanas de la cirugía (Lyras *et al.*, 2009a), señalando el importante papel que puede desempeñar el PRP en las primeras fases de la cicatrización. Alentados por estos buenos resultados, publicaron al año siguiente un estudio sobre este mismo modelo experimental que determinó que los tendones tratados con PRP presentaban un aumento significativo de la angiogénesis durante las primeras dos semanas tras la cirugía y, posteriormente, una disminución de la densidad de vasos sanguíneos más rápida que en los tendones control, acelerando el proceso de cicatrización tendinoso. También se advirtió que, especialmente en los primeros estadios de la cicatrización, los tendones tratados con PRP mostraron una mayor expresión del IGF-I que los tendones control (Lyras *et al.*, 2010b).

En su trabajo sobre un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles de conejos, realizado en 2009, Lyras y colaboradores informaron que la aplicación de PRP podía promover los procesos de angiogénesis en las fases tempranas de la cicatrización tendinosa. Esta mejor vascularización podía ser capital para obtener una aceleración en el proceso de cicatrización y una mejora histológica en la calidad de la cicatriz en los tendones tratados con PRP (Lyras *et al.*, 2009b). Sobre este mismo modelo experimental, se estudió la expresión de TGF- $\beta$ 1 en el tejido cicatricial tras la aplicación de PRP. Tanto en la primera como en la segunda semana tras la cirugía, se produjo un notable incremento en la expresión de TGF- $\beta$ 1, mientras que en la tercera y cuarta semana, su expresión fue menor que la detectada en los tendones control. Este cambio temporal en la expresión de TGF- $\beta$ 1 fue asociado con una mejora en la calidad histológica de los tendones tratados con PRP a lo largo del periodo de estudio. De este modo, concluyeron que la aplicación de PRP en el tendón podría modificar el patrón de expresión de TGF- $\beta$ 1 y mejorar así 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 produce 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).

En el año 2010, Bosch y colaboradores estudiaron el efecto del PRP sobre la cicatrización del tendón, empleando para ello un modelo experimental equino en el que crearon quirúrgicamente un daño en el tendón flexor digital superficial de ambas extremidades anteriores. Transcurridos siete días de la creación del defecto, administraron una inyección ecoguiada de PRP en una extremidad, mientras que inyectaron solución salina en la otra. Los tendones fueron extraídos para evaluar el proceso de cicatrización desde un punto de vista bioquímico, biomecánico e histológico, una vez transcurridas 24 semanas de la cirugía. Los autores indicaron que la aplicación de PRP en el tendón lesionado causó un aumento de la actividad metabólica del tejido reparado, una mejora en sus propiedades biomecánicas, y un mejor aspecto histológico que los tendones tratados con placebo (Bosch *et al.*, 2010). En otro trabajo sobre este mismo modelo experimental, estos mismos autores presentaron un mayor grado de neovascularización en los tendones tratados con PRP que en los tendones tratados con placebo. El nivel de vascularización fue establecido a lo largo del periodo de estudio por medio de ecografía Doppler color, y tras la eutanasia de los animales mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los autores indicaron que el aumento en la neovascularización ocasionado por la aplicación de PRP podría explicar cómo, una única administración de PRP, hizo que los tendones presentasen un mejor proceso de cicatrización incluso transcurridas 23 semanas del tratamiento (Bosch *et al.*, 2011a). Estos mismos autores también se sirvieron de un análisis computerizado de las imágenes ecográficas del tendón a lo largo del estudio para monitorizar el proceso de cicatrización, y observaron un mejor aspecto ecográfico de la cicatrización en los tendones tratados con PRP que en los tendones tratados con solución salina (Bosch *et al.*, 2011b).

Sarrafian y colaboradores usaron un modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles en oveja para estudiar el efecto del PRP sobre la cicatrización tendinosa. En su publicación, los investigadores no sólo evaluaron el PRP, sino que también analizaron el efecto de una matriz dérmica porcina acelular y la combinación de ambos productos. Los tendones fueron extraídos y estudiados tanto histológica como biomecánicamente, tras 24 semanas de la cirugía, hallando que el uso de la matriz dérmica porcina acelular, tanto sola como en combinación con PRP, mejoró el proceso de cicatrización en los tendones donde se aplicó (Sarrafian *et al.*, 2010).

En el año 2013, Fernández y colaboradores estudiaron y evaluaron el efecto que tiene la aplicación de inyecciones intratendinosas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre la cicatrización del tendón de Aquiles, usando un modelo experimental en oveja. Para ello, se diseñó un modelo experimental in vivo de tenotomía del tendón de Aquiles en la especie ovina. Se evaluó histológicamente el proceso de cicatrización del tendón tras la aplicación de PRGF, y su comparación con la cicatrización en tendones infiltrados con solución salina. Además se hizo un seguimiento ecográfico del proceso de cicatrización. Llegaron a la conclusión de que la infiltración de PRGF era un tratamiento seguro que no producía efectos adversos sobre el proceso de cicatrización ni en la salud de los animales. Observaron que el núcleo de los fibroblastos de los tendones tratados con PRGF mostraba significativamente una mejor orientación y una silueta más alargada que los del grupo salino a las ocho semanas. También que los tendones tratados con PRGF mostraban histológicamente una mejor organización de las fibras de colágeno que los infiltrados con suero salino, tanto a las cuatro como a las ocho semanas, y que el grupo de PRGF tenía menos colágeno tipo III a las cuatro semanas postcirugía y más colágeno tipo I a las ocho semanas. Además, en comparación con el grupo salino, las inyecciones de PRGF inducían una menor infiltración celular inflamatoria, una regresión vascular más rápida y una densidad menor de fibroblastos, sugiriendo una aceleración en el proceso de cicatrización. A nivel ecográfico los tendones tratados con PRGF mostraban mejorías a las ocho semanas en comparación con el grupo salino. En resumen, el PRGF aceleró el proceso de

cicatrización de los tendones lesionados en el modelo experimental (Fernández *et al.*, 2013)

Wnuk y colaboradores en 2012, valoraron histológica y biomecánicamente el efecto del PRP alogénico en lesiones del tendón calcáneo en 88 ratas. Llegaron a la conclusión de que el PRP alogénico incrementaba la resistencia mecánica de los tendones tras 14, 21 y 42 días de la lesión (Wnuk *et al.*, 2012).

Otra publicación ha evaluado el efecto del PRP sobre un modelo experimental de rotura completa del tendón rotuliano en ratas. Unos tendones fueron tratados con PRP y otros fueron tratados con solución salina. A las dos semanas, los tendones tratados con PRP presentaron unas mejoras moderadas en sus propiedades mecánicas y en su calidad histológica. Hubo un subgrupo de tendones tratados con PRP que no presentaron diferencias con respecto a los tendones tratados con solución salina. Los autores esgrimieron que en esos animales no se consiguió un enriquecimiento plaquetario adecuado durante el procedimiento de obtención del PRP (Spang *et al.*, 2011).

En 2012 se realizó un estudio biomecánico e histológico en 120 tendones de Aquiles de ratas lesionados quirúrgicamente y tratados con PRP (60) y suero salino (60). Los tendones tratados con PRP eran más resistentes mecánicamente a los 15 y 30 días que los tratados con suero salino (Kaux *et al.*, 2012).

En 2011, Kim y colaboradores analizaron la acción combinada de PRP y BMP-2 sobre el proceso de cicatrización en la unión tendón-hueso. Sobre un modelo experimental de conejo, los autores cortaron el tendón de Aquiles justo a nivel de su inserción en el hueso calcáneo. Tras la sutura del tendón, aplicaron la mezcla PRP/BMP-2, y observaron que se produjo una aceleración del proceso de cicatrización entre tendón y hueso. Además, verificaron un incremento de la fuerza biomecánica de la reparación transcurridas ocho semanas de la cirugía (Kim *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha presentado un mecanismo que podría explicar cómo la aplicación de PRP fomenta los procesos de cicatrización tendinosa. Un estudio *in vitro* ha señalado que el PRP provoca que las "células madre de tendón" (*Tendon stem cells*),

una estirpe celular recientemente descubierta, se diferencien hacia tenocitos activos, mostrando una gran capacidad proliferativa y de síntesis de proteínas estructurales (Zhang y Wang, 2010). En otro estudio del 2012 se ha valorado la resistencia a la tracción de tendones lesionados en conejo tratados con PRP y células madre derivadas del tejido adiposo, demostrando una mejora en la cicatrización (Uysal *et al.*, 2012).

### *Estudios clínicos*

Los estudios clínicos fiables sobre la aplicación de preparaciones ricas en plaquetas para el tratamiento de lesiones tendinosas se han producido en los últimos 6-7 años. Hemos podido comprobar que los estudios experimentales sobre el empleo del PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas muestran unos resultados prometedores. No ocurre así en los estudios clínicos. Mientras que en unos trabajos se recomienda el empleo de PRP para tratar estas patologías tendinosas, en otros no se detecta ningún efecto beneficioso (Taylor *et al.*, 2011). Esta diversidad de resultados puede ser debida, como ya hemos comentado con anterioridad, a la gran variedad 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, etc.) (Taylor *et al.*, 2011). De modo que podemos deducir que la falta de homogeneidad de los diferentes productos aplicados sobre una determinada lesión tendinosa pueda llegar a causar efectos biológicos muy diferentes (Anitua *et al.*, 2009a).

En esta sección de la revisión bibliográfica repasaremos los estudios clínicos sobre diferentes patologías tendinosas que han sido tratadas con aplicaciones de PRP, patologías que podríamos 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. También trataremos su uso en lesiones tendinosas de caballos de deporte.

## *Tendón de Aquiles*

En el año 2007, el Dr. Mikel Sánchez y colaboradores fueron los primeros en informar del uso del PRGF en la reparación de roturas del tendón de Aquiles en casos clínicos (Sánchez *et al.*, 2007). Hallaron muy buenos resultados tras el empleo de PRGF como tratamiento adyuvante de la cirugía de reparación de rotura del tendón de Aquiles. En la cirugía, inyectaron este factor de crecimiento en los bordes del tendón roto, además de colocar una matriz de fibrina preparada a partir de PRGF recubriendo la zona de la reparación. En este estudio retrospectivo se incluyeron 12 deportistas con rotura del tendón de Aquiles: en 6 de ellos se empleó PRGF y en los otros 6 no. Los 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). Los tendones tratados con PRGF presentaron además una menor área de corte transversal medida desde el punto de vista ecográfico, indicando un proceso de reparación más fisiológico. Ningún individuo del grupo PRGF presentó complicaciones asociadas con el tratamiento (Sánchez *et al.*, 2007). En otro estudio, estos mismos autores utilizaron de manera simultánea matrices construidas a partir de PRGF junto con inyecciones de PRGF para el tratamiento de complicaciones tras la rotura del tendón de Aquiles en dos casos clínicos (infección profunda del tejido tendinoso junto con importante pérdida de sustancia). Mientras que un atleta pudo volver a la actividad a las 14 semanas, fueron necesarias 28 semanas para el retorno al entrenamiento del otro individuo. La zona de la lesión se fue rellenando progresivamente de tejido de reparación, tal y como revelaron los estudios ecográficos de seguimiento y la resonancia magnética (Sánchez *et al.*, 2009a).

En 2010, Filardo y colaboradores (2010) presentaron el caso clínico de un deportista profesional con rotura parcial en su tendón de Aquiles, tratado de manera conservadora mediante la aplicación de tres inyecciones de PRP (una por semana), hielo y que posteriormente siguió un programa de rehabilitación. El paciente pudo volver a la competición deportiva a los 64 días de la lesión, y en los 18 meses sucesivos continuó compitiendo sin tener que recibir tratamiento extra en su tendón (Filardo *et al.*, 2010b).

Sin embargo, la aplicación de PRP no ha resultado útil como tratamiento adyuvante en el manejo de roturas del tendón de Aquiles según han señalado Schepull y colaboradores en una publicación (Schepull *et al.*, 2011). En un estudio clínico aleatorio y controlado, incluyeron 30 pacientes en los que se realizó cirugía para la reparación del tendón de Aquiles: se usó el PRP en 16 pacientes, mientras que los 14 restantes formaban el grupo control. No hallaron diferencias destacables en las propiedades elásticas de los tendones de ambos grupos, tampoco con respecto al índice de elevación del talón; incluso los individuos tratados con PRP presentaron una peor funcionalidad al año (según el índice Achilles Tendon Total Rupture Score). Dichos autores hallaron en su investigación una elevada variabilidad en las propiedades mecánicas de los tendones, difícilmente explicable como consecuencia única de errores en las medidas (Schepull *et al.*, 2011). Cabe destacar que la metodología de preparación del PRP en este trabajo dista mucho de la metodología usada en el estudio de Sánchez y colaboradores (2007).

### ***Tendinopatía crónica del tendón de Aquiles***

Un problema relativamente frecuente en el tendón de Aquiles son sus procesos degenerativos crónicos, relacionados en muchas ocasiones con roturas posteriores (de Vos *et al.*, 2010). En los pacientes con esta tendinopatía se ha propuesto el empleo de PRP como un tratamiento conservador para intentar mejorar la funcionalidad y los signos clínicos. En 2010, Vos y colaboradores realizaron un estudio clínico, prospectivo, aleatorio, controlado y doble ciego, con 54 pacientes que padecían tendinopatía crónica del tendón de Aquiles: el PRP fue inyectado en 27 de ellos, bajo guía ecográfica en la zona de la lesión y junto con un programa de ejercicios excéntricos; la otra mitad fueron tratados con solución salina y un programa de ejercicios excéntricos. Los autores realizaron un seguimiento y una evaluación de los pacientes a las 6, 12 y 24 semanas del tratamiento. No hallaron diferencias destacables entre ambos grupos ni en cuanto a la disminución del dolor ni con respecto a una mejora en la actividad física en ninguno de los tiempos de seguimiento (de Vos *et al.*, 2010). En este mismo grupo de pacientes, estos autores comprobaron posteriormente que la aplicación de PRP junto con un programa de ejercicios excéntricos no produjo ninguna mejora ni en la estructura

ecográfica ni en la neovascularización de los tendones de Aquiles con tendinopatía crónica, comparados con el grupo de pacientes infiltrados con solución salina y sometidos a un programa de ejercicios excéntricos (de Vos *et al.*, 2011). Transcurrido un año de las aplicaciones de PRP y de solución salina volvieron a ser evaluados los 54 pacientes que participaban en el estudio, sin hallarse diferencias significativas entre los dos grupos en estos nuevos resultados a largo plazo (de Jonge *et al.*, 2011). En conclusión, este estudio clínico, prospectivo, aleatorio, controlado y doble ciego no registró mejoras en el tratamiento de tendinopatías crónicas del tendón de Aquiles mediante la inyección de PRP, ni a corto, ni a largo plazo.

Por otro lado, existen estudios que señalan que el empleo de inyecciones de PRP resulta beneficioso en pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles. En una serie prospectiva de los casos clínicos de 14 pacientes con 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, además de analizarse su estructura ecográfica, y su grado de neovascularización mediante Doppler. Se procedió a un seguimiento a las 6 semanas, y a los 3, 6 y 18 meses, observándose una mejora en la valoración clínica del tendón con respecto al estado anterior al tratamiento. A nivel ecográfico, se normalizó el peritendón, el grosor del tendón, y desaparecieron las lesiones hipoecoicas. En lo referente a la neovascularización, en los primeros controles de seguimiento se registró un aumento en la respuesta vascular en el peritendón y en las zonas contiguas, pero la actividad vascular disminuyó gradualmente a partir de los 6 meses (Gaweda *et al.*, 2010). En 2011, Owens y colaboradores publicaron un estudio retrospectivo de los casos clínicos de 10 pacientes con tendinopatía crónica del tendón de Aquiles tratados con inyecciones intratendinosas de PRP. Los autores apuntaron unas discretas mejoras en la valoración funcional de los tendones producidas por el tratamiento con PRP, no obstante, apenas varió el aspecto en resonancia magnética de los tendones tras el tratamiento (Owens *et al.*, 2011).

Recientemente en 2012, un estudio con 30 pacientes afectados de tendinosis crónica en el tendón de Aquiles que no respondían a los tratamientos médicos tras seis meses



fueron tratados con una dosis única de PRP ecoguiada. En los controles con ultrasonidos y resonancias magnéticas a los 0 y 6 meses y la valoración de la escala AOFAS a 0, 1, 2, 3, 6, 12, y 24 meses encontraron que el uso de PRP fue efectivo en el tratamiento de las tendinosis crónicas recalcitrantes del tendón de Aquiles (Monto, 2012).

### *Tendinopatía del codo*

En un estudio clínico aleatorio que incluyó un total de 100 pacientes, Peerbooms y colaboradores (2010) cotejaron la aplicación de PRP con la inyección de corticoides para el tratamiento de procesos de epicondilitis lateral, y hallaron que el grupo tratado con PRP experimentó una notable mejoría con respecto a la reducción del dolor y la funcionalidad. Además, comprobaron que las mejoras iniciales obtenidas con la administración de corticoides desaparecían gradualmente, mientras que en los individuos tratados con PRP se obtuvo una mejora progresiva de la sintomatología (Peerbooms *et al.*, 2010).

Este estudio corroboró los resultados obtenidos previamente por Mishra y Pavleko en 2006, los primeros en evaluar el efecto de las inyecciones de PRP en el tratamiento de problemas tendinosos. En un estudio clínico con 20 pacientes que padecían tendinopatía de codo que no mostraban respuesta al tratamiento convencional, 15 de ellos fueron tratados mediante una inyección intratendinosa única de PRP, mientras que los cinco restantes fueron infiltrados con bupivacaína/epinefrina. Mediante una escala de valoración visual del dolor y de los signos clínicos, se procedió a evaluar a los pacientes durante el postoperatorio, obteniendo una mejoría del 60% en los signos clínicos tras ocho semanas en los pacientes tratados con PRP, mientras que en el grupo de pacientes infiltrados con anestésico local se consiguió únicamente una mejoría del 16%. Transcurridos seis meses, se observó una reducción del 93% de los signos de dolor en los pacientes tratados con PRP. Cabe destacar que el estudio tenía limitaciones, no era un estudio a doble ciego, o que eran pocos los individuos incluidos en la investigación (Mishra y Pavelko, 2006).

### *Tendinopatía del tendón rotuliano*

En 2009, Kon y colaboradores presentaron los casos clínicos de 20 deportistas que padecían problemas de tendinopatía del tendón rotuliano, con una media de 20 meses de antigüedad. A estos pacientes se les aplicó un total de tres inyecciones locales de PRP cada 15 días, y fueron evaluados mediante escalas de valoración clínica tanto al final del tratamiento como a los 6 meses. Los autores no hallaron efectos adversos tras las inyecciones de PRP, pero sí encontraron una mejoría significativa de los signos clínicos al final del periodo de estudio. Cabe señalar que se trataba de un estudio sin grupo control (Kon *et al.*, 2009). Otros autores compararon el resultado clínico obtenido en los 15 pacientes afectados de tendinopatía crónica del tendón rotuliano tratados con PRP, con un grupo de 16 pacientes tratados exclusivamente con fisioterapia. Transcurridos seis meses, reevaluaron a los pacientes y observaron que los individuos que recibieron PRP mostraban mejores resultados clínicos que los pacientes tratados con fisioterapia (Filardo *et al.*, 2010a). Brown y Sivan (2010), en el estudio del caso de un deportista que padecía un proceso crónico de tendinopatía del tendón rotuliano, también remarcaron que el tratamiento ecoguiado con inyecciones de PRP mejoraba los signos clínicos (Brown y Sivan, 2010).

Para tratar de reducir la morbilidad de la zona donante (tendón rotuliano), Cervellin y colaboradores (2012) han planteado el uso del PRP tras la cirugía de reconstrucción del ligamento cruzado anterior usando la técnica hueso-tendón rotuliano-hueso. Llevaron a cabo un estudio clínico prospectivo, aleatorio y controlado en el que aplicaron gel de PRP sobre la zona donante del tendón rotuliano en 20 pacientes, mientras que otros 20 fueron el grupo control. A los 12 meses de la cirugía, todos los pacientes fueron sometidos a un examen clínico en el que se demostró que la aplicación de PRP redujo subjetivamente el dolor a nivel de la zona donante del tendón rotuliano tras la cirugía. Por otro lado, la resonancia magnética de la rodilla de los pacientes tratados con PRP no mostró diferencias destacables con la de los pacientes control (Cervellin *et al.*, 2012).

En 2013, Kaux y colaboradores realizaron un estudio clínico con 20 pacientes con tendinopatía crónica alta patelar. Se infiltraron 6 mL de PRP obtenido por aféresis y

observaron una mejoría funcional significativa a las 6 semanas aunque no se correspondieron con las pruebas de imagen (Kaux *et al.*, 2013).

En un estudio reciente Seijas y colaboradores (2013), desarrollaron un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, a doble ciego, en el que se compararon dos grupos de pacientes con lesión de ligamento cruzado anterior, operados de ligamentoplastia utilizando injerto rotuliano. Existía un grupo en el que se aplicaba plasma rico en factores de crecimiento en la zona donante tras la extracción de la plastia, mientras que el otro grupo se dejaba la zona del defecto sin la aplicación de ningún producto para que su cicatrización fuera espontánea. La evaluación se realizó en términos de regeneración local mediante valoración por ecografías seriadas a lo largo de dos años, creando una clasificación de maduración. En el estudio ecográfico también se valoró el grado de vascularización del tendón con ecografía Doppler. Se observó el dolor en la zona donante a lo largo de los dos años, y para valorar la función global de la rodilla, se realizaron test de salud general, específicos de rodilla, y reincorporación deportiva a los 6, 12 y 24 meses. Para la valoración de la estabilidad objetiva se realizó el test artromotor KT-1000 a los 6, 12 y 24 meses, y para la valoración de la maduración del injerto se realizaron resonancias magnéticas donde se determinó el grado de regeneración de la plastia. Llegaron a la conclusión que el uso de plasma rico en factores de crecimiento aceleró la maduración de la zona donante del injerto y que además disminuyó el dolor durante los primeros meses de evolución con diferencias significativas respecto al grupo control, confirmando la eficacia de dicho tratamiento. Demostraron que el uso de plasma rico en factores de crecimiento mejoró tanto la maduración como el dolor en las fases iniciales en la zona dadora (Seijas *et al.*, 2013).

### ***Reparación del manguito rotador***

La acción del PRP en las cirugías de reparación de los tendones del manguito rotador del hombro ha sido evaluada en varios estudios clínicos. En 2008, Maniscalco y colaboradores presentaron un caso clínico en el que aplicaron una membrana de PRP para reforzar la sutura de reparación del tendón supraespinoso. El paciente mostró una recuperación satisfactoria del rango de movilidad del hombro, acompañada de una

disminución del dolor. En la resonancia magnética de revisión realizada a los seis meses de la cirugía, se advirtió una recuperación favorable de la zona del tendón lesionado (Maniscalco *et al.*, 2008). Por su parte, Randelli y colaboradores (2008) realizaron un estudio prospectivo de los casos clínicos de 14 pacientes que fueron sometidos a cirugía artroscópica para la reparación de lesiones en el manguito rotador y que, posteriormente, recibieron una aplicación intraoperatoria de PRP combinada con trombina autóloga tras la reparación del tendón. Los pacientes fueron sometidos a rehabilitación estándar y reevaluados al transcurrir 1, 6, 12 y 24 meses. La administración de PRP no causó ningún efecto adverso y, a los 6 meses, se observó una reducción del dolor y un incremento de la funcionalidad de la articulación, comparado con los niveles previos a la cirugía. De nuevo, debemos destacar la inexistencia del grupo control (Randelli *et al.*, 2008). Estos mismos autores han realizado un nuevo estudio clínico prospectivo, aleatorio, controlado y a doble ciego con 53 pacientes operados mediante artroscopia para la reparación de desgarros totales del manguito rotador. Los pacientes del grupo tratado con PRP presentaron un menor grado de dolor durante los primeros días tras la cirugía y una mejor funcionalidad del hombro a los tres meses que los individuos del grupo control. Por contra, no se hallaron diferencias entre ambos grupos a los 6, 12 ó 24 meses. Tampoco presentaron diferencias en cuanto a la cicatrización del manguito rotador. A pesar de ello, los autores determinaron que el tratamiento con PRP resultaba positivo en la cicatrización del manguito rotador, y aceleraba la recuperación funcional de este tipo de lesiones (Randelli *et al.*, 2011). En un estudio de casos-control que incluyó 20 pacientes tratados artroscópicamente para la reparación del manguito rotador, Barber y colaboradores (2011) hallaron 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 en el que se evaluaron 88 pacientes durante 16 meses, Castricini y colaboradores (2011) no pudieron evidenciar que el tratamiento con PRP aportase beneficios en el tratamiento quirúrgico de los desgarros en el manguito rotador, ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratamiento y los grupos control. Los autores señalaron que sus

conclusiones eran válidas para desgarros de pequeño y mediano tamaño, pero que el empleo del PRP podría resultar beneficioso en desgarros masivos o de gran tamaño (Castricini *et al.*, 2011). De un modo similar, Jo y colaboradores (2011), en un estudio de casos-control que incluyó 42 pacientes, tampoco descubrieron diferencias destacables en la recuperación clínica entre los pacientes que recibieron el tratamiento con PRP y entre los que no (Jo *et al.*, 2011).

En 2008, Everts y colaboradores presentaron un estudio clínico prospectivo, aleatorio y doble ciego en pacientes sometidos a una descompresión subacromial mediante cirugía abierta. Encontraron que el grupo que fue tratado con PRP presentó una mejor recuperación funcional y menos dolor que el grupo control. En cambio, no se localizaron diferencias a los 2 años del tratamiento, lo que hace pensar que la respuesta clínica disminuye a medida que pasa el tiempo (Everts *et al.*, 2008).

Recientemente Ruiz-Moneo en 2013 no vio diferencias significativas al año de tratamiento en la reparación artroscópica del manguito rotador en un estudio clínico con 69 pacientes a doble ciego, en el que se utilizó PRGF tras la intervención (Ruiz-Moneo *et al.*, 2013).

### ***Lesiones tendinosas en caballos***

El tratamiento de determinadas lesiones tendinosas mediante el empleo de inyecciones de PRP ha experimentado un gran aumento en la medicina veterinaria equina, especialmente entre los especialistas en caballos de deporte (Textor, 2011). Los primeros estudios clínicos obtuvieron unos resultados muy prometedores. En 2008, Argüelles y colaboradores, publicaron un trabajo que comprendía cinco casos clínicos de caballos de deporte con lesiones tendinosas o ligamentosas que recibieron inyecciones intralesionales de PRP. Los animales que padecían tendinopatía del tendón flexor digital superficial presentaron mejoras tanto ecográficas como clínicas. Los ejemplares con desmitis crónica del ligamento suspensorio mostraron mejoras clínicas (los caballos estaban menos cojos) pero no ecográficas y volvieron a un nivel de rendimiento deportivo similar al que tenían antes de la lesión, transcurridos seis meses del tratamiento (Argüelles *et al.*, 2008). Waselau y colaboradores también hallaron

buenos resultados tras el uso de inyecciones de PRP en el tratamiento de desmitis del ligamento suspensorio en caballos de deporte (Waselau *et al.*, 2008).

En 2011, Torricelli y colaboradores analizaron la eficacia de una combinación de PRP junto con células mesenquimales derivadas de médula ósea en 13 caballos de competición que arrastraban lesiones musculoesqueléticas por sobreesfuerzo que no respondían a otras terapias. Los animales tratados con esta combinación experimentaron una mejora destacable en el grado de cojera, transcurridos 12 meses del tratamiento, y 11 de los 13 ejemplares pudieron volver a competir (Torricelli *et al.*, 2011).

En 2012, McCarrel y colaboradores en su estudio en tendones del flexor digital superficial de caballos adultos jóvenes observaron que el PRP con leucocitos aumentó la expresión de citocinas inflamatorias. Por ello, el mejor PRP para la estimulación de la cicatrización era el que no contenía leucocitos (McCarrel *et al.*, 2012).

### ***Conclusiones sobre el empleo de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas***

A lo largo de esta sección de la revisión bibliográfica, hemos podido observar que las aplicaciones de PRP pueden ser eficaces para el manejo de lesiones tendinosas. Entre las ventajas potenciales de este procedimiento podríamos destacar una recuperación más rápida y una mejor funcionalidad del tendón tras el tratamiento (Taylor *et al.*, 2011).

Por otro lado, a pesar de estos beneficios potenciales, las aplicaciones del PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas aún se encuentran en pleno proceso de estudio, y gran parte de estos efectos favorables no están apoyados por estudios biomecánicos. Es necesario que se desarrollen estudios clínicos con un diseño experimental consistente, que evalúen de manera concluyente el efecto de estas terapias tan prometedoras sobre los procesos de curación de las diferentes patologías del tendón, tanto agudas como crónicas o degenerativas.

## Complicaciones del uso clínico de PRP

En los últimos años, ha crecido la preocupación en cuanto a la posible existencia de riesgos potenciales asociados con las aplicaciones de PRP (Landesberg *et al.*, 1998). El empleo de sustancias para la activación de las plaquetas contenidas en el PRP fue una de las primeras causas de esta preocupación. En concreto, hablamos del uso de trombina bovina como agente activador del PRP. Varios investigadores han advertido que esta trombina bovina puede favorecer el desarrollo de anticuerpos frente a los factores de coagulación V y XI, y frente a la trombina humana, lo que podría desencadenar importantes coagulopatías que incluso harían peligrar la vida del paciente (Landesberg *et al.*, 1998). La mayoría de las metodologías de obtención del PRP recomiendan en la actualidad el empleo exclusivo de cloruro cálcico, o bien el uso de trombina humana, como agentes activadores del PRP (Anitua *et al.*, 2004).

La bioseguridad del PRP también ha sido objeto de preocupación para varios autores. En primer lugar, el 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, quedan descartados al tratarse de un producto autólogo (Mei-Dan *et al.*, 2010b). Por otro lado, algunos autores han abrigado preocupaciones sobre la estabilidad genética tras la aplicación de PRP y han propuesto la existencia de un posible efecto carcinogénico. De igual modo que los factores de crecimiento que encontramos en el organismo, los factores de crecimiento autólogos presentes en el PRP actúan sobre los receptores de la membrana celular, y no a nivel del núcleo celular. Esta unión a ciertos receptores de membrana provoca una serie de respuestas en la célula diana y, como resultado, se activa la expresión génica normal, y no normal, de determinadas proteínas (Mei-Dan *et al.*, 2010b). No existen referencias en la bibliografía actual que aporten pruebas científicas que relacionen la aplicación de PRP con la aparición de procesos de transformación neoplásica. Existe tan sólo un único artículo publicado a día de hoy que analice los efectos sistémicos de la aplicación local de PRP, y no aprecia variaciones destacables en los niveles séricos ni de citoquinas ni de factores de crecimiento (Banfi *et al.*, 2006).

El riesgo potencial de contaminación bacteriana existente en el PRP, y los problemas derivados tras su aplicación en la zona lesionada, es otra de las dificultades que acarrea su aplicación clínica (Vasconcelos *et al.*, 2003). Los métodos abiertos, como los de centrifugación en tubo, deben llevarse a cabo bajo las más estrictas medidas de asepsia, limitando su uso tras su extracción a unas pocas horas (de 4 a 6) (Weibrich *et al.*, 2005; Argüelles *et al.*, 2006). Estos sistemas abiertos presentan un mayor riesgo de contaminación bacteriana, pero no se relacionó este hecho con el desarrollo de infección, en un estudio clínico con un gran número de pacientes (Vasconcelos *et al.*, 2003). Incluso hay autores que señalan 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), a pesar de que dicha actividad bacteriostática no es comparable con la administración sistémica de antibióticos (Jia *et al.*, 2010). No obstante, en un caso clínico se ha indicado que el tratamiento con PRP



podría resultar de utilidad para el manejo de pacientes con osteomielitis (Yuan *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, no se han detectado efectos secundarios importantes asociados a la aplicación local de PRP en el tratamiento de lesiones musculotendinosas en los estudios clínicos publicados (Taylor *et al.*, 2011). Únicamente se ha señalado que, en alguna ocasión puntual, puede aparecer dolor asociado a la inyección de PRP y algo de inflamación local, controlado con la aplicación de hielo en la zona (Paoloni *et al.*, 2011). Se ha llegado a pensar que la aplicación de PRP inducía una fibrosis excesiva, ya que incrementaba la concentración de TGF- $\beta$ 1 en la zona de lesión, un factor de crecimiento asociado a la formación excesiva de tejido fibroso (Anitua *et al.*, 2007a). Sin embargo, el empleo de PRP sobre modelos experimentales *in vivo* ha demostrado que esto no ocurre así, y que posiblemente puedan existir otras moléculas que modulen el efecto fibrótico del TGF- $\beta$ 1 (Anitua *et al.*, 2006b).



## ***Material y Métodos***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Material y Métodos

En esta Tesis Doctoral realizamos un estudio experimental *in vivo*, aleatorio y controlado con placebo (solución salina) en el que se evaluó el efecto de la aplicación de PRGF sobre el proceso de cicatrización del tendón de Aquiles, previamente seccionado en su totalidad mediante un procedimiento quirúrgico. Los tendones fueron evaluados biomecánicamente al final del periodo de estudio.

En la sección de "Material y Métodos" se detallan los siguientes aspectos:

- Modelo animal.
- Diseño experimental. Modelo experimental *in vivo* de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.
  - Grupos de estudio.
  - Estabulación y hospitalización.

- Protocolo anestésico.
- Preparación del paciente.
- Procedimiento quirúrgico
- Obtención y aplicación de PRGF en el tendón de Aquiles en la especie ovina.
- Exámenes físicos durante el periodo de estudio.
- Obtención y procesado de las muestras.
- Estudio biomecánico.
- Estudio estadístico.

## Modelo animal

El animal elegido para nuestro estudio fue la oveja (*Ovis orientalis aries*). La especie ovina ha sido considerada como un buen modelo animal para la experimentación en ortopedia y se está convirtiendo en el modelo experimental más popular. Para 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 parezca a la del ser humano. Así podemos reproducir las diversas cargas biomecánicas que se desencadenan en la anatomía del modelo, de manera que los resultados obtenidos en estos estudios puedan ser extrapoladas a los seres humanos con el menor número de limitaciones posible (Martini *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2007).

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 está incluida como animal de experimentación y, por lo tanto, antes de iniciar cualquier estudio experimental fue necesaria la autorización previa y expresa de la autoridad competente. Por ello, el presente estudio se realizó bajo 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, y el Comité de Bioética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (España) certificó el estudio. Durante todo el proceso de

experimentación, las directrices formuladas por el National Institute of Health (NIH) referentes a la utilización y manejo de animales de experimentación fueron rigurosamente respetadas.

Todos los ejemplares utilizados procedieron de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba. El grupo experimental estuvo formado por 30 ovejas adultas con una edad comprendida entre 24 y 30 meses, cruce de raza Merino, nulíparas, no gestantes (confirmado mediante ecografía), y con un peso entre 50 y 55 kg. El hecho de que fueran hembras facilitó el manejo y evitó un excesivo sobrepeso. La ausencia de machos también nos permitió un mejor control del ciclo estral y, por tanto, una menor influencia de las variaciones hormonales.

Previamente a la inclusión de los animales en el estudio, se realizó un examen veterinario general a todos los ejemplares, realizando un examen general del animal y un examen ortopédico, con el objetivo de confirmar que las ovejas no presentaran enfermedad alguna ni problemas ortopédicos o de cojera. También se procedió a una analítica sanguínea basal, donde tanto los valores del recuento hematológico como la bioquímica sérica se encontraban dentro de los parámetros normales para esta especie. Todo animal que no superaba el examen físico, ortopédico o laboratorial quedaba excluido del estudio. Una vez finalizado este periodo previo de examen y selección se logró un grupo experimental de 30 animales (Figura 8).



**Figura 8. Parte del grupo de ovejas empleado para la realización de esta tesis doctoral.**

## Diseño experimental

### *Grupos experimentales y cronología del estudio.*

La fase experimental de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo sobre un total de 30 animales, aleatoriamente divididos en seis grupos de estudio, con cinco animales en cada uno, según el tipo de tratamiento y el tiempo de supervivencia del animal.

Según el tipo de tratamiento aplicado se dividieron en:

- **Grupo PRGF:** Pacientes a los que se le practicó la tenotomía completa del tendón de Aquiles, con sutura posterior y tratados con PRGF.
- **Grupo PCB:** Pacientes a los que se le practicó la tenotomía completa del tendón de Aquiles, con sutura posterior y fueron tratados con solución salina (SSF).

Según el tiempo de supervivencia se dividieron en:

- **2 semanas:** 5 animales tratados con PRGF y 5 animales tratados con SSF.
- **4 semanas:** 5 animales tratados con PRGF y 5 animales tratados con SSF.
- **8 semanas:** 5 animales tratados con PRGF y 5 animales tratados con SSF.

Todos los animales fueron tratados semanalmente durante las tres primeras semanas, de forma que fueron 4 las dosis máximas recibidas de PRGF (en los animales de los grupos PRGF) o SSF (en los animales del grupo PCB) en función del tiempo de supervivencia. Los dos grupos experimentales que alcanzaron las ocho semanas de tratamiento, no recibieron ningún tipo de aplicación después de la tercera semana, y los pacientes que fueron sacrificados a los 15 días sólo recibieron 2 infiltraciones con el tratamiento asignado.

De manera que, finalmente, los pacientes quedaron distribuidos en 6 grupos diferentes (Tabla 3). En cada uno de los animales se trató sólo uno de los tendones según el grupo asignado y el otro tendón quedó intacto para el posterior estudio biomecánico como control.



**Tabla 3. Distribución de ovejas por grupo y tiempo.**

	2 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS
GRUPO PCB	5	5	5
GRUPO PRGF	5	5	5
ANIMALES TOTALES	10	10	10

Durante el periodo postoperatorio, los animales de los diferentes grupos de estudio fueron controlados semanalmente. Estos controles consistían en un examen físico general y una exploración ortopédica.

### *Estabulación y hospitalización*

La Granja Experimental de la Universidad de Córdoba albergó las ovejas en un establo con una parte exterior y otra interior como marca la legislación vigente (Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre) (Figura 9).



**Figura 9: Estabulación en las instalaciones (patio interior) de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba.**

La alimentación consistió en agua disponible, heno, paja y concentrado. Los animales fueron trasladados al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba durante un periodo de adaptación de tres días antes de la intervención quirúrgica. La semana siguiente a la operación, las ovejas permanecieron en las instalaciones del Hospital

Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, con el objetivo de recibir cuidados en el periodo postoperatorio más temprano. Transcurrida la primera semana, volvieron a la Granja Experimental, donde permanecieron hasta el final del estudio. Los animales eran alimentados y cuidados de manera rutinaria, siempre por el mismo personal, para que se acostumbrasen al manejo y la manipulación durante el periodo postoperatorio.

### *Protocolo anestésico y control preoperatorio*

En la especie ovina resulta importante mantener un buen periodo de ayuno para intentar minimizar los problemas de regurgitación y timpanismo durante la cirugía y durante el periodo postoperatorio. De este modo, los animales se mantuvieron en ayunas de alimento sólido durante 36 horas antes de comenzar con el manejo preoperatorio, y el ayuno de agua fue de seis horas. Antes de iniciar la preparación preanestésica, los animales fueron pesados e identificados.

Ya en la sala de preanestesia, después de proceder a la inmovilización del animal, se rasuró el cuello y se cateterizó la vena yugular externa empleando un catéter de 14G (Vasocan® 14G 50 x 2,2mm; BBraun, Melsungen, Alemania) (Figura10).

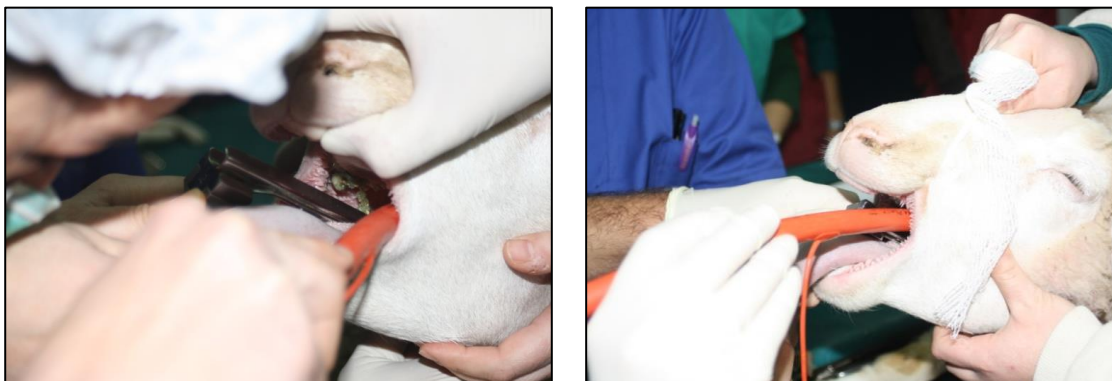


**Figura 10. Cateterización de la vena yugular externa para la administración intravenosa de los agentes preanestésicos.**

El catéter se fijó a la piel con un dos puntos de sutura de seda (Silkam® 2-0; BBraunAesculap, Tuttlingen, Alemania). Como fluidoterapia durante la anestesia, se empleó Ringer Lactato a un ritmo de infusión de 10 mL/kg/hora (LR®; BBraunVetCare, Barcelona, España). Los animales fueron premedicados con dexmedetomidina 4 µg/kg IV (Dexdomitor® 0,5 mg/mL; OrionPharma, Espoo, Finlandia), y morfina 0.2 mg/kg IV

(Cloruro mórfico 2%, BBraun, Melsutgen, Alemania). Se administró una dosis única de cefazolina 20 mg/kg IV (Kurgan<sup>®</sup> 1gr; Laboratorios Normon, Madrid, España) como antibiótico preoperatorio.

Transcurridos 15 minutos de la administración de los fármacos preanestésicos, se procedió a la inducción anestésica con propofol a razón de 3 mg/kg IV (Propofol-Lipuro<sup>®</sup> 1%; BBraunVetCare, Barcelona, España). El animal fue colocado en la mesa de cirugía en decúbito esternal con el cuello estirado. Para la intubación endotraqueal, fue preciso contar con un laringoscopio especial de pala larga y recta, una sonda endotraqueal del número 12 con neumo-taponamiento y un fiador metálico, que aportó rigidez a la sonda y facilitó su manipulación (Figura 11). Con la oveja ya intubada, la anestesia se mantuvo empleando isofluorano vaporizado en O<sub>2</sub> al 100%, a una concentración inspirada de 1,4% - 1,5% (Isoflo<sup>®</sup>; 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<sup>®</sup>; Datex-Ohmeda, GE Healthcare, Helsinki, Finlandia).



**Figura 11.** La intubación endotraqueal es difícil en esta especie debido a que la glotis se encuentra alejada de la entrada de la boca. Se utiliza un laringoscopio de pala larga y un fiador metálico introducido por la luz del tubo endotraqueal para ayudar a dirigirlo hacia el interior de la tráquea.

### *Preparación quirúrgica del paciente*

En la preparación aséptica para la cirugía, se rasuró la extremidad posterior derecha desde proximal a la rodilla hasta la articulación metatarsofalángica. La zona distal a la articulación metatarsofalángica 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 se mantuvo en suspensión durante el resto de la preparación prequirúrgica. Se desengrasó la piel con alcohol y, seguidamente, se limpió el campo quirúrgico con povidona yodada (Braunol®; BBraunVetCare, Barcelona, España). La extremidad fue aislada con paños de campo estériles. Los principios de la técnica aséptica fueron estrictamente respetados tanto en la preparación del campo operatorio como durante el procedimiento quirúrgico (Figura 12).



**Figura 12. Extremidad colgada del techo, delimitando el campo quirúrgico mediante paños de campo estériles. La zona distal de la extremidad se cubre con vendas cohesivas estériles respetando las normas de asepsia.**

### *Procedimiento quirúrgico*

Todo el protocolo quirúrgico siguió los pasos descritos en estudios anteriores (Fernández *et al.*, 2013). Con el objetivo de conseguir un protocolo quirúrgico lo más homogéneo posible, todas las cirugías fueron realizadas por el mismo equipo de cirujanos. Se realizó una incisión sobre la piel para proceder al abordaje quirúrgico del tendón de Aquiles en su zona lateral, que comenzó dos centímetros proximales a la tuberosidad del calcáneo y se extendió ocho centímetros proximalmente (Figura 13). El tendón se liberó de la fascia que lo rodeaba, y el peritendón se incidió

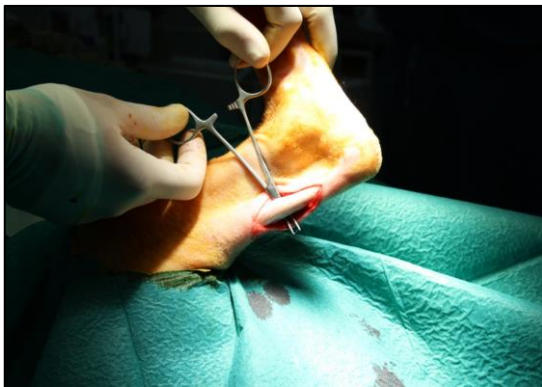
longitudinalmente (Figura 14), exponiendo netamente del tendón de Aquiles (Figura 15). Con ayuda de una regla quirúrgica, se señaló un punto situado cinco centímetros proximalmente a la inserción del tendón de Aquiles en la tuberosidad del calcáneo, punto en el que se realizaría la tenotomía (Figura 16).



**Figura 13.** Incisión cutánea de 8 cm en la zona lateral de la piel que recubre el tendón de Aquiles.



**Figura 14.** Disección de la fascia que recubre el tendón de Aquiles.



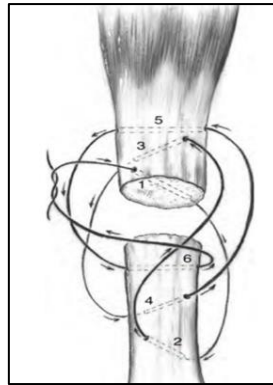
**Figura 15.** Exposición del tendón de Aquiles.



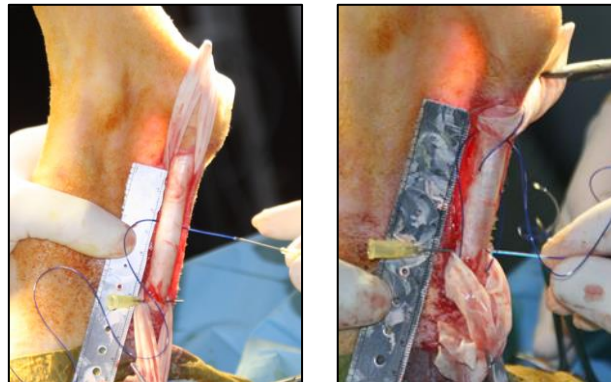
**Figura 16.** Localización y marcado de la zona de tenotomía.

Mediante un patrón en triple polea, se realizó la pre-sutura del tendón previa a la creación del defecto quirúrgico (Figura 17). Este patrón consistió en tres lazadas orientadas  $120^\circ$  entre sí y colocadas a diferente altura. La lazada inicial se colocó en forma cerca (1cm desde el punto de tenotomía) – lejos (3 cm desde el punto de tenotomía). La segunda lazada fue ubicada en un plano de  $120^\circ$  en relación a la primera, en un punto a mitad de camino entre las posiciones cerca y lejos (2cm desde el punto de la tenotomía). La lazada final fue situada en un patrón lejos – cerca, a  $120^\circ$  de

las dos primeras (Figura 18). El material de sutura usado fue un monofilamento sintético no reabsorbible de polipropileno (Premilene® USP 1; BbraunAesculap, Tuttlingen, Alemania). La pre-sutura del tendón se realizó con el objetivo de facilitar la reconstrucción del defecto tendinoso una vez realizada la tenotomía, y conseguir una correcta aposición de los bordes tendinosos.



**Figura17. Patrón en triple polea para la sutura del tendón.**

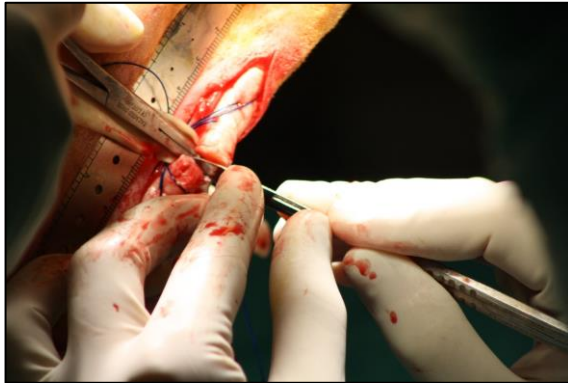


**Figura 18. Pre-sutura del tendón. Se realizan las diferentes lazadas que conforman el patrón en triple polea. Cada una de las lazadas se coloca en un plano de 120° con respecto a la lazada previa, de modo que estas nunca quedarán en el mismo plano.**

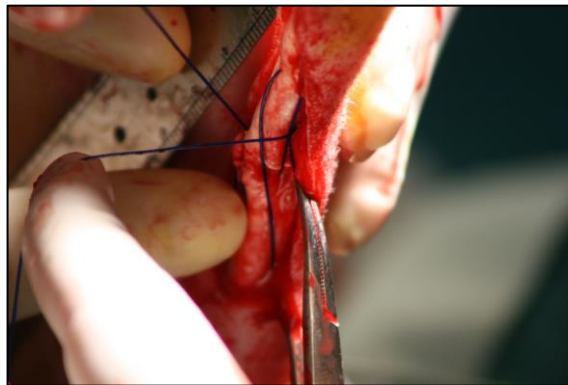
Se llevó a cabo una tenotomía completa que incluyó todos los componentes del tendón de Aquiles de la oveja (tendón accesorio, tendón gastrocnemio y tendón flexor digital superficial). Para ello, se utilizó una hoja de bisturí del número 22 (ScalpelBlade No. 22, BbraunAesculap®, Tuttlingen, Alemania). Para no cortar el material de sutura, se apartaron las diferentes lazadas del patrón en triple polea (Figura 19). Tras la realización de la tenotomía, se anudó el patrón en triple polea, cuidando que los bordes tendinosos



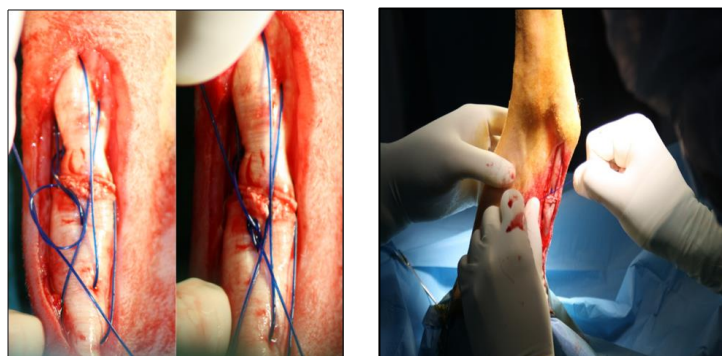
quedasen posicionados de manera adecuada y sin hueco entre ellos (Figura 20 y Figura 21).



**Figura 19. Tenotomía completa del tendón de Aquiles, a 5 cm de la inserción del tendón en el calcáneo, apartando hacia un lado las lazadas de la triple polea.**

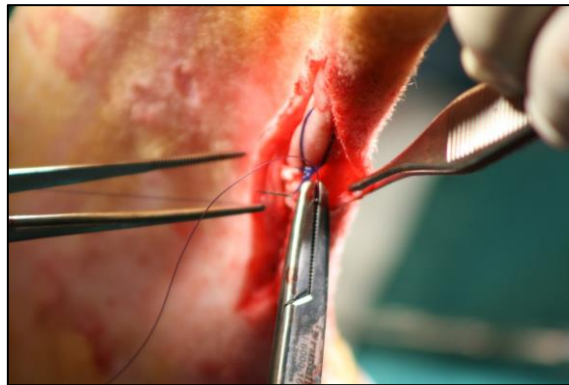


**Figura 20. Recolocación de las lazadas de la triple polea y aproximación de los dos bordes tendinosos recién cortados.**



**Figura 21. Anudado de la sutura. Nos aseguramos de que los bordes de la tenotomía queden perfectamente posicionados.**

El peritendón fue reparado mediante un patrón simple continuo con material monofilamento sintético reabsorbible de poligluconato (Monosyn® 3-0; BbraunAesculap, Tuttlingen, Alemania) (Figura 22). El tejido subcutáneo se suturó siguiendo un patrón simple continuo con material monofilamento sintético reabsorbible de poligluconato (Monosyn® 2-0; BbraunAesculap, Tuttlingen, Alemania). El último paso consistió en cerrar la piel con puntos simples discontinuos usando monofilamento no reabsorbible de poliamida (Dafilon® 2-0; BbraunAesculap, Tuttlingen, Alemania) (Figura 23). El corte se limpió con povidona yodada (Braunol®; BbraunVetCare, Barcelona, España) y se cubrió con un apósito estéril.



**Figura 22. Sutura del peritendón mediante un patrón simple continuo.**



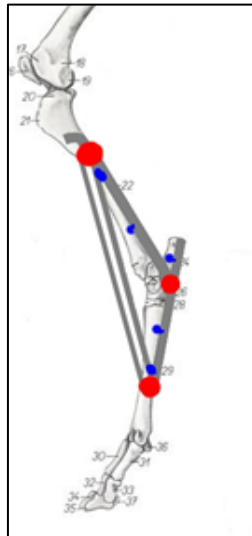
**Figura 23. Cierre cutáneo con un patrón simple discontinuo.**

### ***Inmovilización postoperatoria del tendón de Aquiles***

En este modelo experimental, fue importante proteger la reparación del tendón durante el periodo postoperatorio, por lo que se diseñó un sistema que permitiese al



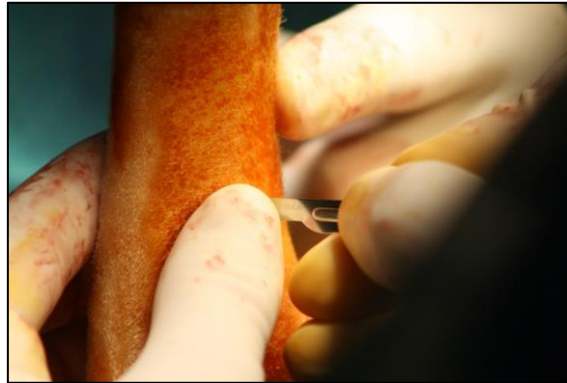
animal apoyar peso sobre la extremidad sin provocar cambios en la longitud del tendón de Aquiles o macromovimientos capaces de comprometer la integridad de la sutura. Se trató de un fijador externo transarticular tarsal modificado (T-TAESF) (Figura 24), un dispositivo similar al que emplearon Skerry y Lanyon para inmovilizar el tarso de ovejas y obtener 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.



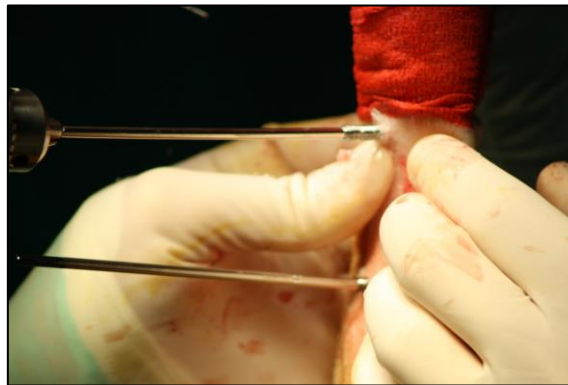
**Figura 24. Esquema del fijador externo transarticular de tarso (T-TAESF) utilizado para proteger el tendón de Aquiles durante el periodo postoperatorio.**

En la cara medial de la extremidad posterior derecha se colocó el T-TAESF en configuración unilateral-uniplanar. Se realizaron 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 estos cortes se disecaron la fascia y el tejido subcutáneo con ayuda de unas pinzas mosquito hasta evidenciar la superficie ósea (Figura 25). También se procedió a un pre-taladrado de los orificios con una broca de 2.5 mm (Veterinary Instrumentation®; Sheffield, Reino Unido). En cada orificio se introdujo una aguja de 3.0 mm con rosca positiva en la punta (VeterinaryInstrumentation®; Sheffield, Reino Unido) (Figura 26). De un modo parecido, se insertaron otras dos agujas similares en la cara medial del metatarso, que

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.



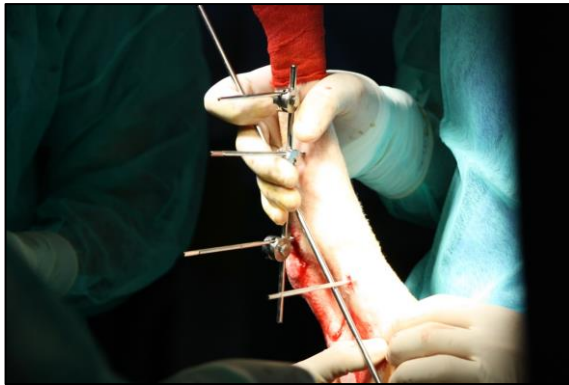
**Figura 25. Incisiones cutáneas en el punto donde se coloca la aguja.**



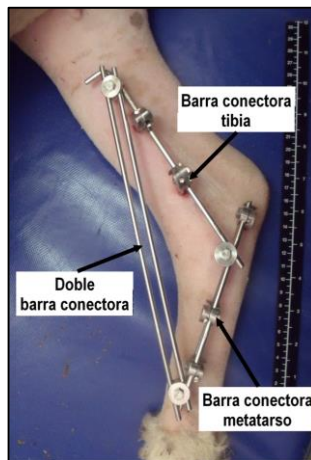
**Figura 26. Colocación de las agujas de punta roscada positiva de 3.0 mm.**

El T-TAESF fue ensamblado gracias a unas barras conectoras de 4 mm de acero inoxidable (Veterinary Instrumentation<sup>®</sup>; Sheffield, Reino Unido) unidas a las agujas mediante un sistema de rótulas Meynard de 3.0 mm x 4.0 mm (Veterinary Instrumentation<sup>®</sup>; Sheffield, Reino Unido). Las dos agujas de la tibia se acoplaron a una misma barra conectora (barra conectora de la tibia), mientras que las dos agujas del metatarso junto con la aguja del calcáneo se ensamblaron a otra barra conectora (barra conectora del metatarso) (Figura 27). Para impedir el deslizamiento de las rótulas y el desajuste del sistema, se dobló el extremo proximal de la barra conectora de la tibia. 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<sup>®</sup>; Sheffield, Reino Unido). El extremo proximal

de la barra conectora de la tibia fue unido al extremo distal de la barra conectora del metatarso merced a la colocación de dos barras conectoras paralelas entre sí, y unidas mediante rótulas barra-doble barra de 4.0 mm x 4.0 mm (Figura 28), que incrementaban 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.



**Figura 27. Unión de las agujas a las barras conectoras de la tibia y del metatarso. Ambas barras conectoras se unen entre sí por medio de una rótula de Meynard de 4.0 mm x 4.0 mm, formando un ángulo de 140°.**



**Figura 28. Consolidación del montaje mediante la colocación de dos barras conectoras de 4 mm. entre la barra conectora de la tibia y la del metatarso con rótulas de Meynard de 4.0 mm x 4.0 mm.**

Los orificios de entrada de las agujas se limpiaron con povidona yodada (Braunol®; BBraunVetCare, Barcelona, España) y se cubrieron con gasas estériles, después de apretar adecuadamente todas las rótulas. Para evitar auto-traumatismos de los animales

e impedir que el fijador se golpee o enganchese con la malla metálica del establo, el T-TAESF fue revestido con un vendaje protector (Figura 29).



***Figura 29. Protección del T-TAESF mediante un vendaje para evitar que los animales se lesionen con las barras conectoras.***

Los animales, tras ser extubados, fueron trasladados a una sala de recuperación anestésica y vigilados hasta que se mantuvieron en pie por sí mismos. Al término de 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<sup>®</sup> LA; Virbac Salud Animal, Barcelona, España), que se volvió a repetir transcurridas 72 horas. Con el objeto de garantizar una correcta cobertura analgésica se empleó buprenorfina 0.02 mg/kg/8h IM (Buprex<sup>®</sup> 0.3 mg; Shering-Plough, Madrid, España) durante los cinco días siguientes a la cirugía. No se aplicó ningún fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ni corticoesteroides que pudiesen interferir con los procesos inflamatorios que participan en el mecanismo de reparación tisular.

Los cuidados postoperatorios (cambio del vendaje, desinfección y evaluación de la herida quirúrgica) realizados durante la semana siguiente a la cirugía se llevaron a cabo diariamente en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba. Posteriormente, los animales regresaron a la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba, donde continuaron los cuidados postoperatorios semanales durante todo el experimento.

## **Obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles de la oveja**

En la revisión bibliográfica hemos podido comprobar que actualmente existe una enorme cantidad de derivados sanguíneos autólogos ricos en plaquetas, todos ellos comúnmente denominados PRP, y obtenidos mediante diferentes metodologías. Esta disparidad en el protocolo de obtención del PRP provoca diferencias significativas en su formulación, tanto desde el punto de vista de su composición celular como de su concentración de factores de crecimiento (Anitua *et al.*, 2009a; DohanEhrenfest *et al.*, 2009; Engebretsen *et al.*, 2010). Con el fin de definir con la mayor precisión posible el protocolo de obtención del PRP seguido en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, hemos empleado PRGF (PRGF-Endoret® System, BTI® Biotechnology Institute, Vitoria, España) siguiendo el mismo método descrito por Fernández en su tesis doctoral (2012). El PRGF es un tipo de PRP caracterizado principalmente por ser una fracción plasmática autóloga con una concentración moderada de plaquetas (1,5 a 3 veces la concentración en sangre periférica), pobre en leucocitos y eritrocitos, con un proceso de obtención sencillo y rápido (proceso de centrifugación único), y que emplea citrato de sodio como anticoagulante y cloruro de calcio al 10% como activador plaquetario (Anitua *et al.*, 2009a). Este mismo sistema de obtención de PRGF ha sido empleado con éxito en la especie ovina por Anitua y colaboradores (Anitua *et al.*, 2006b).

### ***Obtención del PRGF en la especie ovina***

La metodología de preparación del PRGF fue realizada siguiendo las instrucciones del laboratorio que ha desarrollado el uso terapéutico 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).

### **Extracción de sangre**

Para cada aplicación semanal de PRGF se procedió a la extracción de cuatro tubos de sangre entera de la vena yugular externa de cada animal, mediante un sistema cerrado con aspiración por vacío (BD Vacutainer®, BectonDickinson Company, Madrid, España). Los tubos tenían una capacidad de 5 mL, y contenían 0.5 mL de citrato de sodio (3.8%)

como anticoagulante (BTI<sup>®</sup> ExtractionTube, BTI<sup>®</sup> Biotechnology Institute, Vitoria, España). Justo antes de administrar los fármacos preanestésicos, se procedió a la extracción de sangre, con el animal correctamente inmovilizado pero sin ningún tipo de sedación. Todas las extracciones de sangre se efectuaron por la mañana, en 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.

### Protocolo de centrifugación

Es necesario someter la sangre a un proceso de centrifugación para efectuar el aislamiento del PRGF. Los cuatro tubos de una misma oveja llenos de sangre se centrifugaron de manera inmediata, o en un máximo de una hora tras la extracción, mediante una centrífuga comercializada también por la empresa BTI (BTI<sup>®</sup> Biotechnology Institute, Vitoria, España). Esta centrífuga consta de un rotor oscilante a 90°, de modo que cuando comienza a centrifugar mantiene los tubos en posición horizontal (Figura 30). Esto hace que, tras el proceso de centrifugación, la interfase entre plasma y componente celular quede perfectamente horizontal, facilitando así el posterior proceso de pipeteo. Este protocolo requiere de un único proceso de centrifugación, a diferencia de otras metodologías que necesitan dos centrifugaciones a diferente velocidad (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich *et al.*, 2003; Weibrich *et al.*, 2005). Los parámetros de centrifugación empleados en este estudio habían sido previamente descritos por Anitua y colaboradores para obtener el PRGF en ovejas (Anitua *et al.*, 2006b), y fueron 630G durante 8 minutos.

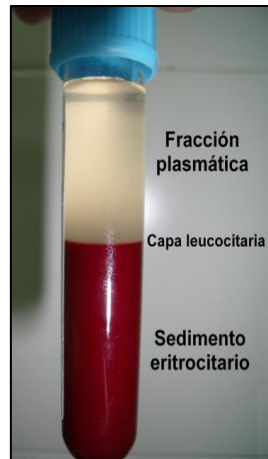


**Figura 30. Centrifugado de la sangre a 630 G durante 8 minutos.**

## Aislamiento del PRGF

Tras el proceso de centrifugación de la sangre, se produjo una separación entre la fase plasmática y el componente celular, compuesto en su mayoría por eritrocitos. Los leucocitos, debido a su densidad inferior, se dispusieron en una interfase situada inmediatamente por encima del sedimento de eritrocitos, conocida con el nombre de "buffycoat" (Figura 31). Tras el protocolo de centrifugación, las plaquetas, debido a que poseen una densidad inferior que los leucocitos, quedaron alojadas en la fracción plasmática situada inmediatamente por encima de los leucocitos, fracción que recibe el nombre genérico de PRP. Algunos autores sostienen que la densidad de las plaquetas más jóvenes es ligeramente superior y, por lo tanto, más parecida a la de leucocitos e incluso eritrocitos. Este hecho hace que, tras el proceso de centrifugación, una cantidad variable de plaquetas queden alojadas en la capa leucocitaria o incluso en las porciones superiores del sedimento eritrocitario (Marx *et al.*, 1998).

El aislamiento del PRGF continuó con un proceso de pipeteo fragmentado de la fracción plasmática obtenida tras el centrifugado de los cuatro tubos, realizado en una campana de flujo laminar (TelstarmicroV<sup>®</sup>. Telstar Science Solutions, Terrasa, España), con guantes estériles, gorro y mascarilla. Los accesorios que entraron en contacto con el PRGF, entre ellos pipetas regulables y puntas de pipetas, estaban previamente esterilizados (Figura 32). El respeto de las normas de asepsia, para evitar así la contaminación bacteriana del PRGF, era esencial a la hora de realizar estos procedimientos. También era fundamental 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. Con tal de minimizar el grado de variabilidad en el procedimiento debido al operador, todos los procesos de pipeteo fraccionado del plasma para la obtención de PRGF fueron realizados por el mismo investigador.



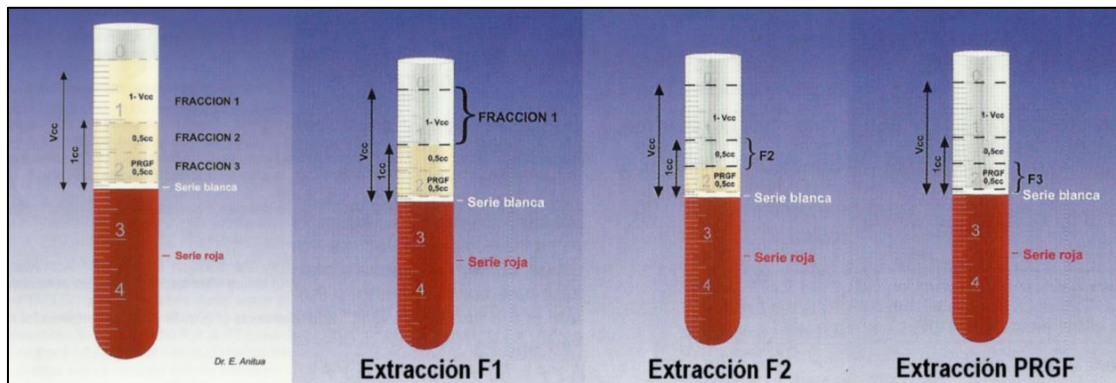
***Figura 31. Tras el proceso de centrifugado la fracción plasmática y el sedimento eritrocitario quedan separados por una delgada capa leucocitaria o “buffycoat”.***



***Figura 32. Campana de flujo laminar para el proceso de pipeteo de la fracción plasmática en el aislamiento del PRGF empleando material estéril y respetando estrictamente las normas de asepsia.***

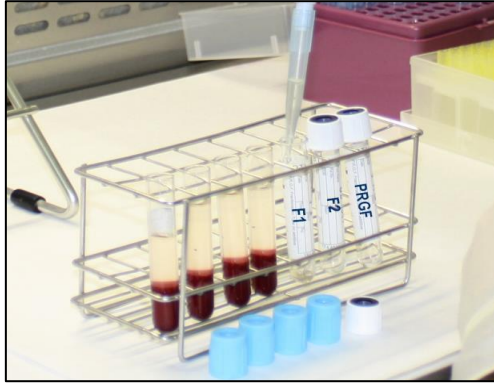
A lo largo de todo el proceso de pipeteo de la fracción plasmática fue necesario ser muy meticuloso y cuidadoso para evitar crear turbulencias que pudieran entremezclar las diferentes interfases. Según la metodología descrita por BTI® para el aislamiento de PRGF a partir de tubos de 5 mL, el PRGF era un volumen de 0.5 mL de plasma situado inmediatamente por encima de la capa leucocitaria. Seguidamente, describimos el proceso de fraccionamiento plasmático, para finalmente aspirar y aislar el PRGF (Figura 33).





**Figura33. Procedimiento de fraccionamiento del plasma para la obtención del PRGF, según las instrucciones de BTI®. Primero se aspira el plasma situado más superficialmente (F1) y que corresponde al volumen total de plasma menos 1 mL. A continuación, se extrae la F2, que serían los siguientes 0.5 mL. Por último, se aíslan los 0.5 mL que quedan justo por encima de la capa leucocitaria. Esta última fracción constituye el PRGF.**

El primer paso fue observar el volumen de plasma obtenido con ayuda de la graduación indicadora que poseen los tubos de extracción (BTI® ExtactionTube, BTI® Biotechnology Institute, Vitoria, España). Esta cantidad de plasma varió dependiendo del hematocrito de cada animal, pero se situó en torno al 50% del volumen de sangre extraído. Con ayuda de una micropipeta regulable que aspira un volumen de 500  $\mu$ L (Nichipet® EX 100~1000  $\mu$ L, Nichiryō Co., Tokio, Japón) y usando una punta de pipeta estéril, se extrajo la fracción plasmática superior, consistente en un volumen igual al volumen total de plasma menos 1 mL. Las diferentes fracciones plasmáticas se fueron aspirando de arriba hacia abajo, manteniendo en todo momento la punta de la pipeta en la zona plasmática superior. El primer volumen de plasma extraído es conocido como fracción F1 (o Plasma Pobre en Plaquetas). Tras repetir el mismo procedimiento en los cuatro tubos de un mismo ejemplar, las fracciones F1 de cada uno de los tubos fueron depositadas en unos tubos de fraccionamiento plasmático con interior estéril (BTI® FractionationTube, BTI® Biotechnology Institute, Vitoria, España) (Figura 34).



**Figura 34. Diferentes fracciones plasmáticas aisladas de cada uno de los cuatro tubos depositadas en un tubo estéril correctamente identificado.**

A continuación, se efectuó la separación de la fracción F2, a la que le correspondían con los siguientes 500  $\mu\text{L}$ . Para ello, se empleó de nuevo la micropipeta regulable con un volumen de aspiración de 500  $\mu\text{L}$ . Las fracciones F2 de cada uno de los cuatro tubos extraídos a cada paciente fueron reunidas en un mismo tubo de fraccionamiento correctamente identificado. Por último, con una micropipeta regulable que aspira un volumen de 100  $\mu\text{L}$  (Nichipet<sup>®</sup> EX 20~200  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}$  que quedan justo por encima de la capa leucocitaria y, por lo tanto, se realizó cinco veces este proceso de aspirado para extraer los 500  $\mu\text{L}$  que componían esta última fase. Durante la extracción de esta fase plasmática fue fundamental evitar las turbulencias y, especialmente, evitar el aspirado tanto de hematíes como leucocitos. Teóricamente, esta fracción plasmática es la más rica en plaquetas y en factores de crecimiento. Las fracciones correspondientes al PRGF de cada uno de los cuatro tubos de un mismo paciente fueron depositadas 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  $\mu\text{L}$  por tubo).

### **Activación del PRGF**

La activación de las plaquetas contenidas en el PRGF se realizó usando exclusivamente cloruro de calcio (Cloruro de Calcio 10%<sup>®</sup> BBraun Medical, Barcelona, España), de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio que desarrolló el empleo

terapéutico del PRGF (BTI<sup>®</sup> Biotechnology Institute, Vitoria, España). De modo que se utilizaron 50 µL de cloruro de calcio al 10% 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.

### **Aplicación del PRGF en la zona lesionada**

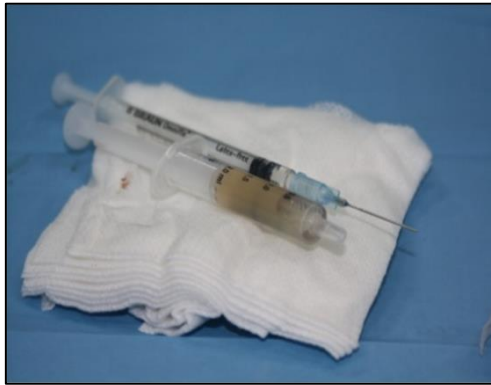
Existen diversas formas de realizar las aplicaciones de PRP en el tendón lesionado. Algunos estudios han planteado la aplicación de matrices de PRP envolviendo la zona de la reparación quirúrgica del tendón (Sánchez *et al.*, 2007); por otro lado, otros estudios han propuesto la infiltración de PRP en torno a los bordes del tendón lesionado (Schepull *et al.*, 2011). Nosotros nos decidimos por la aplicación del PRGF activado en forma líquida mediante infiltración en los bordes tendinosos (Fernández *et al.*, 2012).

Todavía hoy no encontramos unanimidad respecto a si el proceso de cicatrización tendinoso se beneficia más con una única aplicación de PRP, o bien mediante varias aplicaciones repetidas (Andía *et al.*, 2010). En nuestro estudio se procedió a una inyección intraoperatoria de PRGF, y posteriormente se realizaron tres inyecciones más en las tres semanas siguientes de PRGF. En nuestro trabajo, realizamos la aplicación de PRGF de un modo similar al que habían empleado previamente Anitua y colaboradores (2006) en su estudio acerca del efecto del PRGF sobre el tendón de Aquiles en un modelo experimental ovino, en el que emplearon infiltraciones tendinosas repetidas semanalmente (Anitua *et al.*, 2006).

### **Aplicación intraquirúrgica del PRGF**

Previamente a la preparación preanestésica, se procedió a extraer la sangre para la preparación del PRGF, de modo que el centrifugado y aislamiento del PRGF se llevó a cabo al mismo tiempo que se realizaba la cirugía. Tras la sutura del peritendón, se procedió a la activación y aplicación del PRGF. El volumen de 2 mL de PRGF contenido en el tubo de fraccionamiento correspondiente fue cargado en una jeringa estéril de 2 mL (Jeringa Injekt<sup>®</sup> 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  $\mu$ L/mL de PRGF), que se cargó en una jeringuilla de insulina (Jeringa Omnifix<sup>®</sup> 1 mL, BBraun Medical, Barcelona, España) con una aguja de 23G (Aguja Sterican<sup>®</sup> 23G, BBraun Medical, Barcelona, España) (Figura 35). El cloruro de calcio se colocó dentro de la jeringa que contenía el PRGF, y se agitó suavemente (Figura 36). En ese instante comenzó el proceso de activación plaquetaria, y el PRGF empezó a gelificar. La gelificación del PRGF conlleva un tiempo variable, que depende fundamentalmente de la temperatura a la que se encuentre la mezcla. Por ello, si nuestra intención es realizar una aplicación de PRGF activado en su forma líquida, no podemos demorar la inyección tras su activación, ya que si el PRGF se gelifica en el interior de la jeringa no será posible su inyección a través de la aguja.



***Figura 35. Presentación de las jeringas con los 2 mL de PRGF y el volumen de cloruro de calcio necesario para la activación plaquetaria.***



***Figura 36. Introducción del cloruro de calcio en el interior de la jeringa que contiene el PRGF. Antes de la inyección intratendinosa del PRGF activado es necesario eliminar todo el aire y burbujas del interior de la jeringa.***

Tras la activación del PRGF, se procedió a su inyección en los bordes tendinosos recién reparados, empleando para ello una aguja de calibre 23G. Esta primera aplicación intraoperatoria del PRGF se realizó mediante inspección directa, de modo que el cirujano infiltró un volumen de un mililitro en cada uno de los bordes tendinosos previamente suturados. La infiltración intratendinosa se realizó pinchando el tendón y depositando una pequeña cantidad de PRGF; a continuación, se redirigía la aguja en el interior del tendón y se colocaba de nuevo otra pequeña cantidad de PRGF; así sucesivamente hasta conseguir infiltrar todo el borde tendinoso (Figura 37). Una vez terminada la infiltración se procedía al cierre del plano subcutáneo y piel.



**Figura 37. Aplicación intraquirúrgica del PRGF realizada tras la sutura del peritendón. Los dos bordes tendinosos recién suturados se infiltran empleando una aguja de 23G.**

En los tendones constituyentes del grupo placebo, las aplicaciones se realizaron en forma y volúmenes similares, en esta ocasión con Suero Salino Fisiológico (NaCl 0.9%®; BBraunVetCare, Barcelona, España).

### ***Aplicaciones del PRGF durante el periodo postoperatorio***

Durante el periodo postoperatorio se llevaron a cabo tres aplicaciones de PRGF, con periodicidad semanal, del mismo modo que en el trabajo publicado previamente por Anitua y colaboradores (Anitua *et al.*, 2006b), y por Fernández y colaboradores (2013). Estas aplicaciones postoperatorias de PRGF consistieron en la inyección intratendinosa de PRGF activado en forma líquida y bajo control ecográfico.

Los animales fueron sedados y correctamente inmovilizados para realizar las aplicaciones postoperatorias del PRGF. 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, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. La zona que recubría el tendón de Aquiles fue rasurada y limpiada con clorhexidina jabonosa (Desinclor® Solución jabonosa, Grupo AGB, Madrid, España). Tras retirar gran parte de la materia orgánica, la piel era preparada con las adecuadas medidas de asepsia para llevar a cabo la inyección intratendinosa. Para ello, la piel se limpió usando gasas impregnadas en clorhexidina (Desinclor® Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España). El tendón de Aquiles se examinó ecográficamente y se localizó la zona de la reparación quirúrgica. Seguidamente, se activó el PRGF con el cloruro de calcio y se inyectó de manera ecoguiada, depositando la dosis de PRGF justo en la zona de la lesión tendinosa, donde previamente se había realizado la lesión. Las infiltraciones intratendinosas se realizaron usando una aguja de 23G. Se atravesaba la piel hasta llegar al tendón y se depositaba una pequeña cantidad de PRGF. A continuación, siempre bajo guía ecográfica, se redirigía la aguja y se depositaba nuevamente PRGF, repitiendo el procedimiento hasta infiltrar toda la zona de lesión con los 2 mL de PRGF. Nunca transcurrió más de una hora entre la extracción de la sangre y la aplicación del PRGF. Con el objetivo de minimizar la variabilidad entre tratamientos debida al efecto del operador, todas las aplicaciones ecoguiadas de PRGF fueron realizadas por el mismo investigador, siguiendo la misma metodología de trabajo.

Al igual que en la inyección quirúrgica, los animales del grupo placebo fueron infiltrados semanalmente siguiendo la misma metodología pero con Suero Salino Fisiológico.

### **Exámenes físicos durante el periodo de estudio**

Los exámenes generales y ortopédicos de los animales se llevaron a cabo todas las semanas durante el periodo postoperatorio, realizados siempre por el mismo investigador. El objetivo era evaluar el estado de salud de los animales para detectar posibles procesos sistémicos que pudiesen estar asociados con algún tipo de enfermedad sistémica o infección local. Para ello, se comprobaron las constantes vitales

de los animales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura corporal, estado de carnes, tiempo de rellenado 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. Cualquier anomalía en el estado de salud general de los animales quedaba registrada en su historial de seguimiento, y en caso de devaluación del estado de salud del paciente superior a un 10%, éste quedaría fuera del estudio. En estos exámenes físicos también se evaluó el proceso de cicatrización de la herida quirúrgica y de los orificios de las agujas del fijador externo (signos de infección, seroma, exudado, dehiscencia de las suturas, sangrado). De igual modo, el T-TAESF también era inspeccionado semanalmente para comprobar su integridad y buen funcionamiento. Toda complicación relacionada con el procedimiento quirúrgico, con las inyecciones intra-tendinosas de PRGF o con el T-TAESF quedaba registrada en el historial de seguimiento.

### **Obtención y procesado de las muestras**

Los animales fueron sacrificados a las 2, 4 u 8 semanas de la cirugía, dependiendo del grupo al que perteneciesen. La eutanasia se realizó de manera humanitaria, siguiendo la normativa vigente sobre protección de los animales de experimentación en Europa, que indica que la eutanasia en ovejas de experimentación debe llevarse a cabo con los animales correctamente inmovilizados y/o sedados, para minimizar el estrés y la ansiedad, y el proceso pueda realizarse mientras el animal permanece tranquilo (Close *et al.*, 1996). Una vez los animales fueron sedados con xilacina, 0.02 mg/kg IV (Xilagesic 2%® 20 mg/mL, Laboratorios Calier, Barcelona, España), se procedió a la eutanasia mediante la inyección intravenosa de 15 mL de un agente eutanásico comercial (Embutramida, Mebezonio ioduro, Tetracaína clorhidrato T-61®; Intervet, Madrid, España).

Tras la eutanasia de los animales, se extrajeron los T-TAESF y los tendones de Aquiles, tanto el tendón operado como el contra-lateral, que fue empleado como control normal. La extracción de los tendones se realizó mediante 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 su unión musculotendinosa (Figura 38). El hueso calcáneo se cortó con ayuda de una sierra oscilante a nivel de la inserción del tendón de Aquiles. Se realizó un nuevo corte proximalmente a nivel de la unión musculotendinosa. De modo que se logró una extracción en bloque de los tendones de Aquiles (Figura 39). Acto seguido, los tendones se prepararon para el posterior envío al Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) para su estudio biomecánico.



**Figura 38. Diseción del tendón de Aquiles tras la eutanasia.**



**Figura 39. Ambos tendones, el sano y el intervenido.**

Todos los tendones, de forma individual, se envolvieron en gasas empapadas con suero fisiológico, y se introdujeron en bolsas de plástico con su número de identificación, especificando si era un tendón seccionado o un tendón no operado (Figura 40). Posteriormente cada pareja de tendones, correspondientes a un animal, se colocaron en una bolsa con auto cierre codificada con el código del animal.





**Figura 40. Empaquetado de las muestras.**

Una vez empaquetadas las muestras se congelaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  y se mantuvieron a esa temperatura hasta el momento de su envío.

Las muestras se enviaron en un contenedor isoterma de porexpan con Hielo seco ( $\text{CO}_2$  sólido, 60 Kg, Abelló Linde S.A. Región sur), de modo que se garantizaba durante todo el tiempo la congelación de las muestras. Todas las bolsas llegaron en perfectas condiciones de congelación al Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV), donde se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo.

### **Estudio biomecánico**

El objetivo del presente experimento fue el estudio del efecto de la adición de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF o PRFC) en el proceso de reparación de tejido tendinoso.

El método de evaluación seleccionado para la determinación del grado de reparación obtenido en los diferentes grupos de estudio fue el análisis biomecánico de las características mecánicas del tejido tendinoso reparado.

El diseño de experiencias utilizado contempló tres periodos de estudio 2, 4 y 8 semanas de evolución, y dos grupos de tratamiento, grupo placebo (SSF) y grupo PRGF. En la Tabla 4 se detallan los grupos de estudios, el número de animales por grupo y los tendones incluidos en cada grupo de estudio.

**Tabla 4. Diseño de experiencias utilizado en el estudio.**

	TRATAMIENTO	2 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS
TENDONES SANOS	CONTROL	5	5	5
	CONTROL	5	5	5
TENDONES TRATADOS	PRGF	5	5	5
	SSF	5	5	5
TENDONES TOTALES		20	20	20

*PRGF: Plasma Rico en Factores e Crecimiento. SSF: Suero Salino Fisiológico.*

Tal y como se ha descrito en la Tabla 4, contamos en total con 60 tendones de oveja incluidos dentro del estudio. Además de ello se incluyeron otros cuatro tendones adicionales para realizar la puesta a punto del método de ensayo. De modo que el listado final de tendones quedó de la manera siguiente:

- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 2 semanas y tratamiento placebo.
- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 4 semanas y tratamiento placebo.
- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 8 semanas y tratamiento placebo.
- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 2 semanas y tratamiento PRGF.
- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 4 semanas y tratamiento PRGF.
- 5 parejas de tendones correspondientes a 5 ovejas del periodo de 8 semanas y tratamiento PRGF.

- 4 tendones de prueba para la puesta a punto del ensayo mecánico, (Tendones de Aquiles de oveja sanos, procedentes de ovejas excedentes de otros estudios).

Estas muestras se mantuvieron congeladas durante el tiempo previo a su ensayo biomecánico a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Ensayo de caracterización mecánica del tejido tendinoso*

Para la caracterización y evaluación del tejido tendinoso sano y del tejido tendinoso en reparación, se seleccionó la evaluación biomecánica de los tendones del estudio mediante ensayos de tracción mecánica en máquina universal de ensayos (Wren *et al.*, 2001, Huang *et al.*, 2004, Huffard *et al.*, 2008; Virchenco *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010, Brodie *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2011).

Dada la elevada resistencia mecánica del tejido tendinoso, y más en concreto del tejido tendinoso del tendón de Aquiles de oveja, fue necesario utilizar una metodología de ensayo que permitiera garantizar:

- El no deslizamiento de la muestra en las mordazas de ensayo.
- La determinación de la resistencia a tracción en la zona de interés.
- La integridad de los tejidos adyacentes a la zona de interés con el objetivo de no comprometer dicha zona de interés.

Gracias al suministro de tendones de Aquiles de oveja sanos, procedentes de ovejas excedentes de otros estudios, se realizaron pruebas de ensayo con el objetivo de determinar la metodología más adecuada para el ensayo de dichos tendones. En estas pruebas de ensayo se detectaron dos limitaciones que condicionaron la metodología de realización de los ensayos mecánicos. Por una parte las complicaciones al utilizar las estructuras óseas y por otra el deslizamiento de tejido.

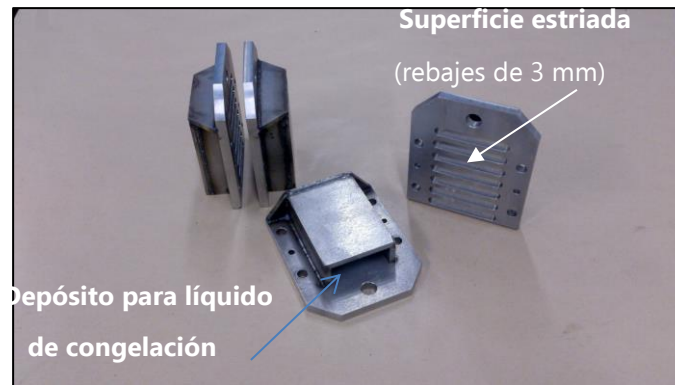
Dada la necesidad de garantizar la evaluación mecánica de la zona de interés, zona de la tenotomía situada en el centro de la sutura realizada durante la cirugía, se decidió

eliminar el calcáneo de cada una de las muestras previamente al ensayo. De este modo el agarre de las mordazas se realizaría de manera directa al propio tendón.

### ***Introducción de una nueva metodología de ensayo***

Tras una revisión de la bibliografía reciente, relacionada con el ensayo mecánico de tendones de oveja, se optó por la solución descrita por Baums y colaboradores en el 2008. En este artículo, los autores describen el uso de unas mordazas especiales que denominan "criomandíbulas" (cryojaws en el artículo original). Este sistema de anclaje se basa en el uso combinado de mordazas metálicas, con una superficie de agarre de perfiles bajos, en combinación con el uso de bajas temperaturas (Baums *et al.* 2008; Bowser *et al.* 2011). El objetivo de este método es aumentar el agarre de las mordazas al tejido blando mediante congelación de todo el sistema. De este modo, con un apriete reducido se consiguen fijaciones de tejidos blandos más eficientes con aprietes entre mordazas mucho menores, reduciendo los riesgos de deslizamiento o fracaso por un apriete excesivo.

En la Figura 41 podemos observar las mordazas fabricadas expresamente para la realización de este estudio.



***Figura 41. Fotografía de las mordazas denominadas "cryojaws".***

El uso de estas mordazas de sujeción se basa en el apriete conseguido mediante acoplamiento con tornillos de los dos componentes de las mordazas y el efecto de la congelación.

Se seleccionó el uso de acetona (grado laboratorio) junto con hielo seco ( $\text{CO}_2$  sólido), método que permite alcanzar temperaturas de hasta  $-70^\circ\text{C}$  aproximadamente. La congelación fue progresiva al ir adicionando progresivamente trozos de hielo seco al recipiente contenedor de la acetona. Así se garantizó la no congelación del tejido de ensayo permitiendo la obtención de valores reales de propiedades mecánicas. Durante el proceso de adición de hielo seco se controló la no congelación de la zona de ensayo mediante la utilización de un termómetro láser (SKF® modelo TKTL20)

### **Preparación de las muestras para ensayo**

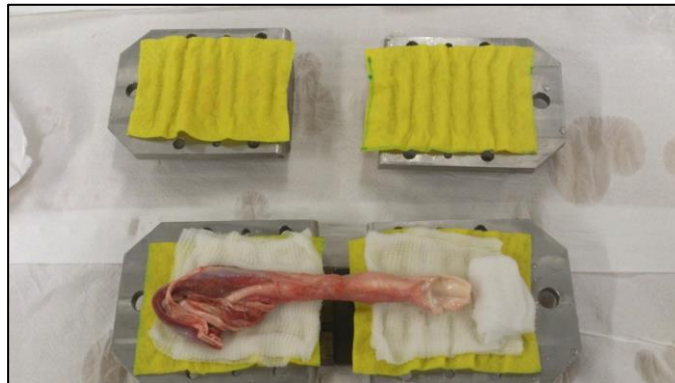
Las muestras de tendones fueron descongeladas durante el día anterior al ensayo y colocadas en una nevera de  $+5^\circ\text{C}$ .

Previamente a la realización del ensayo, se eliminó la sutura utilizada durante la fase de reparación y se marcaron las posiciones límites de colocación de las mordazas. Estos límites se establecieron midiendo, desde el punto de la cicatriz, 1,5 cm. por cada lado. Al dejar 1,5 cm. desde la mordaza al punto de cicatrización, es decir, 3 cm. de mordaza a mordaza, nos aseguramos que los ensayos se centraran en la zona deseada.

Tal y como se ha citado anteriormente, con objeto de facilitar el agarre de las mordazas sobre las muestras de ensayo, se eliminó la estructura ósea de las mismas con la ayuda de un bisturí. Además de ello, dada la gran cantidad de masa muscular en la zona proximal de las muestras, se procedió a eliminar parte de esa masa muscular para mejorar el agarre sobre este tejido.

Una vez preparada la muestra, se colocó entre las mordazas superiores e inferiores y fue fijada mediante apriete con tornillos de manera simultánea en ambas mordazas. Para evitar el contacto directo del tejido blando con las mordazas metálicas, se colocaron gasas quirúrgicas y cuadros de bayeta de algodón entre las superficies de las mordazas y el tejido a sujetar. De este modo se evitó la posible concentración de tensiones en los bordes de los rebajes de la superficie estriada de la mordaza para evitar posibles roturas del tendón en la zona de empotramiento. De modo adicional, para evitar el citado efecto negativo de los rebajes, se colocaron unas gasas permeables para evitar la rotura de la muestra.

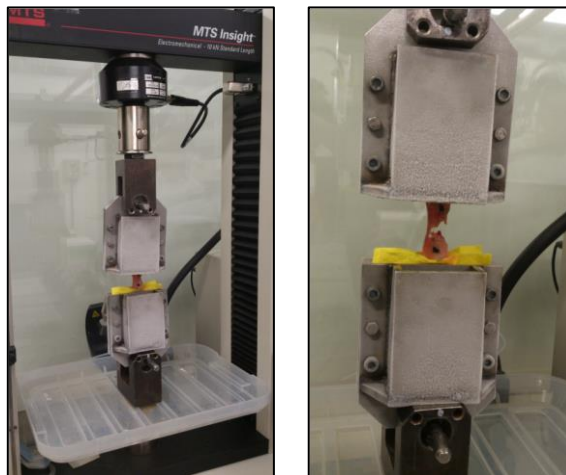
En la Figura 42 se muestra una imagen con el tendón preparado y la disposición final del mismo en el interior de la mordaza.



**Figura 42. Disposición final de los tendones en las mordazas de ensayo.**

### *Metodología del ensayo*

Una vez preparadas las muestras en sus correspondientes mordazas, se colocaron en la máquina universal de ensayos para proceder a realizar la tracción de las mismas (Figura 43).



**Figura 43. Montaje final de las mordazas en la máquina de ensayos y resultado final tras el ensayo.**

A continuación, en la Tabla 5 se resumen las condiciones de ensayo.

**Tabla 5. Condiciones del ensayo de tracción de tendones.**

CONDICIONES DE ENSAYO	
VELOCIDAD DEL ENSAYO	0,4 MM/S
DISTANCIA ENTRE MORDAZAS	30 MM

Una vez finalizado en ensayo, es decir, cuando se produjo la rotura del tendón (Figura 43), se desmontaron las mordazas y se guardaron los tendones por si fuera necesario realizar una revisión posterior de los mismos.

### *Variables de estudio*

Se seleccionaron tres variables para el estudio del efecto de la adición de PRGF en el proceso de reparación de tenotomías en tendones de Aquiles de oveja:

- Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.
- Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.
- Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.

### **Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano**

Es la relación en porcentaje (%) entre la fuerza de rotura observada para el tendón operado frente a la fuerza de rotura observada para el tendón contralateral sano. En la Fórmula 1 se detalla el cálculo de dicha variable.

**Fórmula 1. Cálculo de la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.**

$$\text{Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano (\%)} = \frac{F_{operado}}{F_{sano}} \times 100$$

Dónde:

- ***Foperado*** es la fuerza máxima de rotura obtenida para cada uno de los tendones operados que se registra en Newtons (N). Esta fuerza se obtiene

directamente de las curvas Fuerza-desplazamiento registradas durante el ensayo mecánico de dichos tendones.

- ***F<sub>sano</sub>*** es la fuerza máxima de rotura obtenida para cada uno de los tendones sanos y al igual que la anterior se registra en Newtons. Esta fuerza se obtiene directamente de las curvas Fuerza-desplazamiento registradas durante el ensayo mecánico de dichos tendones.

### Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano

Es la relación en porcentaje (%) entre la sección medida para el tendón operado frente a la sección medida para el tendón contralateral sano. En la Fórmula 2 se detalla el cálculo de dicha variable.

**Fórmula 2. Cálculo de la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.**

$$\text{Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano (\%)} = \frac{S_{operado}}{S_{sano}} \times 100$$

Dónde:

- ***S<sub>operado</sub>*** es la sección medida para cada uno de los tendones operados. Se registra en milímetros cuadrados (mm<sup>2</sup>).
- ***S<sub>sano</sub>*** es la sección medida para cada uno de los tendones sanos. Se registra en milímetros cuadrados (mm<sup>2</sup>).

### Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano

Es la relación en porcentaje (%) entre la tensión de rotura calculada para el tendón operado frente a la tensión de rotura calculada para el tendón contralateral sano.

**Fórmula 3. Cálculo de la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.**

$$\text{Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano (\%)} = \frac{T_{operado}}{T_{sano}} \times 100$$



Dónde:

- ***Toperado*** es la tensión máxima de rotura obtenida para cada uno de los tendones operados medida en megapascales (MPa). Esta tensión se calcula dividiendo la fuerza máxima de rotura, registrada durante el ensayo mecánico, entre la sección de la zona de tendón ensayado.

$$T_{operado} = \frac{F_{operado}}{S_{operado}}$$

- ***Tsano*** es la tensión máxima de rotura obtenida para cada uno de los tendones contralaterales medida en mega pascales (MPa). Esta tensión se calcula dividiendo la fuerza máxima de rotura, registrada durante el ensayo mecánico, entre la sección de la zona de tendón ensayado.

$$T_{sano} = \frac{F_{sano}}{S_{sano}}$$

El uso de variables basadas en relaciones, permite eliminar el efecto que pudiera tener en los resultados la variabilidad entre animales de experimentación.

La introducción de la variable tensión marca una diferencia con la mayoría de estudios que se centran sólo en la variable fuerza, no pudiendo valorar la calidad real del tejido de cicatrización.

## Estudio estadístico

El estudio estadístico de los resultados se basó en el análisis comparativo de los resultados obtenidos para las variables anteriormente descritas de cada uno de los grupos de estudio considerados en esta tesis doctoral.

Dentro de este análisis comparativo se tuvieron en cuenta los dos factores principales que pueden afectar al proceso de reparación del tejido tendinoso, el tiempo y el tratamiento.

### ***Estudio del efecto del factor tiempo en el proceso de reparación del tejido tendinoso***

Para el estudio de la influencia del factor Tiempo en el proceso de reparación de los tendones, se llevó a cabo un estudio comparativo entre la regeneración obtenida para cada uno de los dos tratamientos utilizados en el diseño de experiencias (grupo PCB y grupo PRGF) a partir de los valores obtenidos para las variables consideradas en el estudio.

Gracias a esta comparación se pudo evaluar el modo en el que el tiempo de evolución influye en cada uno de los dos tratamientos utilizados.

### ***Estudio del efecto del factor tratamiento en el proceso de reparación del tejido tendinoso***

Al contrario que en el caso anterior, el objetivo era comparar los valores obtenidos para las variables de estudio con cada uno de los dos tratamientos en cada uno de los tres periodos de estudio. De este modo se pudieron comparar los resultados obtenidos para cada uno de los dos tratamientos en el periodo de 2, 4, y 8 semanas de estudio.

### ***Herramientas estadísticas***

Todas las herramientas estadísticas empleadas en el análisis de resultados del presente trabajo se encuentran implementadas en el software libre Deducer (Interfaz gráfico para la consola JGR basada en R).

El análisis de los resultados se basó en la realización de una comparación de los valores medios obtenidos para la variable relación tendón operado y tendón sano en cada uno de los grupos de estudio. El objetivo era encontrar diferencias estadísticamente significativas de dichas medias debidas al uso de PRGF durante las fases iniciales del proceso de reparación de tenotomías en tendones de Aquiles de oveja.

El método seleccionado para realizar dichas comparaciones fue el test de ANOVA, o test de análisis de varianzas. Este test estadístico permite comparar simultáneamente

varias medias muestrales a partir de la comparación de las varianzas de dichas medias muestrales. Para garantizar una correcta aplicación del mismo, deben de cumplirse las siguientes tres condiciones:

- **Independencia de los datos.** Cada serie de datos debe ser independiente de las demás, esto es, los datos de una serie no deben estar correlacionados con los de otra.
- **Normalidad.** La distribución interna de cada una de las series de datos debe ser normal o tender a la normalidad.
- **Homogeneidad.** No deben existir diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de las medias a comparar.

Dado el tipo de estudio y las variables de interés consideradas, la primera condición para la aplicación del test de análisis de varianza ANOVA se cumplía, por lo que como requisito previo a la aplicación del test ANOVA se comprobó tanto la normalidad de los datos de cada grupo de estudio como la homogeneidad de varianzas de las medias a comparar. El método seleccionado para la comprobación de la normalidad de los datos fue el test de normalidad de Saphiro-Wilk, mientras que para comprobación de la homogeneidad de varianzas se seleccionó el test estadístico de Levene.

En el caso de que alguna de estas premisas no se cumpliesen, se procedió a la realización de los test de análisis de comparación de medias no paramétrico de Kruskal-Wallis o el test de Grubbs. Para todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas para una  $p < 0,05$ .



## ***Resultados***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Resultados

A continuación se relacionan los datos obtenidos durante la fase experimental en los diferentes protocolos, recogidos en tablas y figuras. Todos los resultados se expresan como la media para todas las variables estudiadas. En todos ellos se ha tomado como diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

Para una mejor exposición de los datos obtenidos en la presente investigación, el apartado de resultados se ha dividido en los siguientes puntos:

- Metodología para la evaluación biomecánica.
- Hallazgos clínicos durante el modelo de rotura del tendón.
  - Evolución del peso.
  - Evaluación del grado de cojera.

- Hallazgos biomecánicos durante el modelo de rotura de tendón.
  - Estudio descriptivo de las variables.
- Estudio estadístico de la variable relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.
  - Estudio Factor Tratamiento.
  - Estudio Factor Tiempo.
- Estudio estadístico de la variable relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.
  - Estudio Factor Tratamiento.
  - Estudio Factor Tiempo.
- Estudio estadístico de la variable relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.
  - Estudio Factor Tratamiento.
  - Estudio Factor Tiempo.

### **Metodología para la evaluación biomecánica**

El sistema de anclaje diseñado para este estudio que está basado en el uso combinado de mordazas metálicas, con una superficie de agarre de perfiles bajos, en combinación con el uso de bajas temperaturas, ha dado buenos resultados. El objetivo de estas mordazas era aumentar el agarre al tejido blando mediante congelación de todo el sistema. Con un apriete reducido se consiguieron excelentes fijaciones de los tendones y no se produjeron deslizamientos ni fracasos.

La selección de acetona (grado laboratorio) junto con hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido) para congelar el sistema de agarre permitió alcanzar temperaturas de hasta -70°C aproximadamente, siendo la manipulación de los distintos componentes fácil y segura para el personal. La congelación se consiguió adicionando progresivamente trozos de hielo seco al recipiente contenedor de la acetona y resultó ser muy efectiva. La congelación del sistema mordaza-tejido blando fue progresiva. Tal y como se ha citado anteriormente, el uso de acetona con hielo seco permitió una congelación progresiva y controlada del sistema mordaza-tejido blando, garantizando la no congelación del



tejido de ensayo y permitiendo la obtención de valores reales de las propiedades mecánicas del mismo.

### **Hallazgos clínicos durante el modelo de rotura del tendón**

En este trabajo de tesis doctoral se utilizaron 30 ovejas adultas cruce de raza Merina y no hubo ninguna complicación a lo largo de todo el proceso quirúrgico y postoperatorio. Durante el estudio no tuvo que ser descartado ningún animal, por lo que todas las ovejas llegaron al momento de la eutanasia, en total 30 animales que sumaron un total de 60 tendones.

Durante el procedimiento quirúrgico no surgió ninguna dificultad de importancia. La duración media de la cirugía fue de  $51 \pm 12$  minutos, siempre realizada por el mismo equipo quirúrgico.

El sistema de fijación externa (T-TAESF) permaneció íntegro durante todo el periodo postoperatorio, y evitó que el tendón de Aquiles soportara macro-movimientos cuando el animal apoyaba peso en la extremidad operada. El T-TAESF fue tolerado bien por los animales que no manifestaron cambios destacables en su conducta ni signos visibles de incomodidad o malestar.

En el periodo postoperatorio el proceso de cicatrización de la herida quirúrgica estuvo dentro de la normalidad, y se retiraron los puntos de sutura en todos los animales a los diez días, sin complicaciones.

En 8 animales (28,6%) se reportaron secreciones serosas en los puntos de entrada de algunas agujas del T-TAESF. Esto fue considerado como una complicación menor que se resolvió en todos los casos con la limpieza de la herida con clorhexidina (Desinclor<sup>®</sup> Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España) durante varios días y la administración de otra dosis de antibiótico de amplio espectro y acción prolongada (bencilpenicilina 15000 IU/kg IM junto con dihidroestreptomicina 15 mg/kg IM) (Shotapen<sup>®</sup> LA; Virbac Salud Animal, Barcelona, España).

Los exámenes físicos semanales evidenciaron un buen estado de salud general y no se detectaron episodios de fiebre, anorexia, apatía, o cualquier otro signo clínico que

podiese revelar la presencia de una enfermedad sistémica. Durante todo el periodo de estudio la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria, la temperatura corporal, el tiempo de relleno capilar, el estado de hidratación, y la auscultación torácica y abdominal, se mantuvieron dentro de los valores normales para esta especie en todos los animales.

### *Evolución del peso*

El peso de los animales al comienzo del estudio fue  $54.15 \pm 6.91$  kg. El peso de los animales al final del estudio fue  $52.35 \pm 5.88$  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 6).

**Tabla 6. Tabla de los pesos de los animales al principio y al final del estudio (kg).**

2 SEMANAS	GRUPO SALINO	GRUPO PRGF	P
INICIO DEL ESTUDIO	$52.50 \pm 10.75$	$54.10 \pm 1.76$	0.67
FINAL DEL ESTUDIO	$50.50 \pm 8.95$	$51.50 \pm 2.57$	0.73
P	0.30	0.03	
4 SEMANAS	GRUPO SALINO	GRUPO PRGF	P
INICIO DEL ESTUDIO	$53.60 \pm 11.76$	$55.20 \pm 2.77$	0.78
FINAL DEL ESTUDIO	$51.60 \pm 9.96$	$52.60 \pm 3.58$	0.84
P	0.41	0.14	
8 SEMANAS	GRUPO SALINO	GRUPO PRGF	P
INICIO DEL ESTUDIO	$52.60 \pm 7.63$	$55.20 \pm 4.09$	0.52
FINAL DEL ESTUDIO	$51.40 \pm 5.32$	$53.80 \pm 4.38$	0.46
P	0.37	0.06	

### *Evaluación del grado de cojera*

Durante los exámenes ortopédicos semanales se evaluó el grado de cojera de los animales. El grado de cojera fue evaluado usando una escala de valoración semi-cuantitativa 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 7). 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 todos los 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 los tres grupos experimentales.

**Tabla 7. Tabla comparativa del grado de cojera (AAEP lameness scale) a lo largo del periodo de estudio.**

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

## Hallazgos biomecánicos durante el modelo de rotura de tendón

### *Estudio descriptivo de las variables*

A continuación, en la Tabla 8, se recogen los valores obtenidos para las variables parciales observadas; Fuerza máxima de rotura y Sección del tendón, así como las variables calculadas; Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano, Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano y Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.

A partir de estos datos, se llevó a cabo el análisis estadístico anteriormente descrito en el apartado de material y métodos. El estudio del factor **Tiempo** y del factor **Tratamiento** se realizó para cada una de las tres variables principales del estudio. Como ya hemos comentado con anterioridad, en todos ellos se ha tomado como diferencias estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

**Tabla 8. Relación de datos obtenidos en los ensayos**

CASO	TENDÓN	PERIODO (semanas)	GRUPO	Fmax (N)	SECCIÓN (mm <sup>2</sup> )	TENSIÓN (MPa)	R. Tensiones	R. Fuerzas	R. Secciones
58601	S	2	Control	7318,12	75,145	97,387	-	-	-
58601	O	2	PCB	178,964	143,750	1,245	1,278	2,445	191,297
58556	S	2	Control	6860,35	55,250	124,169	-	-	-
58556	O	2	PCB	390,628	102,080	3,827	3,082	5,694	184,760
1649	S	2	Control	7110,60	48,450	146,762	-	-	-
1649	O	2	PCB	209,390	105,000	1,994	1,359	2,945	216,718
20371	S	2	Control	9283,45	57,510	161,423	-	-	-
20371	O	2	PCB	221,160	143,750	1,539	0,953	2,382	249,957
20360	S	2	Control	7507,32	59,400	126,386	-	-	-
20360	O	2	PCB	159,450	122,500	1,302	1,030	2,124	206,229

CASO	TENDÓN	PERIODO (semanas)	GRUPO	Fmax (N)	SECCIÓN (mm <sup>2</sup> )	TENSIÓN (MPa)	R. Tensiones	R. Fuerzas	R. Secciones
58599	S	2	Control	7250,98	55,200	131,358	-	-	-
58599	O	2	PRFC	197,435	77,431	2,550	1,941	2,723	140,273
18740	S	2	Control	8001,71	67,900	117,846	-	-	-
18740	O	2	PRFC	767,370	167,400	4,584	3,890	9,590	246,539
1799	S	2	Control	7464,60	68,200	109,452	-	-	-
1799	O	2	PRFC	209,650	117,000	1,792	1,637	2,809	171,554
20372	S	2	Control	7073,97	52,500	134,742	-	-	-
20372	O	2	PRFC	383,720	172,500	2,224	1,651	5,424	328,571
58538	S	2	Control	8074,95	57,600	140,190	-	-	-
58538	O	2	PRFC	441,690	145,600	3,034	2,164	5,470	252,778
146	S	4	Control	5499,27	52,000	105,755	-	-	-
146	O	4	PCB	933,84	140,000	6,670	6,307	16,981	269,231
149	S	4	Control	4162,60	80,000	52,033	-	-	-
149	O	4	PCB	940,64	270,000	3,484	6,696	22,597	337,500
151	S	4	Control	4321,28	67,500	64,019	-	-	-
151	O	4	PCB	1227,62	238,000	5,158	8,057	28,409	352,593
157	S	4	Control	8697,51	84,500	102,929	-	-	-
157	O	4	PCB	406,38	105,000	3,870	3,760	4,672	124,260
186	S	4	Control	8395,49	133,300	62,982	-	-	-
186	O	4	PCB	1547,58	396,000	3,908	6,205	18,433	297,074
145	S	4	Control	6726,08	80,000	84,076	-	-	-
145	O	4	PRFC	639,32	412,500	1,550	1,844	9,505	515,625
152	S	4	Control	5364,99	88,000	60,966	-	-	-

CASO	TENDÓN	PERIODO (semanas)	GRUPO	Fmax (N)	SECCIÓN (mm <sup>2</sup> )	TENSIÓN (MPa)	R. Tensiones	R. Fuerzas	R. Secciones
152	O	4	PRFC	792,89	227,500	3,485	5,716	14,779	258,523
182	S	4	Control	5480,95	92,000	59,576	-	-	-
182	O	4	PRFC	1314,75	486,000	2,705	4,540	23,988	528,261
283	S	4	Control	7617,19	69,000	110,394	-	-	-
283	O	4	PRFC	1560,65	243,000	6,422	5,817	20,489	352,174
9321	S	4	Control	5334,47	102,000	52,299	-	-	-
9321	O	4	PRFC	1323,03	437,500	3,024	5,782	24,802	428,922
0	S	8	Control	7128,91	68,250	104,453	-	-	-
0	O	8	PCB	1029,00	256,250	4,016	3,845	14,434	375,458
143	S	8	Control	8532,71	72,000	118,510	-	-	-
143	O	8	PCB	1153,56	150,000	7,690	6,489	13,519	208,333
9355	S	8	Control	8773,31	94,500	92,839	-	-	-
9355	O	8	PCB	1380,29	157,500	8,764	9,440	15,733	166,667
230	S	8	Control	6719,97	73,500	91,428	-	-	-
230	O	8	PCB	1117,01	181,010	6,171	6,750	16,622	246,272
9352	S	8	Control	2252,20	72,000	31,281	-	-	-
9352	O	8	PCB	1108,91	200,000	5,545	17,726	49,237	277,778
150	S	8	Control	6127,93	77,000	79,584	-	-	-
150	O	8	PRFC	1341,73	262,500	5,111	6,422	21,895	340,909
274	S	8	Control	5450,44	75,000	72,673	-	-	-
274	O	8	PRFC	1481,68	198,000	7,483	10,297	27,185	264,000
9312	S	8	Control	8516,69	78,820	108,052	-	-	-
9312	O	8	PRFC	2637,04	252,000	10,464	9,684	30,963	319,716

CASO	TENDÓN	PERIODO (semanas)	GRUPO	Fmax (N)	SECCIÓN (mm <sup>2</sup> )	TENSIÓN (MPa)	R. Tensiones	R. Fuerzas	R. Secciones
215	S	8	Control	9094,23	66,500	136,755	-	-	-
215	O	8	PRFC	1732,81	199,500	8,686	6,352	19,054	300,000
201	S	8	Control	5108,65	98,000	52,129	-	-	-
201	O	8	PRFC	1666,15	204,000	8,167	15,667	32,614	208,163

Fmax: Fuerza máxima. O: Operado. S: Sano. PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. PCB: Placebo.

En las Tablas 9 a 14 se detalla la comprobación de normalidad de los datos correspondientes a cada uno de los grupos de estudio y para cada una de las variables de estudio seleccionadas.

**Tabla 9. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 2 semanas.**

	GRUPO PLACEBO DEL PERIODO DE 2 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.906	0.463	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.934	0.618	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.951	0.725	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.

**Tabla 10. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 2 semanas.**

	GRUPO PRFC DEL PERIODO DE 2 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.745	0.0269 (<0.05)	LOS DATOS NO SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL. SE UTILIZARÁ EL TEST NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS EN AQUELLAS COMPARACIONES DÓNDE SE TENGAN EN CUENTA ESTE GRUPO EXPERIMENTAL.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.867	0.2563	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.954	0.7688	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.

**Tabla 11. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 4 semanas.**

	GRUPO PLACEBO DEL PERIODO DE 4 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.916	0.504	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.953	0.756	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.853	0.206	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.



**Tabla 12. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 4 semanas.**

	GRUPO PRFC DEL PERIODO DE 4 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.744	0.026 (<0.05)	LOS DATOS NO SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL. SE UTILIZARÁ EL TEST NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS EN AQUELLAS COMPARACIONES DÓNDE SE TENGAN EN CUENTA ESTE GRUPO EXPERIMENTAL.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.912	0.480	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.928	0.582	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.

**Tabla 13. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo placebo a las 8 semanas.**

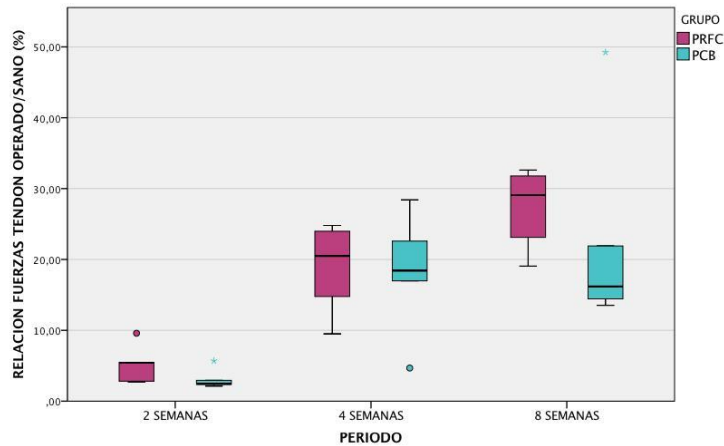
	GRUPO PLACEBO DEL PERIODO DE 8 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.964	0.804	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.975	0.872	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.919	0.529	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.

**Tabla 14. Resultados del Test de Saphiro-Wilk para el estudio de normalidad de datos del grupo PRGF a las 8 semanas.**

	GRUPO PRFC DEL PERIODO DE 8 SEMANAS		
	W	P-VALUE	RESULTADO
RELACIÓN DE TENSIONES	0.877	0.295	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE FUERZAS	0.934	0.626	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.
RELACIÓN DE SECCIONES	0.949	0.733	LOS DATOS SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL, POR LO QUE SE CUMPLE EL REQUISITO PARA APLICACIÓN DE ANOVA.

## **Estudio estadístico de la variable relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano**

En la Figura 44 se presenta el diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano para cada uno de los tres periodos de estudio teniendo en cuenta los dos tratamientos, PCB y PRGF.



**Figura 44. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.**

En esta figura se observa la presencia de 4 valores anómalos que se distribuyen del siguiente modo:

- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PCB del periodo de 2 Semanas (oveja 58556).
- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PRGF del periodo de 2 Semanas (oveja 18740).
- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PCB del periodo de 4 Semanas (oveja 157).
- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PCB del periodo de 8 Semanas (oveja 9352).

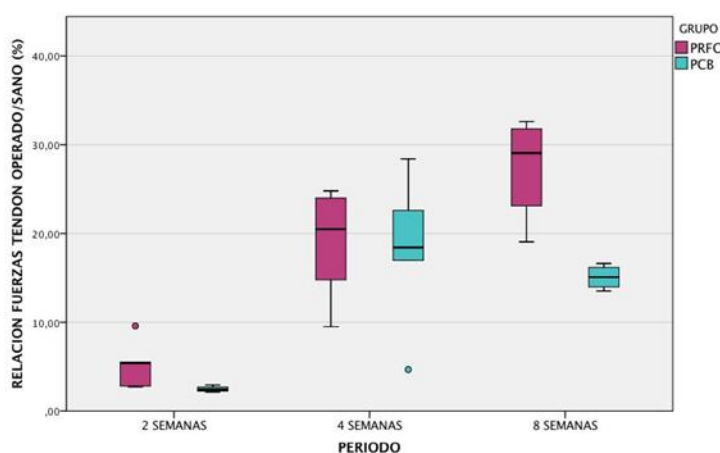
Dado que la presencia de estos posibles valores anómalos puede afectar al estudio estadístico, se aplica el test de la Q de Dixon con el objetivo de comprobar la posibilidad de eliminación de dichos valores de la serie de datos. En la Tabla 15 se resume el resultado obtenido para el test de la Q de Dixon en cada uno de los valores analizados.

En función de los resultados obtenidos en el test de la Q de Dixon se procedió a eliminar dos muestras en las que se detectaron valores anómalos del conjunto de datos utilizados en el presente estudio.

**Tabla 15. Test de Q de Dixon realizado a los posibles valores anómalos detectados en el diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.**

	VALOR	VALOR DE Q	P-VALOR	RESULTADO	ACCIÓN
PERIODO 2 SEMANAS TRATAMIENTO PCB	5,693 %	0,770	0,02318	P < 0,05	DATO: ANÓMALO SE ELIMINA
PERIODO 2 SEMANAS TRATAMIENTO PRFC	9,590 %	0,6	0,1436	P > 0,05	DATO: OUTLIER NO ELIMINABLE
PERIODO 4 SEMANAS TRATAMIENTO PCB	4,672 %	0,519	0,2629	P > 0,05	DATO: OUTLIER NO ELIMINABLE
PERIODO 8 SEMANAS TRATAMIENTO PCB	49,237 %	0,9131	2,2E <sup>-16</sup>	P < 0,05	DATO: ANÓMALO SE ELIMINA

El nuevo diagrama resultante tras la eliminación de los tendones anómalos es el que se presenta en la Figura 45.



**Figura 45. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano tras la eliminación de los valores anómalos.**

Los resultados descriptivos obtenidos para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano se detallan en la Tabla 16.

**Tabla 16. Tabla de resultados descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano.**

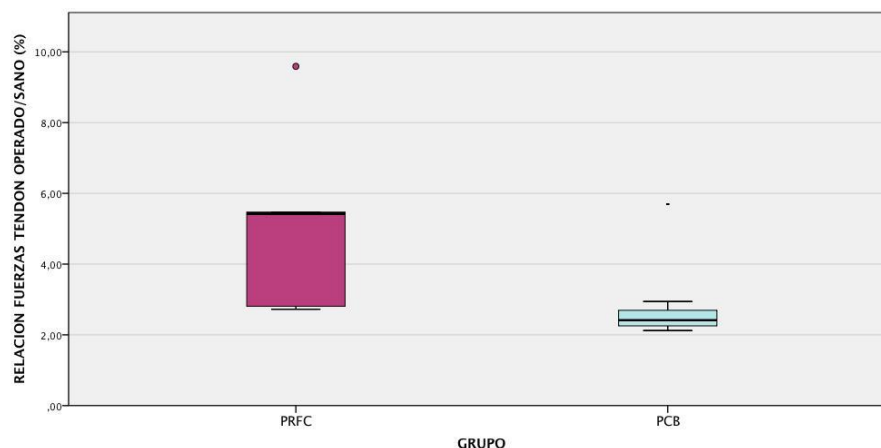
PERIODO (semanas)	GRUPO	N	VALOR MÍNIMO (%)	VALOR MÁXIMO (%)	MEDIA (%)	DE (%)
2	PCB	4	2,12	2,94	2,47	0,343
2	PRGF	5	2,72	9,59	5,20	2,795
4	PCB	5	4,672	28,409	18,219	8,776
4	PRGF	5	9,505	24,801	18,712	6,487
8	PCB	4	13,519	16,622	15,077	1,373
8	PRGF	5	19,054	32,614	26,342	5,794

PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. PCB: Placebo

## Estudio del factor tratamiento

### *Periodo de 2 Semanas*

En la Figura 46 se muestra el diagrama de cajas obtenido para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas. En este podemos observar, a priori, posibles diferencias entre las medias obtenidas para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.



**Figura 46. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.**

Previo a realizar el análisis comparativo mediante el test de ANOVA, tal y como se describe en el apartado de material y métodos, se comprobó la homogeneidad de las varianzas de las medias obtenidas para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano para los grupos de estudio en el periodo de 2 Semanas. El test de Levene confirmó la homogeneidad de las varianzas (Tabla 17,  $p=0,1136$ ), por lo que la aplicación del test estadístico de ANOVA puede realizarse.

En la Tabla 17 se presenta el resultado obtenido para el test de comparación de medias ANOVA. Como puede comprobarse, el test da como resultado un valor de significación mayor a la significación crítica ( $p=0,0971$ ), por lo que se puede decir que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio obtenido para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en los tendones correspondientes al grupo PCB ( $2,47 \pm 0,343\%$ ) y los correspondientes al grupo PRGF ( $5,20 \pm 2,795$ ) en el periodo de estudio de 2 Semanas.

**Tabla 17. Resultados obtenidos en los test de Levene y ANOVA para la Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas.**

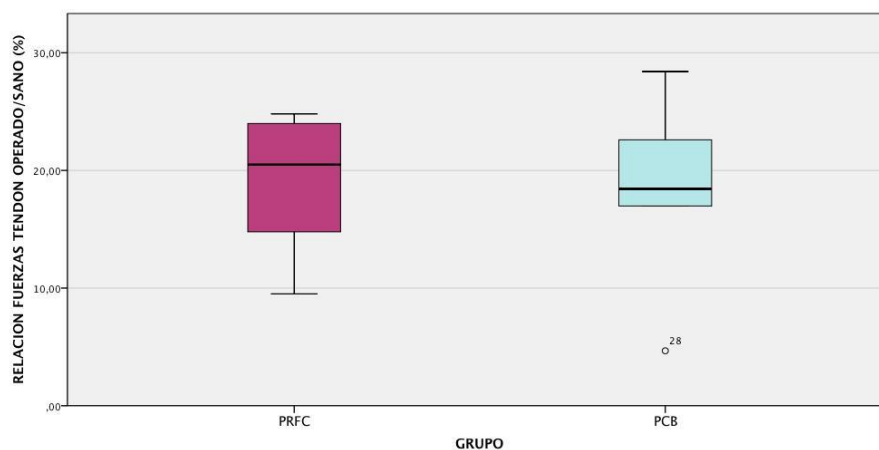
TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
3,268	1	7	0,1136
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
3,67	1	7	0,0971

### *Periodo de 4 Semanas*

En la Figura 47 se presenta el diagrama de cajas correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano para los tratamientos PCB y PRGF en el periodo de estudio de 4 Semanas. A priori, no se observan posibles diferencias entre las medias de ambos grupos de estudio.

Mediante la realización del correspondiente test de Levene, se confirma la homogeneidad de las varianzas de ambos grupos de estudio (Tabla 18,  $p=0,767$ ), tras lo cual se aplicó el test ANOVA para corroborar la no existencia de diferencias entre las medias de ambos grupos de estudio. Tal y como puede comprobarse en la Tabla 18, el valor de la significación ( $p= 0,922$ ) es superior a la significación mínima, por lo que el test no detecta diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en los grupos PCB ( $18.22\pm 8,78\%$ ) y PRGF ( $18.71\pm 6,49\%$ ) en el periodo de estudio de 4 Semanas.





**Figura 47. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas.**

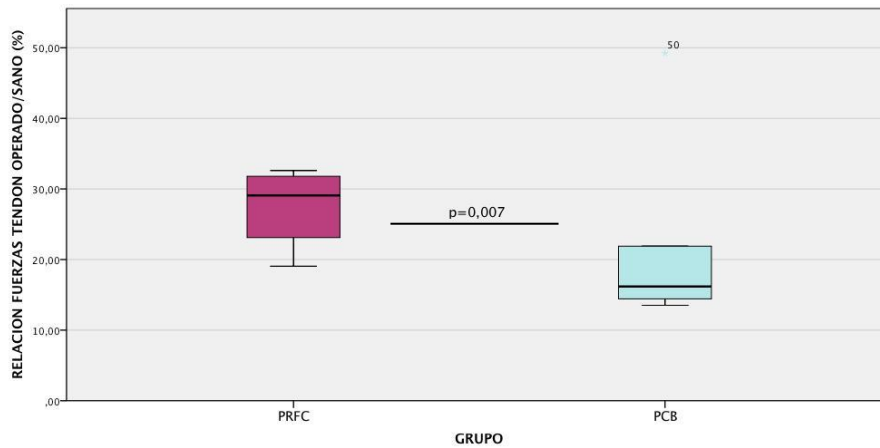
**Tabla 18. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,094	1	8	0,767
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,0102	1	8	0,922

### *Periodo de 8 Semanas*

En el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas (Figura 48) se observa una posible diferencia entre el grupo PCB y el grupo PRGF. Para comprobar dicha diferencia, se lleva a cabo el correspondiente test de ANOVA.

El test de Levene correspondiente (Tabla 19), confirma la existencia de homogeneidad entre las varianzas de ambos grupos de estudio ( $p=0,059$ ), por lo que el test de comparación de medias mediante el test ANOVA pudo ser aplicado. Los resultados de dicho test ( $p=0,007$ ) se presentan en la Tabla 19. Tal y como puede comprobarse ( $p<0,05$ ), el test encuentra diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en los grupos PCB ( $15,08\pm 1,37\%$ ) y PRGF ( $26,34\pm 5,79\%$ ) en el periodo de estudio de 8 Semanas.



**Figura 48. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas.**

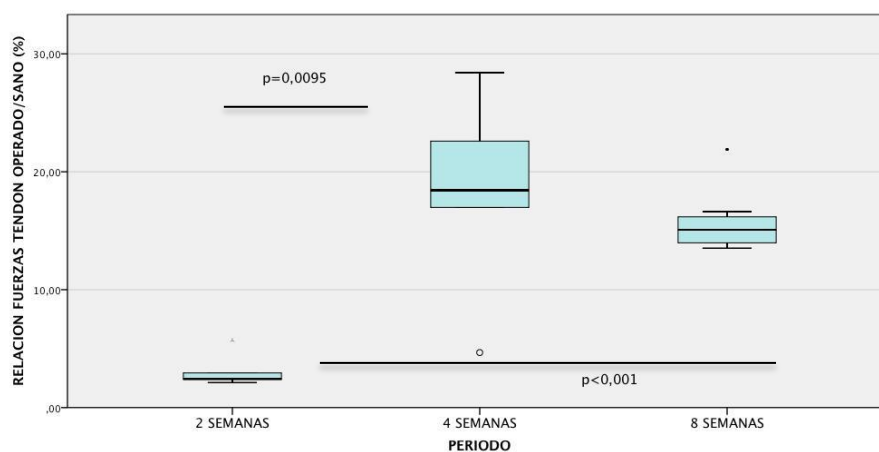
**Tabla 19. Resultados del test de Levene y el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
5,034	1	7	0,059
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
14,105	1	7	0,007

## Estudio del factor Tiempo

### Tratamiento PCB

En el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el caso del tratamiento PCB (Figura 49) se presentan las cajas correspondientes a cada uno de los tres periodos de estudio. En esta figura pueden observarse posibles diferencias entre el periodo de 2 Semanas y los periodos de 4 y 8 Semanas.



**Figura 49. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo PCB.**

Previa a la comparación de medias, se realiza el test de Levene con objeto de determinar si las varianzas son homogéneas. El test de Levene confirma, de manera significativa ( $p=0,089$ ), la homogeneidad de las varianzas (Tabla 20).

Los resultados obtenidos para el test de ANOVA (Tabla 20), desvela diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,005$ ) entre las medias obtenidas para la variable Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano para los grupos PCB de 2, 4 y 8 Semanas de experimentación. Para comprobar las posibles diferencias estadísticas por parejas, se realiza de nuevo un test de ANOVA entre las medias correspondientes (Tabla 21).

**Tabla 20. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio Placebo.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
3,1046	2	10	0,08937
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
9,42	2	10	0,005

**Tabla 21. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB.**

COMPARACIONES POR PAREJAS	RESULTADO	
2 SEMANAS (2,47±0,343%) 4 SEMANAS (18,22±8,776%)	0,0095	$P < 0,05$ . SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.
2 SEMANAS (2,47±0,343%) 8 SEMANAS (15,08±1,373%)	< 0,001	$P < 0,05$ . SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.
4 SEMANAS (18,22±8,776%) 8 SEMANAS (15,08±1,373%)	0,507	$P > 0,05$ . NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.

Como se observa en la Tabla 21 el test de ANOVA detecta diferencias entre la 2 y 4 Semanas, y entre las 2 y 8 Semanas, pero no entre las 4 y 8 Semanas.

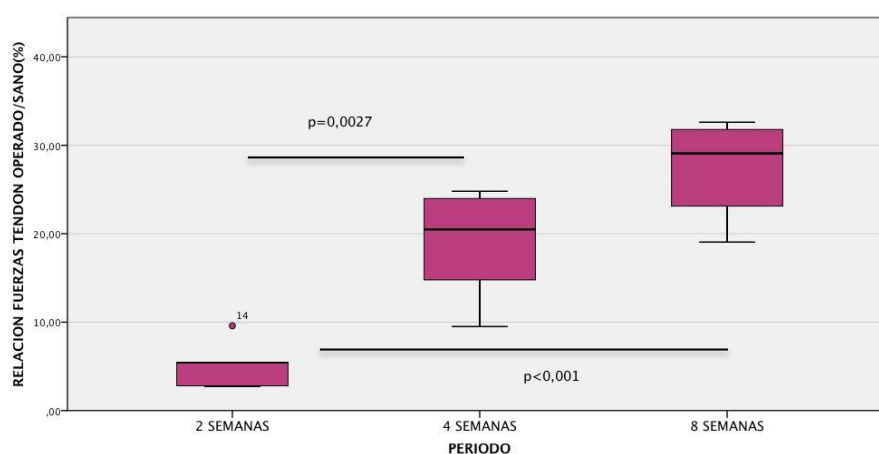
### *Tratamiento con PRGF*

En la Figura 50 se presenta el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano a los tres periodos de experimentación y sólo para el grupo con tratamiento PRGF. Del mismo modo que

sucede en el caso de los grupos placebo, pueden observarse posibles diferencias entre el periodo de 2 Semanas y los periodos de 4 y 8 Semanas.

En la Tabla 22 se presentan los resultados obtenidos para el test de Levene y para el test de comparación de medias ANOVA. Por un lado, el test de Levene revela la homogeneidad entre varianzas ( $p=0,2802$ ), y por otro el test ANOVA desvela diferencias estadísticamente significativas entre las tres medias consideradas ( $p<0,05$ ).

El resultado obtenido para las comparaciones múltiples con el test de ANOVA se resume en la Tabla 23.



**Figura 50. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo de estudio PRGF.**

**Tabla 22. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PRGF.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
1,417	2	12	0,2802
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
20,16	2	12	<0,001

**Tabla 23. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRGF.**

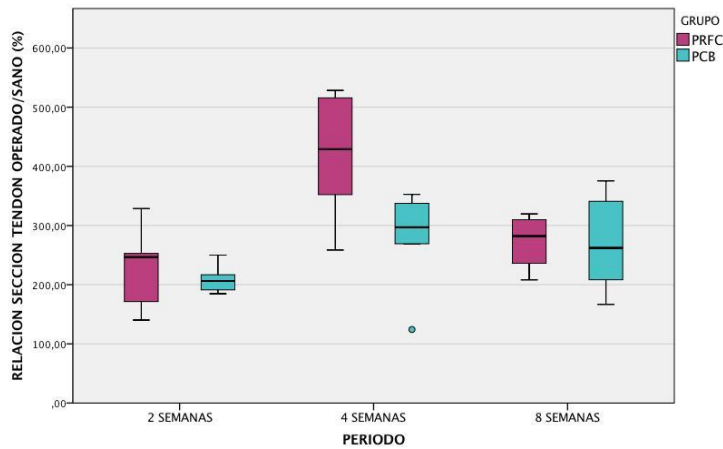
COMPARACIONES POR PAREJAS	RESULTADO	
2 SEMANAS (5,20±2,80%) 4 SEMANAS (18,71±6,49%)	0,0027	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
2 SEMANAS (5,20±2,80%) 8 SEMANAS (26,34±5,79%)	< 0,001	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
4 SEMANAS (18,71±6,49%) 8 SEMANAS (26,34±5,79%)	0,0855	<i>P</i> >0,05. NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS

Como se observa en la Tabla 23 el test de ANOVA detecta diferencias entre la 2 y 4 Semanas, y entre las 2 y 8 Semanas, pero no entre las 4 y 8 Semanas.

## **Estudio estadístico de la variable relación de secciones entre tendón operado y tendón sano**

En la Figura 51 se presenta el diagrama de cajas agrupado correspondiente a la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.

En este diagrama cabe destacar un posible valor anómalo en el grupo de estudio PCB correspondiente al periodo de 4 Semanas. En la Tabla 24 se resume el test de la Q-Dixon aplicado para comprobar la posibilidad de eliminación de este valor anómalo. En base a estos resultados se decide no eliminar el dato.



**Figura 51. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.**

**Tabla 24. Test de Q de Dixon realizado a los posibles valores anómalos detectados en el diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.**

	VALOR	VALOR Q	P VALOR	RESULTADO	ACCIÓN
PERIODO 4 SEMANAS TRATAMIENTO PCB	124,26 %	0,6349	0,1066	P < 0,05	DATO: <b>OUTLIER</b> NO ELIMINABLE

Los resultados descriptivos obtenidos para la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano se detallan, a continuación, en la Tabla 25.



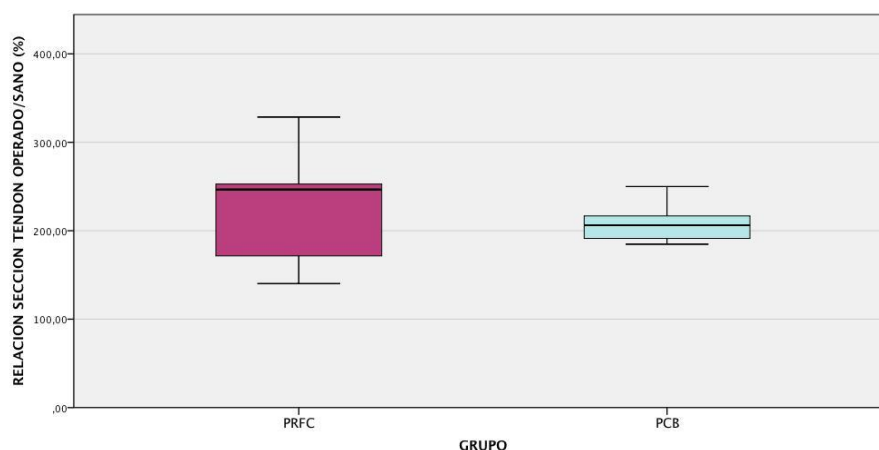
**Tabla 25. Tabla de descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.**

PERIODO (semanas)	GRUPO	N	VALOR MÍNIMO (%)	VALOR MÁXIMO (%)	MEDIA (%)	DE (%)
2	PCB	4	191,30	249,96	216,05	24,89
2	PRGF	5	140,27	328,57	227,94	74,09
4	PCB	5	124,26	352,593	276,132	91,054
4	PRGF	5	258,523	528,261	416,701	113,54
8	PCB	4	166,667	375,458	249,182	90,243
8	PRGF	5	208,163	340,909	286,558	52,175

## Estudio del factor tratamiento

### *Periodo de 2 Semanas*

En la Figura 52, se presenta el diagrama de cajas correspondiente a la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas.



**Figura 52. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.**

Aparentemente no existen diferencias entre las medias obtenidas para esta variable. Para corroborarlo, se llevará a cabo el test de comparación de medias ANOVA.

En la Tabla 26 se presentan los resultados correspondientes al test de homogeneidad de varianzas de Levene y al citado test de ANOVA. El test de Levene confirma la homogeneidad de las varianzas ( $p=0,19$ ).

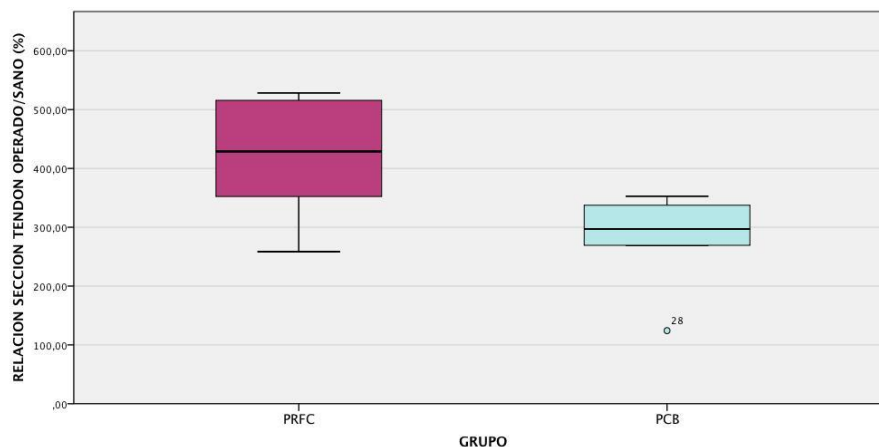
En cuanto al test de comparación de medias, el test ANOVA no detecta diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,77$ ) entre los valores medios de la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano obtenidos para el grupo PCB ( $216,05 \pm 24,89\%$ ) y para el grupo PRGF ( $227,94 \pm 74,09$ ) en el periodo experimental de 2 Semanas.

**Tabla 26. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
21,062	1	7	0,19
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,0924	1	7	0,77

### *Periodo de 4 Semanas*

En la Figura 53 se representa el diagrama de cajas correspondiente a la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano para los tratamientos PCB y PRGF en el periodo de experimentación de 4 Semanas. Como puede observarse, es posible la existencia de diferencias significativas.



**Figura 53. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas.**

El test de Levene confirma la homogeneidad de las varianzas de ambos grupos de estudio ( $p=0,517$ ), por lo que el test de comparación de medias mediante ANOVA pudo ser aplicado. Los resultados de dicho test se presentan en la Tabla 27. Tal y como puede comprobarse en el valor de la significación, el test no detecta diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en los grupos PCB ( $276,13 \pm 91,05\%$ ) y PRGF ( $416,70 \pm 113,54\%$ ) en el periodo de estudio de 4 Semanas.

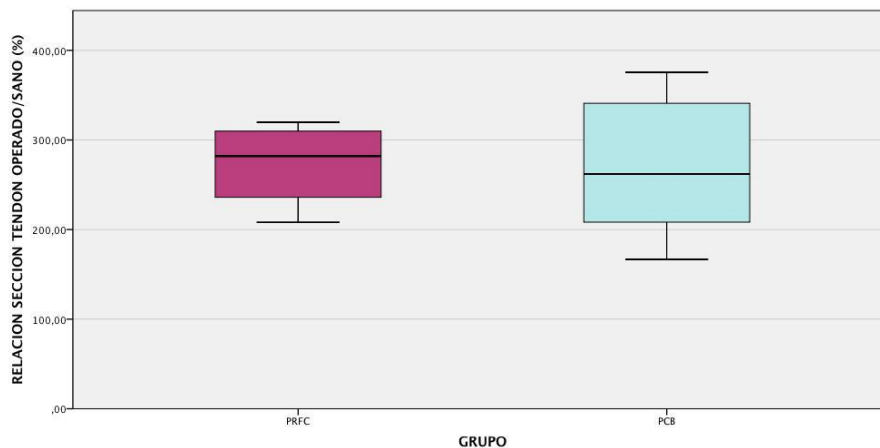
**Tabla 27. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,459	1	8	0,517
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
4,664	1	8	0,063

### *Periodo de 8 Semanas*

El diagrama de cajas correspondiente a la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano para los grupos PCB y PRGF en el periodo de 8 Semanas, se presenta en la Figura 54.

Tal y como se observa, gráficamente no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Para comprobar esta situación se llevará a cabo la comparación de medias mediante el procedimiento utilizado en los casos anteriores.



**Figura 54. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas.**

El correspondiente test de Levene (Tabla 28) no detecta diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas calculadas para ambos grupos de estudio ( $p=0,476$ ), por lo que estas varianzas se consideran homogéneas.

En cuanto a la comparación de medias mediante el test de ANOVA, dicho test no desvela diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano correspondientes al grupo PCB ( $249,18 \pm 90,24\%$ ) y al grupo PRGF ( $286,56 \pm 52,17\%$ ) en el periodo de estudio de 8 Semanas.

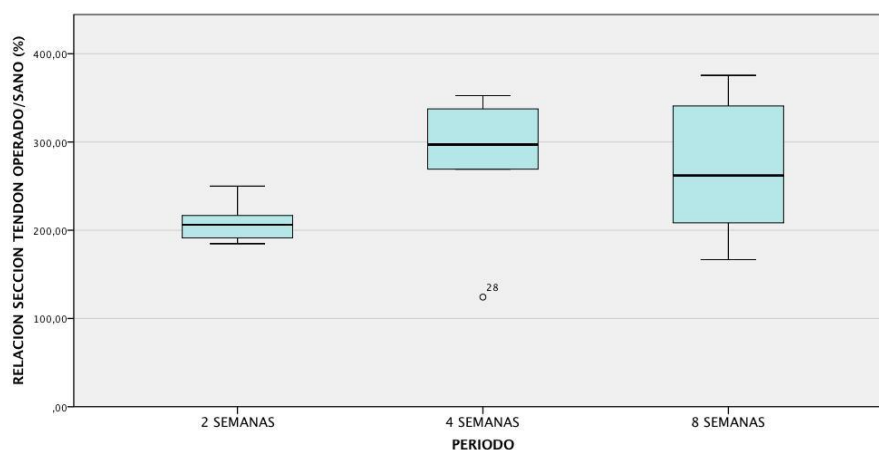
**Tabla 28. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,566	1	7	0,476
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,615	1	7	0,459

## Estudio del factor Tiempo

### *Tratamiento Placebo*

En la Figura 55 se presenta el diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano para cada uno de los tres periodos de experimentación relativos al tratamiento PCB.



**Figura 55. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo de estudio PCB.**

En la Tabla 29 se presentan los resultados obtenidos para el test de Levene y para el test de comparación de medias ANOVA. Por un lado, el test de Levene revela la homogeneidad entre varianzas ( $p=0,449$ ), y por otro el test ANOVA no desvela diferencias estadísticamente significativas entre las tres medias consideradas ( $p=0,531$ ).

**Tabla 29. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PCB.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,869	2	10	0,449
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,675	2	10	0,531

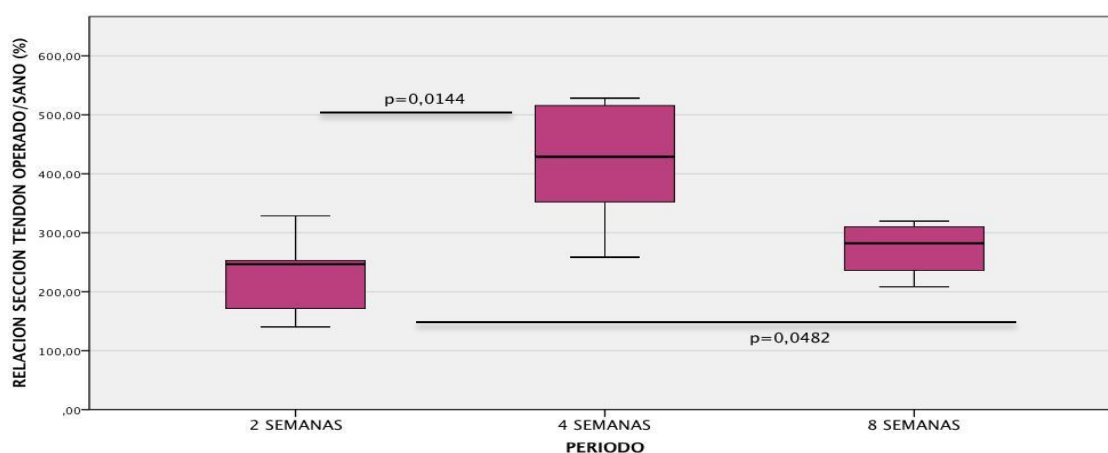
El resultado obtenido para las comparaciones múltiples con el test de ANOVA se resume en la Tabla 30.

**Tabla 30. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB.**

COMPARACIONES POR PAREJAS	VALOR DE $P$ DE AJUSTE	
2 SEMANAS (216,05±24,89%) 4 SEMANAS (276,13±91,05%)	0,2459	$P>0,05$ . NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
2 SEMANAS (216,05±24,89%) 8 SEMANAS (249,18±90,24%)	0,5055	$P>0,05$ . NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
4 SEMANAS (276,13±91,05%) 8 SEMANAS (249,18±90,24%)	0,671	$P>0,05$ . NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS

### Tratamiento con PRGF

En la Figura 56 se representa el diagrama de cajas correspondiente a la variable Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano, relativo al tratamiento PRGF, para cada uno de los tres periodos de experimentación considerados. En este diagrama de cajas se observan posibles diferencias entre grupos, por lo que será necesario confirmarlo mediante test de comparación de medias.



**Figura 56. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo de estudio PRGF.**

Tras el análisis de homogeneidad de varianzas (Tabla 31) se concluye que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de las medias a comparar ( $p=0,3075$ ). El test de ANOVA realizado desvela diferencias estadísticamente significativas considerando los tres grupos de estudio.

**Tabla 31. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PRGF.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
13,031	2	12	0,3075
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
6,63	2	12	0,0115

En la tabla 32, se presentan los resultados obtenidos en el test de comparaciones múltiples ANOVA realizado.

**Tabla 32. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRGF.**

COMPARACIONES POR PAREJAS	RESULTADO	
2 SEMANAS (227,94±74,09%) 4 SEMANAS (416,70±113,54%)	0,0144	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
2 SEMANAS (227,94±74,09%) 8 SEMANAS (286,56±52,17%)	0,1860	<i>P</i> >0,05. NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS
4 SEMANAS (416,70±113,54%) 8 SEMANAS (286,56±52,17%)	0,0482	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS



## **Estudio estadístico de la variable relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.**

En la realización de este estudio, se observa la aparición de cuatro valores anómalos (Figura 57), que se distribuyen del siguiente modo:

- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PRGF del periodo de 2 Semanas (oveja 18740).
- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PCB del periodo de 4 Semanas (oveja 151).
- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PCB del periodo de 4 Semanas (oveja 157).

- Valor anómalo correspondiente al grupo de estudio PRGF del periodo de 4 Semanas (oveja 145).

Se comprueba la posibilidad de eliminarlos de la serie de datos. En el caso de los grupos con un único posible valor anómalo, se utiliza el test de Q de Dixon (Tabla33). En el caso del grupo con dos valores anómalos se utiliza el test de Grubbs para la detección de dos posibles valores anómalos en un grupo de datos (Tabla 34).

**Tabla 33. Test Q de Dixon realizado para los grupos de estudio con un solo valor anómalo.**

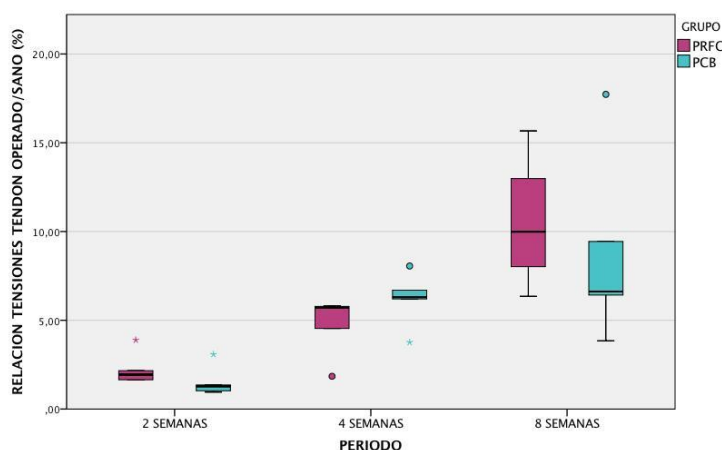
	VALOR	VALOR Q	P-VALOR	RESULTADO	ACCIÓN
PERIODO 2 SEMANAS TRATAMIENTO PRFC	3,89%	0,7661	0,02455	P < 0,05	<b>DATO ANÓMALO: ELIMINABLE</b>
PERIODO 4 SEMANAS TRATAMIENTO PRFC	1,844%	0,6786	0,07018	P > 0,05	<b>OUTLIER: NO ELIMINABLE</b>

**Tabla 34. Test Grubbs realizado para el grupo de estudio con dos posibles valores anómalos.**

	VALORES	VALOR G	VALOR U	P-VALOR	RESULTADO	ACCIÓN
PERIODO 2 SEMANAS TRATAMIENTO PRFC	8,057% Y 3,76%	2,7652	0,0139	0,04003	P < 0,05	<b>DATOS ANÓMALOS</b>

En base a estos resultados, los valores anómalos presentes en los grupos de estudio de 2 Semanas-PRFC y 4 Semanas-PCB, podrían ser eliminados de los datos de estudio. A pesar de ello se decide no eliminar dichos valores. El motivo de esta decisión se fundamenta en las características propias de la variable *Relación de Tensiones*. Tal y cómo se explica en el apartado de material y métodos, los valores individuales de la

Tensión se obtienen por medio de la división entre los valores de Fuerza y Sección medidos para cada uno de los tendones ensayados. Por tanto, la variable *Relación de Tensiones* podemos decir que es una variable calculada, y no medida de manera experimental como sucede en las variables *Relación de Fuerzas* y *Relación de Secciones*. La eliminación de datos correspondiente a la variable *Relación de Tensiones* supondría la necesidad de eliminar los valores a partir de los cuales se han obtenido los valores anómalos de la tensión. Este hecho reduciría de manera sensible el número  $n$  a partir del cual se realiza el estudio.



**Figura 57. Diagrama de cajas agrupado obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano.**

Los resultados descriptivos correspondientes a la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano, para cada uno de los tres periodos y tratamientos, se detallan en la Tabla 35.

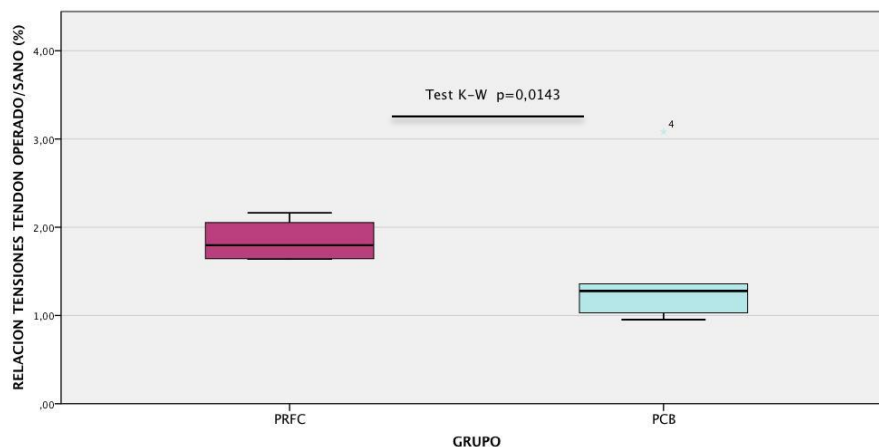
**Tabla 35. Tabla de descriptivos correspondiente a la variable de estudio Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano.**

PERIODO (semanas)	GRUPO	N	VALOR MÍNIMO (%)	VALOR MÁXIMO (%)	MEDIA (%)	DE (%)
2	PCB	4	0,953	1,36	1,16	0,194
2	PRGF	5	1,637	3,89	2,26	0,939
4	PCB	5	3,759	8,056	6,205	1,554
4	PRGF	5	1,843	5,817	4,739	1,705
8	PCB	4	3,845	9,439	6,631	2,287
8	PRGF	5	6,352	15,667	9,684	3,805

## Estudio del factor tratamiento

### *Periodo de 2 Semanas*

En la Figura 58, se presenta el diagrama de cajas correspondiente a la representación de la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano para cada uno de los dos tratamientos en el periodo de experimentación de 2 semanas. De manera inicial, se observan posibles diferencias en el resultado obtenido con el tratamiento PCB y con el tratamiento PRFC. Estas posibles diferencias serán comprobadas mediante el test de comparación de medias de Kruskal-Wallis, puesto que como se comprobó en la Tabla 10, la distribución de datos en el caso del grupo PRFC no es normal.



**Figura 58. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 2 Semanas.**

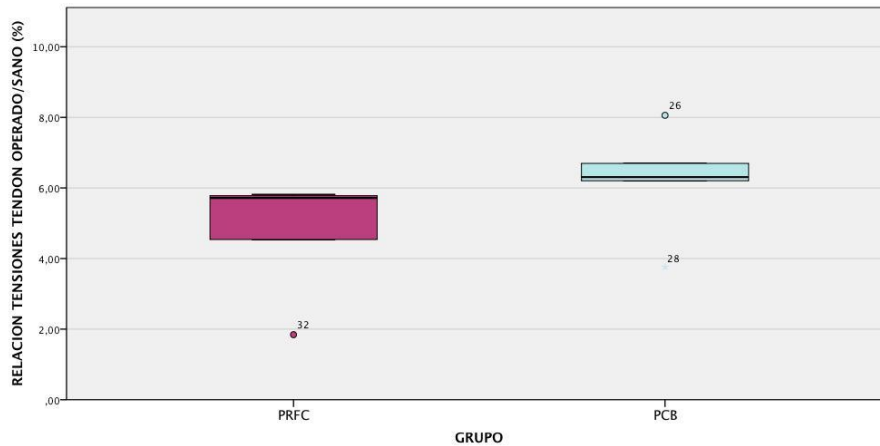
**Tabla 36. Test adicional no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparación de medias, aplicado a la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 2 Semanas.**

TEST DE COMPARACIÓN DE MEDIAS NO PARAMÉTRICO KRUSKAL-WALLIS	SIGNIFICACIÓN
	<b>0,0143</b>

Como puede comprobarse, el test de Kruskal-Wallis, detecta diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano de los grupos de estudio en el periodo de experimentación de 2 Semanas (Tabla 36).

### *Periodo de 4 Semanas*

En la Figura 59 se presenta el diagrama de cajas correspondiente a la representación de los valores obtenidos para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en los grupos de tratamiento PCB y PRGF en el periodo de experimentación de 4 Semanas.



**Figura 59. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 4 Semanas.**

Dada la falta de normalidad de los datos correspondientes al grupo PRFC de 4 Semanas, se utiliza como test de comparación de medias el test de Kruskal-Wallis.

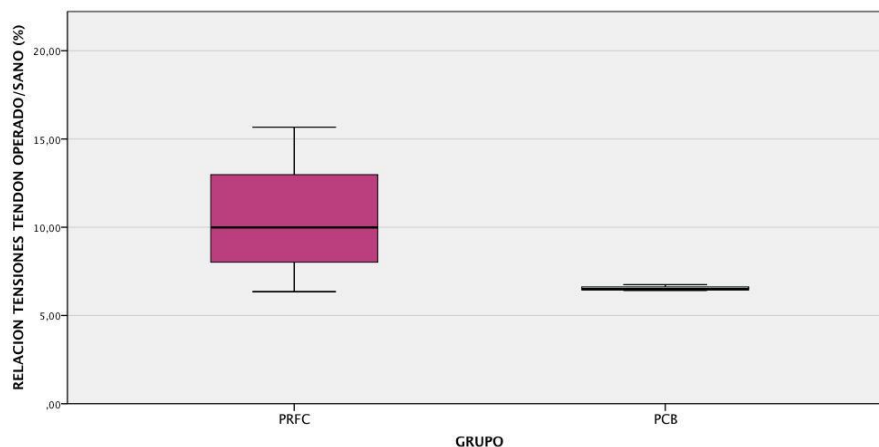
El test de Kruskal-Wallis (Tabla 37) realizado no desvela diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1934$ ) entre las medias obtenidas para la variable *Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano* en el grupo PCB ( $6,20\pm 1,55\%$ ) y el grupo PRFC ( $4,74\pm 1,71\%$ ) en el periodo de experimentación de 4 Semanas.

**Tabla 37. Resultado obtenido para el test de Kruskal-Wallis para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 4 Semanas.**

TEST DE COMPARACIÓN DE MEDIAS NO PARAMÉTRICO DE KRUSKAL-WALLIS	SIGNIFICACIÓN
	<b>0.0758</b>

### *Periodo de 8 Semanas*

A continuación, se presenta el diagrama correspondiente a la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano para los grupos de estudio PCB y PRGF en el periodo de 8 Semanas (Figura 60).



**Figura 60. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de 8 Semanas.**

Como puede comprobarse en la Tabla 38, el test de Levene no detecta diferencias significativas entre las varianzas de las medias consideradas ( $p=0,428$ ).

En la Tabla 38 se presentan los resultados correspondientes al test ANOVA. Como puede comprobarse, no se detectan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,203$ ) entre las medias obtenidas para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en los grupos PCB ( $6,63\pm 2,29\%$ ) y PRGF ( $9,68\pm 3,81$ ) del periodo de 8 Semanas.

**Tabla 38. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el periodo de estudio de 8 Semanas.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
0,709	1	7	0,428
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
1,971	1	7	0,203

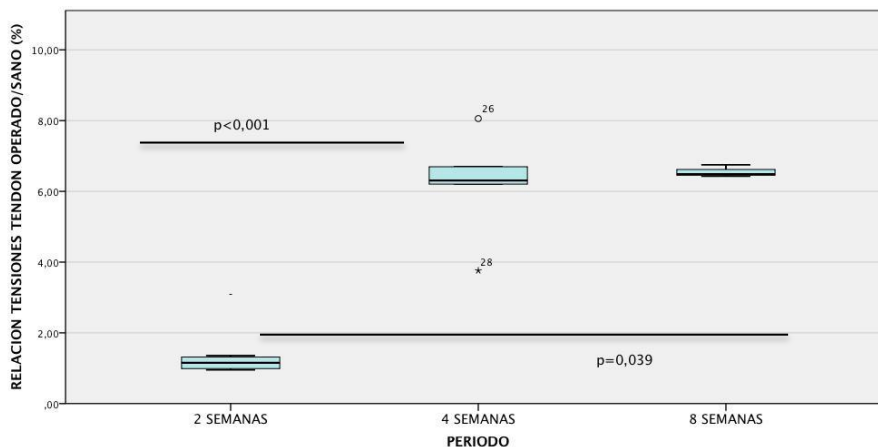
## Estudio del factor Tiempo

### *Tratamiento Placebo*

En la Figura 61 se presenta el diagrama de cajas y bigotes correspondiente a la representación de los valores obtenidos para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano para los grupos PCB del estudio.

Como puede comprobarse en el mismo, aparentemente, existen diferencias claras entre los valores obtenidos en el periodo de 2 Semanas frente a los de 4 y 8 Semanas de experimentación.

El test de Levene confirma la homogeneidad de las varianzas de los tres grupos de estudio correspondientes a los tres periodos de experimentación (Tabla 39.  $p=0,2895$ ), por lo que el test de comparación de medias mediante el test ANOVA pudo ser aplicado. Los resultados de dicho test se presentan también en la Tabla 39. Tal y como puede comprobarse en el valor de la significación ( $p<0,001$ ), el test detecta diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos para la variable Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en los tres grupos PCB.



**Figura 61. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el caso del grupo de estudio PCB.**



**Tabla 39. Resultados obtenidos en el test de Levene y en el test ANOVA para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el grupo de estudio PCB.**

TEST DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS			
ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
14,066	2	10	0,2895
TEST ANOVA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS			
F	GL1	GL2	SIGNIFICACIÓN
15,01	2	10	<0,001

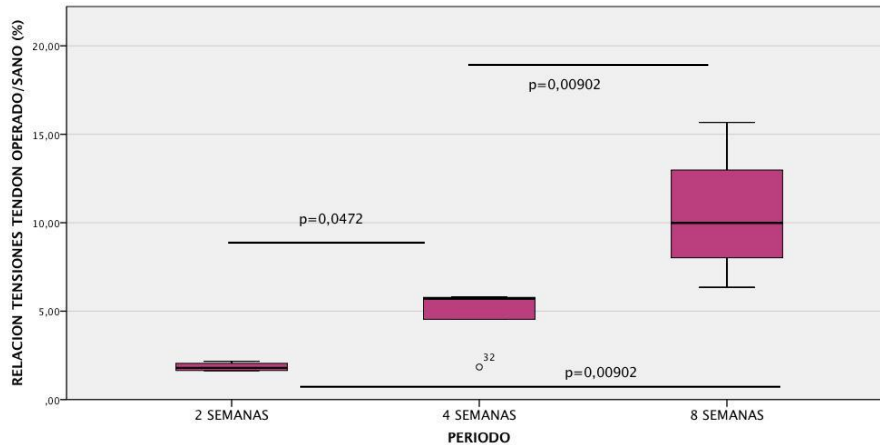
Del mismo modo que en casos anteriores, se llevan a cabo las comparaciones múltiples por parejas con el test ANOVA. En la Tabla 40 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 40. Resultados obtenidos para el test de ANOVA de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PCB.**

	RESULTADO	
2 SEMANAS (1,16±0,194%) 4 SEMANAS (6,20±1,554%)	<0,001	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.
2 SEMANAS (1,16±0,194%) 8 SEMANAS (6,63±2,28%)	0,00309	<i>P</i> <0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.
4 SEMANAS,20±1,554%) 8 SEMANAS (6,63±2,28%)	0,748	<i>P</i> >0,05. NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.

### Tratamiento con PRGF

En la Figura 62 se presenta el diagrama de cajas y bigotes correspondiente a la representación de los valores obtenidos para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano para los grupos con tratamiento PRGF del estudio.



**Figura 62. Diagrama de cajas obtenido para la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano en el en el grupo de estudio PRGF.**

Los resultados de las comparaciones múltiples mediante Kruskal-Wallis se resumen en la Tabla 41.

**Tabla 41. Resultados obtenidos para el test de Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples correspondiente a la variable de estudio Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano relativo al grupo PRFC.**

COMPARACIONES POR PAREJAS	RESULTADO	
2 SEMANAS (2,26±0,939%) 4 SEMANAS (4,74±1,705%)	0,0472	<b>P&lt;0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.</b>
2 SEMANAS (2,26±0,939%) 8 SEMANAS (9,68±3,805%)	0,00902	<b>P&lt;0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.</b>
4 SEMANAS (4,74±1,705%) 8 SEMANAS (9,68±3,805%)	0,00902	<b>P&lt;0,05. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE AMBAS MEDIAS.</b>

## ***Discusión***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Discusión

### Evaluación del modelo experimental

Existen modelos animales como la rata, ratón, cobaya y conejo adecuados para realizar investigación básica en ortopedia que son económicos y de fácil manipulación (Kaux *et al.*, 2012). Para conseguir el objetivo de nuestro estudio y valorar biomecánicamente la reparación tendinosa es necesario recurrir a otras especies mayores en las cuales la respuesta del tejido a las cargas mecánicas y el tamaño de las estructuras anatómicas sea lo más parecido posible a la especie humana. En los últimos años, las líneas de experimentación ortopédica tienden a disminuir los modelos primates no-humanos, perro y cerdo por los modelos oveja y cabra. El cerdo presenta algunos problemas para la investigación ortopédica debido al rápido crecimiento

corporal que tiene esta especie y al carácter que suelen tener estos animales, así como la dificultad en su manejo. El perro ha sido el animal más usado en las últimas décadas en experimentación ortopédica. Aunque los primates no-humanos son el modelo más parecido al humano, el empleo de estos modelos experimentales está disminuyendo debido a la implicación emocional que supone hacer investigación con ellos, y a los aspectos legales que rodean su empleo como animales de experimentación (Martini *et al.*, 2001).

Por ello, en la actualidad, la comunidad científica emplea con mayor frecuencia los modelos ovino y caprino (Yuehwei y Freidman, 1998). La especie ovina ha sido considerada como un buen modelo animal para la experimentación en ortopedia y se está convirtiendo en el modelo experimental más popular (Martini *et al.*, 2001; Anitua *et al.*, 2006b; Pearce *et al.*, 2007).

Si queremos 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 parezca a la del ser humano. Así podemos reproducir 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).

El mayor tamaño de las estructuras anatómicas y las mayores cargas que actúan sobre la extremidad en la especie ovina, hacen que para nuestro estudio experimental sobre el tendón de Aquiles este modelo sea el más similar al humano (Martini *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2007)..

El tendón de Aquiles de la oveja es una estructura anatómica de fácil acceso quirúrgico. Con una incisión cutánea sobre la piel que lo recubre tenemos acceso prácticamente a la totalidad de la longitud del mismo. 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 suficiente tejido para poder realizar las pruebas biomecánicas (Fernández, 2012).

El tendón de Aquiles transmite las fuerzas musculares que producen la extensión del tarso. Las cargas a las que se ve sometido durante las diferentes fases de la marcha pueden llegar a ser muy elevadas. Por ello, podemos considerar al tendón de Aquiles como uno de los mejores tendones para experimentar y mejorar el proceso de reparación tendinosa (Fernández, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

En nuestra Tesis Doctoral utilizamos el mismo modelo experimental *in vivo* de ruptura total del tendón de Aquiles que en el trabajo de Fernández y colaboradores en el 2012. El tendón de Aquiles de las ovejas permite una fácil exposición quirúrgica y su tamaño contribuye a crear una lesión más precisa, homogénea, repetible y estandarizada (Fernández, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

En la bibliografía, existen cinco 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; Fernández *et al.*, 2013). Fernández y colaboradores validaron el modelo utilizado en esta tesis doctoral y se mostró como una buena alternativa en la valoración de la cicatrización del tendón de Aquiles en oveja (Fernández *et al.*, 2013). Existen varias diferencias entre el modelo experimental que utilizaron otros autores y el modelo que hemos descrito en este trabajo. Sarrafian y colaboradores, emplearon un patrón de Kessler bloqueado para reparar la tenotomía, mientras que en nuestro modelo se utilizó un patrón en triple polea (Sarrafian *et al.*, 2010). Al igual que Virchenko y colaboradores, ellos no utilizaron ningún método de inmovilización postoperatoria (Virchenko *et al.*, 2008). En nuestro trabajo pensamos que era indispensable el control de la fuerza muscular sobre la tenotomía que asegurase una posición de cicatrización que no generase desplazamientos y grandes espacios en la zona de lesión. Estos movimientos no controlados podrían variar los resultados dependiendo del comportamiento y actividad física de cada animal.

En nuestro modelo experimental, 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. El sistema de inmovilización postoperatorio elegido fue una modificación de un fijador externo transarticular del tarso (T-TAESF) (Fernández, 2012;

Fernández *et al.*, 2013). El empleo de fijadores externos transarticulares es común en medicina veterinaria para tratar roturas agudas del tendón de Aquiles (Carmichael, 1991; Lewis *et al.*, 2001). En varios artículos de investigación ortopédica se ha empleado con éxito un sistema parecido al nuestro para conseguir evitar la movilidad del tarso de la oveja (Skerry y Lanyon, 1993; Skerry y Lanyon, 1995; Pitsillides *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 2002).

Hoy sabemos que la movilización precoz y controlada del tarso, y el apoyo progresivo de peso es importante para una buena recuperación tras una ruptura del tendón de Aquiles (Mortensen *et al.*, 1999; Kangas *et al.*, 2003; Maffulli *et al.*, 2003). Esta movilización temprana tras su reparación, mejora las propiedades biomecánicas del tendón y disminuye las adherencias entre el tendón y el peritendón (Wada *et al.*, 2001; Wang, 2006). Estudios experimentales sugieren que la movilización del tendón tras la reparación es fundamental para minimizar la formación de adherencias (Zhao *et al.*, 2004; Boyer *et al.*, 2005). Por el contrario, 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).

El modelo experimental de rotura del tendón de Aquiles utilizado 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 (Fernández, 2012). El grosor en torno a 10 mm del tendón de Aquiles de la oveja permitió manipularlo con facilidad y realizar la cirugía de manera precisa. El T-TAESF que se propuso 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 rompiera 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 (Fernández *et al.*, 2013).

Una de las limitaciones de este modelo experimental es el empleo de tendones de Aquiles sanos, ya que 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 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 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. 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). Pero, para valorar la resistencia biomecánica del tejido de reparación tendinosa, resulta más sencillo centrar el ensayo en una zona de lesión concisa y clara, como la que resulta de una sección quirúrgica de bordes limpios, que en una lesión desordenada.

### Uso de PRGF

La aplicación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP), proporciona una fuente autóloga de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas, como el fibrinógeno, la fibronectina o la vitronectina, que se localizan en los gránulos alfa de las plaquetas (Anitua *et al.*, 2004). Estas sustancias autólogas aplicadas en la lesión tienen la ventaja de encontrarse en equilibrio biológico, y al ser autólogas, desaparecen los riesgos potenciales derivados de una reacción inmunológica adversa (Woo *et al.*, 1999; Molley *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004; Andía *et al.*, 2010).

El término PRP (Platelet Rich Plasma) es un término genérico poco preciso empleado 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). Por no utilizarse una nomenclatura precisa para estos diferentes productos biológicos, llamados todos PRPs, se ha creado confusión entre la comunidad médica y científica (Anitua *et al.*, 2009). La publicación de

resultados contradictorios han hecho que exista una gran controversia acerca de la utilidad clínica 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).

La mayoría de los estudios experimentales señalan que el PRP favorece los procesos de cicatrización tisular en lesiones del sistema locomotor (Woo *et al.*, 1999; Molley *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004; Andía *et al.*, 2010).

En cambio, los estudios clínicos publicados hasta hoy presentan resultados muy variables. La evidente falta de homogeneidad a la hora de procesar la sangre autóloga para obtener el PRP puede ser la causa principal de esta variedad (Anitua *et al.*, 2009a; Sánchez *et al.*, 2009; Andía *et al.*, 2010; Filardo *et al.*, 2010; Schepull *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011). Tal y como hemos repasado en el apartado "¿Cómo se obtiene el Plasma Rico en Plaquetas (PRP)?", encontramos múltiples protocolos para el aislamiento del PRP, que difieren en puntos tan esenciales como 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. De modo que el producto final aislado cambia entre los distintos métodos de obtención. Además, dentro del término PRP se incluyen productos sanguíneos autólogos con concentraciones plaquetarias muy diferentes (Landesberg *et al.*, 2000; Appel *et al.*, 2002; Weibrich y Kleis, 2002; Weibrich *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2003; Weibrich *et al.*, 2003). Podemos encontrar incluso sistemas de aislamiento que comprenden notables concentraciones de leucocitos e incluso eritrocitos; por el contrario, otras metodologías de aislamiento evitan la inclusión tanto de leucocitos como de eritrocitos, como es el caso de la metodología PRGF (Anitua *et al.*, 2004). En resumen, los diferentes sistemas de aislamiento darán lugar a un producto con diferente contenido plaquetario y celular, y también variable en cuanto a las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento y citoquinas. Estas distinciones, 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.

En esta Tesis Doctoral se ha empleado un tipo de PRP denominado PRGF, cuya metodología de obtención fue descrita por el Dr. Eduardo Anitua y su grupo de colaboradores en el BTI<sup>®</sup> Biotechnology Institute de Vitoria. El término PRGF fue empleado por primera vez por Anitua en 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.*, 1999).

Una de las principales diferencias del PRGF con respecto a otros PRPs es que el PRGF no contiene leucocitos, ya que durante el proceso de pipeteo no se aspira la capa leucocitaria. Otra de las características del PRGF es que presenta una concentración moderada de plaquetas, lo cual ha sido relacionado con un óptimo efecto biológico (Weibrich *et al.*, 2004).

El protocolo de centrifugado único y pipeteo fraccionado para el aislamiento del PRGF fue realizado siguiendo la metodología de la empresa que definió el PRGF, PRGF-Endoret<sup>®</sup>, BTI<sup>®</sup> (Biotechnology Institute, Vitoria, Spain). El protocolo de centrifugado recomendado en la especie ovina es de 630G durante 8 minutos (Anitua *et al.*, 2006b). Las diferencias entre los parámetros de centrifugación son debidas a los cambios de densidad de los componentes hemáticos de las distintas especies.

Todos los procedimientos de pipeteo y fraccionamiento del PRGF se realizaron en una campana de flujo laminar. La contaminación bacteriana puede aparecer cuando se emplean protocolos de obtención de PRP abiertos (Vasconcelos *et al.*, 2003). En nuestro estudio, 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.

A la preocupación existente por la heterogeneidad de metodologías de aislamiento del PRP, hemos de añadir el problema asociado a su aplicación, que en varios estudios clínicos se realiza mediante inyecciones en el lugar de la lesión, mientras que en otros el PRP se aplica en forma gelificada. Incluso, en otros muchos estudios clínicos, se plantea el empleo del PRP en forma de matrices de fibrina. Además, tampoco existe un único

criterio al elegir los agentes empleados para la activación plaquetaria, incluso existen estudios clínicos en los cuales se inyecta el PRP en forma líquida sin activar.

La pauta de aplicación de estos tratamientos con PRP es otro de los importantes aspectos que deben de ser tratados en futuras investigaciones, ya que, en la actualidad, encontramos estudios clínicos que realizan una única aplicación de PRP, mientras que otros hacen varias aplicaciones. También hay que aclarar cada cuánto tiempo deben espaciarse las aplicaciones (días, semanas, meses), así como el volumen a administrar dependiendo de la localización anatómica de la lesión. Probablemente, estas cuestiones vayan ligadas a la patología que se pretenda tratar, ya que 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. Establecer el tipo de lesiones que mejor responden al tratamiento con estas terapias, además de hallar el estadio clínico dónde se consiguen unos resultados óptimos tras su aplicación, supone una importante tarea de investigación y, al mismo tiempo, abre un campo de estudio fascinante y con muchas de sus cuestiones aún sin responder.

A pesar de que en muchos estudios 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, excepto en el grupo de dos semanas. Escogimos este protocolo de inyección porque en la práctica clínica se suelen llevar a cabo inyecciones repetidas de PRP para el tratamiento de lesiones tendinosas, y porque en un estudio experimental previo de Anitua y colaboradores (2006) se evaluó el efecto de inyecciones semanales de PRGF sobre el tendón de Aquiles sano de ovejas (Anitua *et al.*, 2006b).

Aplicamos una infiltración de PRGF intraoperatoria en cada uno de los bordes tendinosos seccionados bajo visualización directa del tendón por parte del cirujano. Las infiltraciones posteriores semanales en la zona de reparación tendinosa se realizaron bajo control ecográfico con el animal sedado. En un trabajo experimental se evaluó la precisión de diferentes técnicas de inyección de PRP en el tendón de Aquiles de cadáveres, y se observó que la inyección ecoguiada conseguía una colocación precisa

de PRP en el área de reparación (Wiegerinck *et al.*, 2011). La punción para infiltrar PRGF o solución salina en el tendón produce un daño por el efecto expansivo del producto inyectado en el tendón y la agresión al peritendón. Para reducir 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 (Fernández *et al.*, 2013). El daño se produjo en los tendones de todos los grupos experimentales, por lo que la agresión fue la misma para los tendones tratados con PRGF y para los tendones del grupo salino.

Todavía tenemos dudas acerca de la mejor composición del PRGF (concentración plaquetaria, presencia o ausencia de leucocitos, concentración y ratio de factores de crecimiento). Tendríamos que determinar la composición del PRGF con los mejores efectos biológicos. La forma de administración de PRGF, el tiempo óptimo entre aplicaciones, y el volumen ideal de PRGF a inyectar en cada aplicación sigue siendo motivo de discusión. Es probable que estas cuestiones dependan del tejido que estemos tratando y de la patología y su estadio clínico. 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).

### **Metodología de ensayo biomecánico**

Gracias al suministro de tendones de Aquiles de oveja sanos, procedentes de ovejas excedentes de otros estudios, se realizaron pruebas de ensayo con el objetivo de determinar la metodología más adecuada para el estudio de dichos tendones. En estas pruebas de ensayo se detectaron dos limitaciones que condicionaron la metodología de realización de las pruebas mecánicas. Por una parte las complicaciones al utilizar las estructuras óseas y por otra el deslizamiento de tejido.

La estrategia inicial contemplaba el mantenimiento de la estructura ósea de las muestras (calcáneo), aprovechando dicha estructura como punto de fijación mecánica en el montaje de ensayo. Estas pruebas desvelaron que, desde un punto de vista

mecánico, el punto más débil por el que fracasa el sistema musculo-tendón-calcáneo es la inserción del tendón de Aquiles en la estructura del calcáneo.

Dada la elevada resistencia mecánica del tejido tendinoso, y más, en concreto, del tejido tendinoso del tendón de Aquiles de oveja, fue necesario utilizar una metodología de ensayo que permitiera garantizar el no deslizamiento de la muestra en las mordazas de ensayo, la determinación de la resistencia a tracción en la zona de interés, y la integridad de los tejidos adyacentes a la zona de interés con el objetivo de no comprometer dicha zona (Baums *et al.*, 2008; Bowser *et al.*, 2011).

Teniendo la necesidad de garantizar la evaluación mecánica de la zona de la tenotomía, situada en el centro de la sutura realizada durante la cirugía, se decidió eliminar el calcáneo de cada una de las muestras previamente al ensayo. De este modo el agarre de las mordazas se realizaría de manera directa al propio tendón evitando que el punto más débil por el que fracasara el sistema musculo-tendón-calcáneo fuese la inserción del tendón de Aquiles en la estructura del calcáneo, a diferencia de los estudios biomecánicos de tendón en ratas, en los que la porción distal mantiene el hueso para el agarre de la criomandíbula (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012).

Las pruebas posteriores a la eliminación de la estructura del calcáneo revelaron una falta de agarre de los tejidos blandos a las mordazas de ensayo, provocado por la elevada resistencia mecánica del tejido tendinoso. El aumento del apriete en las mordazas de ensayo fue descartado desde un inicio, puesto que este aumento de apriete se traducían directamente en un aumento de las fuerzas de cizalladura en el límite de la mordaza. Es por ello que se buscaron alternativas a las mordazas convencionales basadas en el agarre por apriete exclusivamente.

El uso de estas mordazas de sujeción se basa en el apriete conseguido mediante acoplamiento con tornillos de los dos componentes de las mordazas y el efecto de la congelación. En el artículo original de Baums y colaboradores en el 2008, la congelación se consiguió vertiendo nitrógeno líquido en unos depósitos situados en las superficies de las mordazas en el lado de no agarre. En otros casos sumergiendo las mordazas en el nitrógeno líquido (Bowser *et al.*, 2011) al igual que han publicado otros autores (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012).

En nuestro estudio se utilizó la solución descrita por Baums y colaboradores (2008). Las mordazas metálicas utilizadas, denominadas cryojaws en el artículo original, en combinación con la congelación de la zona de agarre, mostraron ser un método eficaz en la sujeción de las piezas anatómicas a valorar. Este sistema de anclaje se basa en el uso combinado de mordazas metálicas, con una superficie de agarre de perfiles bajos, en combinación con el uso de bajas temperaturas (Wieloch *et al.*, 2004; Baums *et al.*, 2008, Bowser *et al.*, 2011). El objetivo de estas mordazas es aumentar el agarre de las mismas al tejido blando mediante congelación de todo el sistema. De este modo, se consiguen fijaciones de tejidos blandos más eficientes con aprietes entre mordazas mucho menores, reduciendo los riesgos de deslizamiento y fracaso por un apriete excesivo.

Las mordazas fueron fabricadas expresamente para la realización del estudio. La superficie de agarre lisa con varias ranuras de perfiles bajos no dañaron el tejido incluso tras el apriete de los tornillos. Para evitar la concentración de tensiones en los bordes de las ranuras se colocó un tejido artificial entre el tendón y la superficie de la mordaza. Todos los tendones testados se rompieron por la zona deseada de estudio.

La diferencia más notable entre los métodos utilizados por Baums y colaboradores y Bowser y colaboradores, y el método utilizado en nuestro trabajo, fue la forma de conseguir la congelación de la zona de agarre y evitar la congelación del área a testar. Dada la dificultad en la manipulación del nitrógeno líquido, derivada de las bajas temperaturas del mismo, se decidió sustituir dicho líquido de congelación por otro método que implicara una manipulación más segura y conservadora. Se seleccionó el uso de acetona (grado laboratorio) junto con hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido), método que permite alcanzar temperaturas de hasta -70°C aproximadamente. Esto implicó una manipulación más segura y conservadora que vertiendo nitrógeno líquido. La congelación se consigue adicionando trozos de hielo seco al recipiente de la mordaza que contiene la acetona. Ello supone una facilidad y seguridad en la manipulación de los distintos componentes. De este modo se evita la manipulación y almacenaje de líquidos a muy bajas temperaturas que requieren unas medidas de almacenaje y protección adicionales.

Además, y lo más importante, el uso de acetona con hielo seco permite una congelación progresiva y controlada del sistema mordaza-tejido blando, garantizando la no congelación del tejido de ensayo y permitiendo la obtención de valores reales de propiedades mecánicas. La congelación del sistema mordaza-tejido blando con nitrógeno líquido se consigue de una forma muy rápida. Esta ventaja en la rapidez de congelación puede parecer a priori beneficiosa, pero a su vez supone el riesgo de congelar el tejido de ensayo situado en la luz de las mordazas, lo que supondría una variación muy significativa de las propiedades mecánicas del tejido a ensayar.

La congelación se controló mediante la utilización de una pistola láser de medición de temperatura en el área de ensayo (Montalto *et al.*, 2013) y agujas de kirschner (cuando se observaba que endurecía la zona de tejido entre las mordazas se iniciaba el ensayo).

En la preparación de las muestras para el ensayo se eliminaron gran parte de las masas musculares, lo que permitió mejorar el apriete sobre el tejido. Las mordazas no se apretaban homogéneamente con los tornillos para conseguir adaptarse al tejido a sujetar. De hecho, el apriete de los tornillos no era excesivo ya que la congelación posterior de mordaza y tejido es lo que daba seguridad contra el deslizamiento del sistema (Baums *et al.*, 2008).

Para conseguir valorar la zona de cicatrización se dejó una luz entre mordazas de 3 cm., 1,5 cm desde la zona de sección a la mordaza en cada lado, y aunque no existen referencias al respecto, en todos los tendones se produjo la rotura por la zona de ensayo. Se consideró esta distancia lo suficientemente estrecha para conseguir testar la zona cicatricial, y una distancia correcta para controlar y evitar la congelación de la zona de ensayo. La identificación de la cicatriz vino dada al medir desde el inicio y el final de las suturas que siempre siguieron un patrón constante, y se marcaron con un rotulador.

En cuanto a la velocidad del ensayo, los estudios desarrollados con ratones o conejos que valoran la resistencia a la tracción de tendones, utilizan velocidades más lentas (0,16 mm/s) que la utilizada en nuestro estudio (0,4mm/s) (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012). Esta velocidad se asignó siguiendo el modelo que utilizaron Baums y colaboradores en 2008. La velocidad puede afectar si se realiza un ensayo muy rápido.



Los tendones, al igual que los huesos, presentan un comportamiento viscoelástico (Wang *et al.*, 2012) , es decir sus características mecánicas pueden variar según la velocidad de ensayo. Esto se debe a la propia composición de los tendones, los cuales tienen una parte de tejido y otra parte de agua. Cuando ensayamos con los tendones a una velocidad muy alta no dejamos salir el agua del tejido, aumentando en principio su rigidez. Cuando lo ensayamos a velocidades bajas, podemos decir que el tejido "tiene tiempo" de permitir la salida del agua. Ésta es la razón por la que los valores de resistencia pueden variar de un ensayo de velocidad baja a un ensayo de velocidad alta (Sammarco *et al.*, 1971). En nuestro caso y tratándose de tendones de la especie ovina, consideramos que la velocidad de ensayo fue apropiada, aunque se necesitarían más ensayos con diferentes velocidades para determinar las diferencias entre ellos.

Los estudios experimentales biomecánicos con tendones no son numerosos y son especialmente escasos con modelos animales de gran tamaño. En la mayoría de trabajos biomecánicos en tendones se han utilizado la rata y el conejo como modelo animal, debido a la dificultad de manejo y de estabulación de los animales de gran tamaño (Kaux *et al.*, 2012; Wnuk *et al.*, 2012). El inconveniente principal al trabajar con conejos y ratas es que sus tendones se asemejan poco, en cuanto al tamaño y la estructura, a los tendones de la especie humana, y por tanto, es difícil extrapolar los resultados de los estudios para la aplicación clínica con humanos. En esta tesis doctoral utilizamos a la oveja, que posee un tendón de Aquiles de tamaño y estructura muy similar al del hombre. A nivel biomecánico nos permite trasladar los resultados obtenidos en fuerzas de rotura del tendón a lo que podría suceder en la especie humana, aumentando así el valor clínico que aporta el estudio.

### **Variables del estudio**

Las cédulas de carga de la máquina universal de ensayos miden la fuerza y, habitualmente, son los resultados utilizados para la mayoría de estudios. (Manning, *et al.*, 2010; Hettrich, *et al.*, 2014) En nuestra tesis doctoral se seleccionaron tres variables para valorar el efecto de la adición de PRGF en el proceso de reparación de tenotomías en tendones de Aquiles de oveja. Las variables fueron las relaciones, en tanto por

ciento, de fuerzas, secciones, y tensiones, entre tendón operado y tendón sano. El uso de variables basadas en relaciones, permitió eliminar el efecto que pudiera tener en los resultados la variabilidad entre los animales de experimentación (Kim *et al.*, 2014).

Además, en el estudio estadístico, realizamos un análisis comparativo teniendo en cuenta dos factores principales que pueden afectar al proceso de reparación tendinoso: el factor tiempo y el factor tratamiento. Con el estudio del factor tiempo vemos cómo está reparando o cómo está afectando el tiempo a la reparación del tejido, y con el factor tratamiento podemos comparar el efecto del tratamiento con PRGF y con PCB en el mismo tiempo.

La inclusión de la variable tensión marca la diferencia con el resto de trabajos publicados, pero complica enormemente el análisis y la interpretación de los resultados estadísticos. Esta variable es muy utilizada en los trabajos con materiales de todo tipo, en los que la sección se mantiene durante el ensayo (Musani *et al.*, 2013; Ajaxon y Persson, 2014). En el caso del tendón, el tejido al estirarse va cambiando su sección, y al ser una variable calculada (fuerza/sección) y no medida, las diferencias de sección pueden alterar los posibles resultados. Al principio del ensayo obtenemos una tensión baja porque se aplica poca fuerza sobre una sección grande, pero conforme se tracciona del tendón, la sección se reduce y aumenta la tensión. La tensión debería medirse justo antes de romperse el tendón, donde observaríamos la tensión máxima en una determinada sección. Por otro lado, la variable tensión es la que nos ofrece mayor información sobre la calidad del tejido cicatricial que se forma en la reparación del tendón, y por ello, y a pesar de las dificultades que supone, decidimos incluirla en nuestro estudio.

### ***Relación de fuerzas entre tendón operado y tendón sano***

En el estudio del factor tratamiento, tras el análisis estadístico de los datos, se comprueba que a 2 y a 4 semanas no existen diferencias estadísticamente significativas para esta variable entre los dos grupos de estudio, el placebo o grupo salino y el PRGF. El valor anómalo dentro del grupo de PRGF en el periodo de 2 semanas, podría variar la significación en el caso de ser eliminable ya que al ser de 0,0971 está muy cercana al

límite de 0,05. Se comprobó el resultado obtenido mediante dos test más: Kruskal-Wallis y t de student. El test de KW dio una significación de 0.05 y la t de student un valor de 0.094, por lo que no pudimos eliminar el valor y el resultado estadístico no alcanza la significación, de manera que no podemos decir que exista una mayor fuerza del tendón tratado con PRGF que con PCB, aunque parece existir cierta tendencia.

Sin embargo, a 8 semanas sí que se detectan diferencias estadísticamente significativas, por lo que podemos decir que los tendones tratados con PRGF presentan una relación de fuerzas mayor que en el caso PCB, es decir, que los tendones tratados con PRGF son más fuertes a las 8 semanas que los del grupo PCB. Esto aporta una base biomecánica que corrobora los resultados obtenidos por Fernández y colaboradores en 2013, donde se observaba una mejor alineación de los núcleos de los fibroblastos y orientación de las fibras en los tendones tratados con PRGF, así como una mayor cantidad de colágeno tipo I a las 8 semanas, lo que le confería una mayor resistencia mecánica (Anitua *et al.*, 2006; Anitua *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Fernandez *et al.*, 2013). Del mismo modo se correlaciona con los resultados obtenidos en ratas, donde la diferencia en la resistencia se apreciaba después de las primeras semanas de cicatrización, alcanzando un grado de maduración más rápidamente (Kaux *et al.*, 2012).

Si estudiamos cómo afecta el tiempo de experimentación a la evolución de la resistencia mecánica a la tracción, vemos cómo los niveles de resistencia a la tracción son más bajos en el periodo de 2 semanas, tanto en el grupo placebo como en el grupo PRGF, mientras que no se aprecian diferencias en los periodos de 4 y 8 semanas. En la comparación del grupo placebo observamos que los resultados están condicionados por el valor anómalo de las 4 semanas. Se comprobó con KW y t de student. Es cierto que KW dio un nivel de significación mucho más bajo que el obtenido con ANOVA, dando la sensación de que mitigaba el efecto del valor anómalo, pero continuaba mostrando que no existían diferencias estadísticamente significativas.

Esto se traduciría en que, dentro de cada grupo de estudio, se observa una evolución de 2 a 4 semanas, que se traduce en una mejora de la resistencia de los tendones. Sin embargo esta tendencia a aumentar la resistencia no se observa en el salto de 4 a 8 semanas. Mejora significativamente la resistencia a la tracción entre las 2 y las 4

semanas en ambos grupos. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros trabajos donde el incremento de resistencia se aprecia en las primeras semanas estabilizándose posteriormente, independientemente del tratamiento (Kaux *et al.*, 2012). Lo interesante en estos tratamientos es que la resistencia siempre es mayor en el grupo de PRP, convirtiéndose esta en significativa a las 8 semanas, coincidiendo con los resultados de Kaux y colaboradores en 2012. En cambio, estudios en ratas avalan resultados contradictorios, concluyendo que la aplicación de PRP no mejora la resistencia de los tendones hasta los 42 días (Solchaga *et al.*, 2014). No obstante tenemos que volver a valorar las diferencias entre los productos biológicos utilizados entre los trabajos de Solchaga y colaboradores en 2014 y los nuestros o los de Fernández y colaboradores en 2013. Siendo productos elaborados con metodología diferente, se esperan resultados diferentes y no son equiparables (Anitua *et al.*, 2009).

### ***Relación de secciones entre tendón operado y tendón sano***

Las secciones de las muestras no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio a ningún tiempo de medida. Obsevando el factor tratamiento no aparecen diferencias de sección entre el grupo PRGF y el PCB en ninguno de los tiempos de estudio. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fernández y colaboradores en 2013, pero difieren de los encontrados por otros autores, donde en un estudio en ratas observaron que las secciones cambiaban de forma evidente en los primeros días en el grupo PRGF, mientras se igualaban a tiempos mayores con el grupo placebo (Kaux *et al.*, 2012).

Si estudiamos cómo influye el factor tiempo en la relación entre las secciones, observamos que en el caso del grupo placebo las relaciones entre secciones se mantienen en todos los periodos. Este resultado se traduciría en que los tamaños de las cicatrices de reparación en las zonas de tenotomía no varían de forma significativa entre las 2 y las 8 semanas en el caso del grupo placebo.

Sin embargo, en el caso PRGF sí que se observan diferencias. La relación entre secciones a 4 semanas es significativamente mayor que a 2 y que a 8 semanas, coincidiendo con los estudios realizados por Kaux y colaboradores en 2012 donde se

apreciaba un incremento en la sección que se igualaba con el grupo salino al cabo de las semanas (Kaux *et al.*, 2012). Con el PRGF, las cicatrices de reparación crecen más de las 2 a las 4 semanas y después reducen su tamaño más rápidamente que en el grupo PCB a las 8 semanas. Este hecho puede explicarse porque se adelanta el proceso de inflamación y reparación en los tendones de PRGF, que presentan una menor infiltración inflamatoria a las 4 y 8 semanas, lo que genera el engrosamiento más temprano (Fernández *et al.*, 2013).

### ***Relación de tensiones entre tendón operado y tendón sano***

Relativo a la relación entre tensiones, analizando el factor tratamiento, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para la variable relacionada con las tensiones en el periodo de 2 semanas con la adición de PRGF. En el resto de periodos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos placebo y PRGF, ni a 4 ni a 8 semanas de experimentación. A las 2 semanas los tendones tratados con PRGF aguantan más fuerza por unidad de superficie.

Esto se puede traducir en que las cicatrices tendinosas del grupo PRGF presentan un tejido capaz de soportar más tensión en fases iniciales, lo que se podría atribuir a un tejido de más calidad. A pesar de no contar con estudios histológicos a 2 semanas, esto coincidiría con los resultados de Fernández y colaboradores en 2013 donde se relacionaron los tendones tratados con PRGF con periodos de maduración más tempranos y maduros que los tratados con placebo. Es fácil pensar que esta estructura de colágeno y fibra más ordenada confiera al tejido una resistencia mayor al mismo tiempo de evolución (Fernández, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

Resultados parecidos se obtuvieron en un estudio de tendón supraespinoso en ratas, donde se valoraron las mejoras tempranas en la resistencia del tendón a una mayor infiltración de fibroblastos y mayor alineamiento del fibroblasto en el eje longitudinal del tendón (Beck *et al.*, 2012).

Si observamos cómo evoluciona la relación entre tensiones a lo largo del tiempo, cabe destacar que en el caso del grupo placebo se observan diferencias en esta variable solamente en el periodo de 2 semanas, mientras que entre los valores obtenidos a 4 y a

8 semanas de estudio no se observan diferencias. Sin embargo en el caso del PRGF, sí que se observan diferencias entre la relación de tensiones en todos los periodos. Esto se puede interpretar como una mejora en la calidad del tejido en los tendones tratados con PRGF, que hace que la relación de tensiones progrese paulatinamente de 2 a 8 semanas, coincidiendo con los estudios anatomopatológicos de Fernández y colaboradores (Fernández *et al.*, 2013).

En el caso de las tensiones de tendones, no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio donde poder comparar y discutir los resultados obtenidos, por lo que solo podemos comentar y valorar los mismos intentando darle una explicación coherente sin poder discutir con otros autores los resultados.

Si observamos en conjunto los resultados obtenidos para la fuerza, la sección y la tensión analizando el factor tratamiento, que es el que compara los dos tratamientos en el mismo tiempo, vemos que sólo existen diferencias significativas a las 8 semanas para la relación de fuerzas, y a las 2 semanas para la relación de tensiones. A priori, lo que hubiera sido esperable es que existiera una correlación en los resultados entre la fuerza y la tensión, tanto a 2 como a 8 semanas, y obtener diferencias significativas en la relación de fuerzas a 2 semanas y en la relación de tensiones a 8 semanas, ya que en las secciones no hay cambios significativos desde el análisis del factor tratamiento. Pero recordemos que la significación estaba muy cerca del límite en el periodo de 2 semanas en el análisis de la relación de fuerzas. No es aceptable estadísticamente pero sabemos que los valores anómalos junto con una "n" pequeña y las elevadas dispersiones cuando se trabaja con animales evitan en nuestro estudio que se puedan ver diferencias significativas. Por otro lado sucede una situación similar con los resultados en el caso de la relación de tensiones a las 8 semanas. Tenemos cuatro valores anómalos que no eliminamos para no reducir la "n" de forma notable en todo el estudio. La tensión es una variable calculada, no medida, lo que hace que se acumulen las dispersiones más fácilmente, lo que puede explicar la ausencia de significación.

Si observamos los resultados obtenidos para las tres variables analizando el factor tiempo es donde mayor número de diferencias estadísticamente significativas encontramos. Este factor es el que nos dice cómo está afectando el tiempo a la

reparación de la lesión del tendón. En el caso de la relación de secciones vemos que en los tendones tratados con PRGF se observa significación entre 2 y 4 semanas y entre 4 y 8 semanas, lo que se explica teniendo maduraciones de cicatrización más tempranas que el caso PCB. Además en la relación de tensiones se obtienen diferencias significativas en todos los periodos de estudio para los tendones tratados con PRGF, lo que se puede explicar teniendo un tejido cicatricial más maduro y de mayor calidad.





## ***Conclusiones***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio y bajo las condiciones establecidas en nuestro trabajo, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. La utilización de acetona (grado laboratorio) y hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido) para la sujeción de las piezas anatómicas con las criomandíbulas, es un método eficaz y seguro para la realización de los estudios biomecánicos en el tendón de Aquiles, a la vez que evita las complicaciones que presenta el empleo de nitrógeno líquido.
2. La utilización de PRGF en el tratamiento experimental de roturas tendinosas mejora la resistencia mecánica del tendón a las 8 semanas post-cirugía.

3. Entre las 2 y 4 semanas post-cirugía se produce un incremento brusco de la resistencia a la tracción que es independiente del tratamiento utilizado.
4. La sección de los tendones estudiados no se ve afectada por el tratamiento utilizado en ninguno de los períodos del estudio.
5. La aplicación de PRGF acelera el proceso de cicatrización tendinosa observándose una reducción precoz de la cicatriz en comparación con el grupo placebo.
6. La capacidad de soportar tensión mejora precozmente (2 semanas) con la aplicación de PRGF, lo que puede atribuirse a una mayor calidad del tejido cicatricial obtenido.
7. Existe una mejora en la madurez del tejido cicatricial de los tendones tratados con PRGF que hace que la relación de tensiones progrese paulatinamente entre las 2 y las 8 semanas.

## ***Resumen***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Resumen

El tratamiento con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en las lesiones agudas del tendón de Aquiles es cada vez más frecuente. Se ha podido constatar, en diversos estudios experimentales, que las aplicaciones de PRGF mejoran la cicatrización del tendón y la resistencia biomecánica a la tracción, aunque en la literatura existen resultados controvertidos en este aspecto. El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la evaluación biomecánica 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, previamente validado para el estudio histológico y ecográfico, y mejorar el método de sujeción de los tendones para su valoración en la máquina universal de ensayos.

Para ello, se seccionó el tendón de Aquiles derecho a un grupo de 30 ovejas adultas. Los animales fueron divididos aleatoriamente en seis grupos de estudio, dependiendo del tipo de tratamiento aplicado (PRGF o PLACEBO) y del tiempo de supervivencia (2, 4 y 8 semanas), de manera que había cinco animales en cada grupo. La tenotomía se reparó mediante una sutura de los bordes tendinosos, usando un patrón en triple polea y se inmovilizó la articulación mediante un fijador externo transarticular. Se repitieron las infiltraciones de los tratamientos semanalmente hasta completar un total de 4 infiltraciones como máximo, dependiendo del tiempo de supervivencia.

Tras la eutanasia de los animales, se retiraron los fijadores externos y se extrajeron los tendones de Aquiles, tanto el tendón operado como el contra-lateral sano. Los tendones se testaron en máquina universal de ensayos para valorar su resistencia mecánica a la tracción, evaluando las relaciones que resultaban entre los tendones operados y los sanos para la fuerza, la sección y la tensión, tanto para el análisis del factor tratamiento entre el grupo de PRGF y el grupo placebo, como para el análisis del factor tiempo dentro de un mismo grupo.

El análisis estadístico de los datos recogidos mostró que los tendones tratados con PRGF presentaban una mayor resistencia a la tracción mecánica a las 8 semanas en comparación con los del grupo placebo. Entre las 2 y las 4 semanas se producía un incremento brusco de la resistencia a la tracción tanto de los tendones tratados con PRGF como en el grupo placebo. No aparecían diferencias significativas entre la sección de los tendones tratados con PRGF y los del grupo placebo del mismo periodo pero, los tendones tratados con PRGF sufrían un notable incremento en su sección entre las 2 y las 4 semanas que después se reducía a las 8 semanas. Los tendones tratados con PRGF presentaban un tejido capaz de soportar más tensión a las 2 semanas en comparación con los tendones del grupo placebo.

Podemos decir, tras los resultados de este estudio, que la aplicación de PRGF acelera el proceso de cicatrización mejorando el tejido cicatricial y aumentando su resistencia biomecánica. Existe una mejora en la madurez del tejido cicatricial de los tendones tratados con PRGF que hace que la relación de tensiones progrese paulatinamente entre las 2 y las 8 semanas. Este trabajo corrobora el resultado obtenido en los estudios



histológicos y ecográficos previos, a pesar de que en dicho estudio no se contaba con análisis a las 2 semanas.

Estos resultados indican que el PRGF mejora, como terapia complementaria, el tratamiento de las roturas agudas del tendón de Aquiles.



## *Summary*

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Summary

The application of plasma rich in growth factors (PRGF) to enhance the treatment of Achilles tendon injuries is becoming more and more common. Various experimental studies have demonstrated that the application of PRGF improves tendon healing and the biomechanical resistance to traction, although other studies have questioned the very same results. The aim of this Doctoral Thesis was the biomechanical evaluation of the effect of the application of intra-tendinous injections of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of the Achilles tendon, using for this purpose an experimental model in sheep, previously validated for histological and ultrasound study, and to improve the tendon restraint method for the mechanical studies.

Thirty sheep had their Achilles tendons surgically divided. The sheep were then randomly separated into six groups, depending on the type of treatment applied (PRGF

or PLACEBO) and survival time (2, 4 and 8 weeks), so that each group contained five animals. The tenotomy was repaired by suturing the tendinous edges, employing a three-loop pulley pattern, and the joint was immobilized by a transarticular external skeletal fixation system. The infiltration treatments were repeated on a weekly basis completing a total of 4 infiltrations at the very most.

After the animals were sacrificed, the external skeletal fixation system and Achilles tendons, both the operated tendon and the contra-lateral healthy one, were removed. The tendons were tested in a universal testing machine to assess the mechanical tensile strength, assessing the relationships that resulted between operated tendons and the intact ones for strength, section and tension, both for the analysis of the factor treatment between the PRGF group and the saline group, and for the analysis of the time factor within the same group.

After statistical analysis of the collected data, the results revealed that the PRGF-treated tendons had a higher mechanical resistance to traction at eight weeks compared with the placebo group. Between two and four weeks, a sharp increase in resistance to mechanical traction in both the PRGF-treated tendon and placebo group occurred. No significant differences appeared between the section of the tendons treated with PRGF and the placebo group of the same period but the tendons treated with PRGF suffered a significant increase in its section between two and four weeks and then were reduced after eight weeks. PRGF-treated tendons had tissue that was capable to withstand more stress at two weeks compared to the placebo group tendons

It can be deduced, following the results of this study, that the application of PRGF accelerates the healing process by improving and increasing scar tissue's biomechanical strength. Furthermore, there is an improvement in the maturity of the scar tissue of tendons treated with PRGF which makes the tensile relations progress gradually between two and eight weeks. This study backs up the results obtained in the previous ultrasound and histological studies, even though in those previous studies there was no analysis done at two weeks.

These results indicate that PRGF improves, as complementary therapy, the treatment of acute Achilles tendon ruptures.

## *Limitaciones del estudio y Futuras líneas de trabajo*

Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.





## Limitaciones del estudio

En este trabajo debemos tener en cuenta que una de las limitaciones del estudio experimental es la dificultad, tanto logística como económica, que conlleva realizar estudios con animales de gran tamaño. Hubiera sido deseable contar con un número mayor de animales que permitiera unos análisis estadísticos con una  $n$  mayor por cada grupo de estudio.

Otra de las limitaciones de este modelo experimental es el empleo de tendones de Aquiles sanos, ya que se sabe que el proceso de cicatrización tendinosa presenta variaciones entre los tendones sanos y los tendones patológicos.

Respecto al PRGF, en la especie ovina no se han realizado estudios cuantitativos que determinen la composición y concentración de los diferentes factores de crecimiento

que componen el PRGF, por ello se ha empleado el método descrito por Anitua y colaboradores para esta especie.

En cuanto al número y forma de aplicar el tratamiento de PRGF se siguió la misma pauta descrita por Fernández en 2012. De manera que no conocemos el efecto que tendría sobre el proceso de cicatrización del tendón la aplicación de más o menos inyecciones de PRGF, y tampoco se ha evaluado cuál sería el efecto que tendría sobre la cicatrización tendinosa el acortar o alargar el periodo entre aplicaciones.

Otra limitación la encontramos en el uso de la tensión como variable de estudio. La tensión es una variable calculada, no medida. El tendón no se comporta de la misma manera durante las pruebas de tracción que un material como, por ejemplo, un metal. El tendón antes de romperse se estira variando su sección, de manera que, para poder obtener el dato más correcto, lo ideal sería poder medir la sección del tendón justo en el momento de la rotura.

Tampoco conocemos cuáles serían las consecuencias sobre los resultados si utilizáramos una velocidad más rápida en los estudios de tracción. Se decidió utilizar una velocidad menor para permitir la salida de agua de la estructura anatómica y valorar mejor la resistencia del tejido, pero desconocemos como repercute la velocidad de tracción en los resultados.

También es una limitación desconocer los posibles resultados de las pruebas biomecánicas en tendones a 1 y 3 semanas, ya que parece intuirse que es en los periodos iniciales donde la aplicación del PRGF es de mayor utilidad.

## **Futuras líneas de trabajo**

Una vez terminando este estudio y evaluadas sus limitaciones, creemos que sería conveniente continuar planteando la posibilidad de realizar estudios biomecánicos a 1 y 3 semanas tras la intervención para conocer la repercusión de la aplicación de PRGF en los estadios iniciales.

En próximos estudios se debería valorar cómo afecta la pauta y el número de aplicaciones de PRGF a los resultados.

Actualmente se están llevando a cabo estudios ultra-estructurales de los tendones de Aquiles tratados con PRGF y salino con este mismo modelo experimental, a las 2, 4 y 8 semanas de la cirugía que ayuden a aclarar el mecanismo por el cual el tratamiento con PRGF produce una aceleración en la cicatrización del tendón de Aquiles.



## ***Bibliografía***

**Valoración Biomecánica del Efecto de la Aplicación del Plasma Rico en Plaquetas en la Reparación de una Lesión Estándar del Tendón Calcáneo Común en Ovejas. Estudio Experimental.**



## Bibliografía

1. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Recombinant human insuline-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. Ajaxon I, Persson C. Compressive fatigue properties of a commercially available acrylic bone cement for vertebroplasty. *Biomech Model Mechanobiol.* 2014 Mar 23.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10: 1415-1426.
8. Anitua E, Andía I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 4-15.
9. 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.
10. Anitua E, Sanchez M, De la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012, 20(9): 1657-65.
11. 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.
12. 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.
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 MM, De la Fuente M, Azofra J, Andía 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.
15. 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.
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, 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.
18. 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.
19. 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.
20. Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 Apr; 76(4): 1809-1813.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Aspenberg P, Albrektsson T, Thorngren KG. Local application of growth-factor IGF-I to healing bone. *Acta Orthop Scand.* 1989a; 60 (5): 607-610.
25. Aspenberg P, Forslund C. Bone morphogenetic proteins and tendon repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000; 10: 372-375.
26. Aspenberg P, Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand.* 1999; 70: 51-54.
27. Aspenberg P, Lohmander S. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. *Acta Orthop Scand.* 1989b; 60 (4): 473-476.
28. Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004; 75: 93-99
29. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type  $\beta$  transforming growth factor by activates human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Sep; 84: 6020-6024.
30. 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.

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Barber FA, Hrnack SA, Snyder SJ, Hapa O. Rotator Cuff Repair Healing Influenced by Platelet-Rich Plasma Construct Augmentation. *Arthroscopy.* 2011; 27: 1029-1035.
37. Baums M.H., G. H. Buchhorn, G. Spahn, B. Poppendieck, W. Schultz, and H.-M. Klinger, "Biomechanical characteristics of single-row repair in comparison to double-row repair with consideration of the suture configuration and suture material," *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, vol. 16, no. 11, pp. 1052–1060, Nov. 2008.
38. Beck J, Evans D, Tonino PM, Yong S, Callaci JJ. The biomechanical and histologic effects of Platelet Rich Plasma on rat rotator cuff repairs. *Am J Sports Med.* 2012; 40(9): 2037-2044.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.

43. Bhahot S, Alex JC. Current applications of platelets gel in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002 Feb; 18 (1): 27-33.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. *New Eng J Med.* 2000 May; 4: 1350-1358.
48. 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.
49. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- $\beta$  in disease: The dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1-7.
50. Borrione P, Di Gianfrancesco A, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-Rich Plasma in Muscle Healing. *Am J Phys Med Rehabil.* 2010; 89: 854-861.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Bowen-Pope DF, van Koppen A, Schattelman G. Is PDGF really important? Testing the hypotheses. *Trends Genet.* 1991; 4: 413-418.

55. Bowser JE, Elder SH, Rashmir-Raven AM, Swiderski CE. A cryogenic clmping technique that facilitates ultimate tensile strength determinations in tendons and ligaments. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2011; 24: 370-373.
56. 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.
57. Brodie M., L. Vollenweider, J. L. Murphy, F. Xu, A. Lyman, W. D. Lew, and B. P. Lee, "Biomechanical properties of Achilles tendon repair augmented with a bioadhesive-coated scaffold," *Biomed Mater*, vol. 6, no. 1, p. 015014, Feb. 2011.
58. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Resconstr Surg*. 1991; 88(2): 189-194.
59. 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.
60. Brown J, Sivan M. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injection for chronic patellar tendinopathy: a case report. *PM & R*. 2010; 2: 969-972.
61. 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.
62. 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.
63. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*. 1988 Feb; 81: 277-281.
64. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Ann Rev Med*. 1991; 42: 17-24.
65. Canalis E. Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75(1): 1-4.
66. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003; 8: 980-989.
67. Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2002 Oct; 133(10): 1383-1386.
68. Carmichael S: The external fixator in small animal orthopedics. *J Small Ani Pract*. 1991; 32: 486-493.

69. 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*. 1981 Sep; 17(9): 777-785.
70. 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.
71. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor  $\beta$  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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. Chang J, Thunder R, Most D, Longaker MT, Lineaweaver WC. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF- $\beta$ 1 increase postoperative range of motion. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 105: 148-155.
77. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec; 22(4): 233-241.
78. 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.
79. 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.
80. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30: 293-298.

81. 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.
82. 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.
83. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med.* 2008; 42.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. de Oliveira R., K. de Lira, P. de Castro Silveira, M. Coutinho, M. Medeiros, M. Teixeira, and S. de Moraes, "Mechanical Properties of Achilles Tendon in Rats Induced to Experimental Diabetes," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 39, no. 5, pp. 1528–1534, 2011.
89. 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.
90. 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.
91. 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.

92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Duan C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J Endocrinol.* 2002; 175: 41-54.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 2002; 4: 252-260.
103. Fernández Sarmiento JA, Dominguez JM., Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gomez-Villamandos RJ, Muñoz-Rascón P, Martín de Las Muelas J, Millán Y, García-Balletbó M, Cugat R. Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Feb 6; 95(3): 246-255.

104. Fernández, JA. 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. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 2012. Pp 486.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Filardo G, Presti ML, Kon E, Marcacci M. Nonoperative biological treatment approach for partial Achilles tendon lesion. *Orthopedics.* 2010b; 33: 120-123.
110. Floryan K.M., Berghoff W. J. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J* 2004, 80, 668-74, quiz 675-8.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. Fukuda A, Kato K, Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Okazaki K, Tsuta K, Shikunami 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.



116. 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.
117. Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008; 39 (S1): S88-S96.
118. 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.
119. Gandhi A, Dumas 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.
120. 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.
121. Gaweda K, Tarczynska M, Krzyzanowski W. Treatment of Achilles Tendinopathy with Platelet-Rich Plasma. *Int J Sports Med*. 2010; 31: 577-583.
122. Gear ARL, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation*. 2003; 10: 335-350.
123. Gelberman RH, Manske PR, Akeson WH, Woo SLY, Lundborg G, Amiel D. Flexor Tendon Repair. *J Orthop Res*. 1986; 4: 119-128.
124. 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.
125. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000; 355: 1531-1539.
126. 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.
127. Grageda E. Platelet-Rich Plasma and bone graft materials: A review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004; 13: 301-309.
128. 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.
129. Grimaud E, Heymann D, Rédini F. Recent advances in TGF- $\beta$  effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF- $\beta$  in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13: 241-257.

130. 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.
131. 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.
132. Han B, Woodell-May J, Ponticiello 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.
133. Harmon KG. Muscle injuries and PRP: what does the science say? *Br J Sports Med*. 2010; 44: 616-617.
134. Harrison P, Cramer EM. Platelets alfa granules. *Blood Reviews*. 1993; 7: 52-62.
135. Hartwig J, Italiano J,Jr. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1580-1586.
136. 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.
137. Hettrich CM1, Gasinu S, Beamer BS, Stasiak M, Fox A, Birmingham P, Ying O, Deng XH, Rodeo SA. The Effect of Mechanical Load on Tendon-to-Bone Healing in a Rat Model. *Am J Sports Med*. 2014 May;42(5):1233-41.
138. 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.
139. Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot Ankle Clin*. 2007; 12: 553-567.
140. 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.
141. 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.
142. 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.
143. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg*. 2004; 29A: 551-563.
144. <http://bti-biotechnologyinstitute.com/es>.
145. <http://legal-anatomical.medicalillustration.com/generateexhibit.php?ID=26839>.

146. <http://legal-anatomical.medicalillustration.com/generateexhibit.php?ID=26839>.
147. [http://secure.cdn.arthrex.com/pdfs/sjjfj\\_kEEeCRTQBQVoRHOW/sjjfj\\_kEEeCRTQBQVoRHOW.pdf?Expires=1400840694&Signature=csrCn7ZLIp1h5gZOgxZ5pf46tM8rpk5nb6GzMROsNcXpDc2yDm1Y%7Ey2OivkYfC35TW5qjKOIqVN3L3%7EjSHEKoy-Yf0%7EUe-n9qWBvV9zVKkkMml8DPEX3ScALI8wnK61Ch1EQyhj4zSK3yJ0HiHDmk%7ENT2eWnwE0GgWhHIIsagi6I\\_&Key-Pair-Id=APKAIXYFKLX6GHMYCAUQ](http://secure.cdn.arthrex.com/pdfs/sjjfj_kEEeCRTQBQVoRHOW/sjjfj_kEEeCRTQBQVoRHOW.pdf?Expires=1400840694&Signature=csrCn7ZLIp1h5gZOgxZ5pf46tM8rpk5nb6GzMROsNcXpDc2yDm1Y%7Ey2OivkYfC35TW5qjKOIqVN3L3%7EjSHEKoy-Yf0%7EUe-n9qWBvV9zVKkkMml8DPEX3ScALI8wnK61Ch1EQyhj4zSK3yJ0HiHDmk%7ENT2eWnwE0GgWhHIIsagi6I_&Key-Pair-Id=APKAIXYFKLX6GHMYCAUQ).
148. <http://www.harvesttech.com/harvest-prp>.
149. <http://www.secquire.com/index4.htm>.
150. Huang SS, Huang JS. TGF- $\beta$  control of cell proliferation. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 447-462.
151. Huang T.F. S. M. Perry, and L. J. Soslowsky, "The Effect of Overuse Activity on Achilles Tendon in an Animal Model: A Biomechanical Study," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 32, no. 3, pp. 336–341, 2004.
152. Huffard B., P. F. O'Loughlin, T. Wright, J. Deland, and J. G. Kennedy, "Achilles tendon repair: Achillon system vs. Krackow suture: An anatomic in vitro biomechanical study," *Clinical Biomechanics*, vol. 23, no. 9, pp. 1158–1164, Nov. 2008.
153. 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.
154. Hulth A, Johnell O, Miyazono K, Lindberg L, Heinegard D, Heldin CH. Effect of transforming growth factor- $\beta$  and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *J Orthop Res.* 1996; 14: 547-553.
155. Ignotz RA, Massagué J. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectina and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986 Mar; 261(9): 4337-4345.
156. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials.* 2009; 30: 4956-4966.
157. 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.
158. 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.
159. Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin, United States.* 2005; 255-266.

160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. Jozsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports*. 1997a; 7: 113-118.
165. Jozsa L, Kannus P. *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Champaign, Illinois (EEUU). Human Kinetics; 1997b.
166. 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.
167. 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.
168. 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.
169. 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.
170. 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.
171. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10: 312-320.

172. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet  $\alpha$  granules contain a growth factor for fibroblast. *Blood*. 1979 Jun; 53(6): 1043-1052.
173. 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.
174. 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.
175. Kastelic J, Galeski A, Baer E: The multicomposite structure of tendón. *Connect Tissue Res* 1978; 6(1):11-23.
176. 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.
177. Kaux JF, Croisier JL, Bruyère O, Rodriguez C, Daniel C, Godon B, Simoni P, Alvarez V, Brabant G, Lapraille S, Lonneux V, Noël D, Collette J, Goff CL, Gothot A, Crielaard JM. Platelet-rich plasma (PRP) to treat upper patellar tendinopathies. *Br J Sports Med*. 2013,Jul; 47(10):e3.
178. Kaux JF, Drion PV, Colige A, Pascon F, Libertiaux V, Hoffmann A, Janssen L, Heyers A, Nusgens BV, Le Goff C, Gothot A, Cescotto S, Defraigne JO, Reckert M, Crielaard JM. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats. *Wound Repair Regen*. 2012 Sep-Oct; 20(5): 748-56.
179. Kawamoto K, Matsuda H. Nerve growth factor and wound healing. *Prog Brain Res*. 2004; 146: 369-384.
180. Kawamura M, Urist M. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol*. 1988; 130: 435-442.
181. 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.
182. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor  $\beta$  by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*. 1986 May; 163: 1037-1050.
183. 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.

184. 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.
185. 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.
186. 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.
187. 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.
188. Kim MY1, Farnebo S, Woon CY, Schmitt T, Pham H, Chang J. Augmentation of tendon healing with an injectable tendon hydrogel in a rat achilles tendon model. *Plast Reconstr Surg*. 2014 May; 133(5):645e-53e.
189. Kiritsy CP, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(5): 729-760.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. Klein MB, Yalamanchi N, Pham H, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF- $\beta$  on tendon cell collagen production. *J Hand Surg*. 2002; 27a; 615-620.
195. 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.

196. 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.
197. 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.
198. 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.
199. 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.
200. 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.
201. 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.* 2011; 19: 516-527.
202. 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.
203. Landesberg R, Moses M, Karparkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56: 1116-1117.
204. 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.
205. Lansdown ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Rep Reg.* 2002; 10: 271-285.
206. 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.

207. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, Höcker P, Körmöczy 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.
208. Leppilahti J, Orava S. Total Achilles tendon rupture - A review. *Sports Med*. 1998; 25: 79-100.
209. Letson AK, Dahners LE. The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop Rel Res*. 1994; 308: 207-212.
210. 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.
211. Lewis DD, Cross AR, Carmichael S, Anderson MA: Recent advances in external skeletal fixation. *J Small Anim Pract*. 2001, 42:103-112.
212. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14: 91-98.
213. Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor- $\beta$  enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*. 1993; 64(5): 553-556.
214. Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. *Acta Orthop Scand*. 1996; 67(4): 407-417.
215. 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.
216. Longo UG, Ronga M, Maffulli N. Acute ruptures of the achilles tendon. *Sports Med Arthrosc*. 2009; 17: 127-138.
217. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone*. 1999 Aug; 25(2): 475-505.
218. Lundborg G, Rank F, Heinau B. Intrinsic tendon healing –a new experimental- model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1985; 19: 113-117.
219. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest*. 1989; 84: 640-646.
220. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- $\beta$  from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*. 1988; 106: 1659-1665.
221. 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.



222. 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.
223. 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.
224. 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.
225. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakararis A. The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009a; 129: 1577-1582.
226. 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.
227. 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.
228. 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.
229. Maffulli N, Longo UG, Maffulli GD, Khanna A. Achilles tendon ruptures in elite athletes. *Foot Ankle Int.* 2011; 32: 9-15.
230. 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.
231. Maffulli N. Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81a: 1019-1036.
232. 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.
233. 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.

234. 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.
235. Manning DW, Spiguel AR, Mass DP. Biomechanical analysis of partial flexor tendon lacerations in zone II of human cadavers. *J Hand Surg Am*. 2010 Jan;35(1):11-8.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. 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.
240. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*. 2001 Aug; 51(4): 292-299.
241. Martinoli C, Derchi LE, Pastorino C, Bertolotto M, Silvestri E. Analysis of echotexture of tendons with us. *Radiology*. 1993; 186: 839-843.
242. 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.
243. Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225-228.
244. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 489-496.
245. Massagué J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 753-791.
246. 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.
247. Matras H. Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg*. 1985; 43: 605-611.
248. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex®. *Vox Sang*. 2008; 94: 202-208.

249. 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®, Plateltex® and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009; 97: 110-118.
250. 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.
251. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 3; 94(19):e143(1-8).
252. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: Basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma.* 2008; 22: 433-438.
253. 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.
254. 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.
255. 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.
256. Milano G, Passino ES, Deriu L, Careddu G, Manunta L, Manunta A, Saccomanno MF, Fabbriani 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.
257. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006; 34: 1774-1778.
258. 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.
259. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* 2009b; 28: 113-125.
260. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Feb; 263: 30-48.
261. 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.

262. Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003; 33(5): 381-394.
263. Montalto M, Davies F, Marijanovic N, Meads A. Skin surface temperature: a possible new outcome measure for skin and soft tissue infection. *Australian family Physician.* 2013; 42: 9.
264. Monto RR. Platelet rich plasma treatment for chronic Achilles tendinosis. *Foot Ankle Int.* 2012 May; 33(5):379-85.
265. Moojen DJF, Everts PAM, Schure R-M, Overdeest 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.
266. 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.
267. 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.
268. 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.
269. Movin T, Ryberg A, McBride DJ, Maffulli N. Acute rupture of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin, United States.* 2005; 331-356.
270. 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.
271. 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.
272. 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.
273. 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.

274. Musani S1, Musani I, Dugal R, Habbu N, Madanshetty P, Virani D. An in vitro Comparative Evaluation of Micro Tensile Bond Strength of Two metal bonding Resin Cements bonded to Cobalt Chromium alloy. *J Int Oral Health*. 2013 Oct;5(5):73-8.
275. 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.
276. 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.
277. 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.
278. Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res*. 2008; 75: 135-141.
279. Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*. 1997; 18: 1201-1225.
280. 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- $\beta$ . *J Orthop Res*. 1998; 16: 531-541.
281. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin, United States*. 2005; 225-238.
282. 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.
283. Oreilly MAR, Massouh H. The sonographic diagnosis of pathology in the Achilles-tendon. *Clin Radiology*. 1993; 48: 202-206.
284. 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.
285. 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.
286. 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.
287. 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.

288. 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.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biol.* 1991; 45: 319-326.
294. 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.
295. Platt MA. Tendon repair and healing. *Clin Podiatr Med Surg.* 2005; 22: 553-560.
296. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblast by transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med.* 1987 Jan; 165: 251-256.
297. Potenza AD. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog –an experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* 1962; 44: 49-64.
298. 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.
299. 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 osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res.* 2008; 49(3): 293-297.

300. 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.
301. 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.
302. Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1982 May; 257(9): 5154-5160.
303. 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.
304. 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.
305. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 1988; 241: 708-712.
306. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg Med*. 1998; 22: 281-287.
307. Reed GL. Platelet secretion. In *Platelets* (Ed. Michelson AD), 2<sup>o</sup> Ed.: Elsevier Science, San Diego. 2007; 309-318.
308. 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.
309. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001; 12: 261-273.
310. 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- $\beta$ , and tyrphostin. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 337(2): 149-158.
311. 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).

312. 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  $\beta$ : 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.
313. 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  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) in vitro. *J Cell Biol*. 1987 Jul; 105(1): 457-463.
314. Robinson P. Sonography of Common Tendon Injuries. *Am J Roentgenol*. 2009; 193: 607-618.
315. Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF- $\beta$  signalling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Dec; 15(12): 1367-1377.
316. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986 Jul; 46(18): 155-169.
317. Ruiz-Moneo P, Molano-Muñoz J, Prieto E, Algorta J. Plasma rich in growth factors in arthroscopic rotator cuff repair: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Arthroscopy* 2013 Jan; 29(1): 2-9.
318. Rupp S, Tempelhof S, Fritsch E. Ultrasound of the Achilles -tendon after surgical repair-morphology and function. *Br J Radiol*. 1995; 68: 454-458.
319. 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.
320. Saleh H, Cox F. Gravitational platelet separation. Accelerating the body's own healing process. *Br J Periop Nurs*. 2004; 14 (4): 175-179.
321. Sammarco GF, Burstein AH, Davis WL, Frankel VH. The biomechanics of torsional fractures: the effect of loading on ultimate properties. *J Biomech*. Mar; 4(2). 113-7.
322. Sampath TK, Muthukumar 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.
323. 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.



324. Sampson S., Gerhardt M., Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2008, 1, 165-74.
325. Sánchez M, Anitua E, Andía I. Application of Autologous Growth Factors on Skeletal Muscle Healing., 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig (Alemania). 2005.
326. 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.
327. 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.
328. 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.
329. 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.
330. 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.
331. 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.
332. 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.
333. 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.
334. 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.
335. 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.

336. 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.
337. Schepisis AA, Jones H, Haas AL. Achilles tendon disorders in athletes. *Am J Sports Med*. 2002; 30: 287-305.
338. 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.
339. 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.
340. 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.
341. Scordino LE, DeBerardino TM. Biologic Enhancement of Meniscus Repair. *Clin Sports Med*. 2012; 31: 91.
342. 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.
343. Seijas, R. Estudio de Evaluación de la Cicatrización en Ligamentoplastía de Cruzado Anterior de Rodilla. Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera CEU. Valencia. 2013. Pp 288.
344. 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.
345. Serra CI. 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. Tesis Doctoral. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. 2006.
346. Serra CI, Soler C, Carrillo JM, Sopena JJ, Redondo JI, Cugat R. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Aug;21(8):1730-6.
347. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006; 6: 181-190.
348. Sharma P, Maffulli N. The future: rehabilitation, gene therapy, optimization of healing. *Foot Ankle Clin*. 2005b; 10: 383-397.

349. Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing?. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009; 17: 676-682.
350. 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.
351. Sitaras NM, Sariban E, Pantazis P, Zetter B, Antoniadis 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.
352. Skerry TM, Lanyon LE. Immobilisation induced bone loss in the sheep is not modulated by calcitonin treatment. *Bone.* 1993, 14: 511-516.
353. 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.
354. Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler H, Dines J, Hee C. Comparison of the Effect of Intra-Tendon Applications of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB, Platelet-Rich Plasma, Steroids in a Rat Achilles Tendon Collagenase Model. *Journal of Orthopaedic Research.* 2014, 145-150.
355. Soler C. Análisis macroscópico, histológico e inmunohistoquímico del efecto del Plasma Rico en Plaquetas autólogo en la reparación de defectos condrales en conejo. Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. 2006.
356. Song L., R. E. Olsen, J. P. Spalazzi, and T. Davisson, "Biomechanical Evaluation of Acellular Collagen Matrix Augmented Achilles Tendon Repair in Sheep," *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, vol. 49, no. 5, pp. 438-441, Sep. 2010.
357. 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.
358. 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.
359. 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.
360. 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.

361. 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.
362. 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.
363. 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.
364. Sumner DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor- $\beta$ . *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Aug; 77a(8): 1135-1140.
365. 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.
366. 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.
367. 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.
368. 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.
369. 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.
370. 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.
371. 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.

372. Thomopoulos S, Das R, Silva MJ, Sakijama-Elbert S, Harwood FL, Zampiakos E, Kim HM, Amiel D, Gelberman RH. Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res.* 2009; 25.
373. Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF- $\beta$  binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 38-41.
374. 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.
375. 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.
376. 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.
377. Tuite DJ, Renstrom P, O'Brien M. The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports.* 1997; 7: 72-77.
378. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012 Dec;65(12): 1712-9
379. 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.
380. van Buul GM, Koevoet WLM, Kops N, Bos PK, Verhaar JAN, Weinans H, Bernsen MR, van Osch GJVM. Platelet-Rich Plasma Releasate Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. *Am J Sports Med.* 2011; 39: 2362-2370.
381. 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.
382. 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.
383. 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.

384. 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.
385. 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.
386. 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.
387. Virchenko O, Fahlgren A, Rundgren M, Aspenberg P. Early Achilles tendon healing in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008; 128: 1001-1006.
388. Virchenko O, Grenegard M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop.* 2006b; 960-966.
389. 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.
390. 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.
391. 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.
392. 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.
393. Wang JH, Guo Q, Li B. Tendon biomechanics and mechanobiology - a mini - review of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 2012; 25(2): 133-141.
394. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech.* 2006; 39: 1563-1582.
395. 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.

396. 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.
397. 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.
398. Weatherall JM, Mroczek K, Tejwani N. Acute Achilles Tendon Ruptures. *Orthopedics.* 2010; 33: 758-764.
399. 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.
400. 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.
401. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRP® system versus the Friadent-Schülze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res.* 2003a; 14: 233-239.
402. 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.
403. 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.
404. 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.
405. 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.
406. Westphal RG. Health risks to cytopheresis donors. *Clin Haematol.* 1984; 13(1): 289-301.
407. 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.
408. 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.

409. 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.
410. Wieloch P, Buchmann G, Roth W, Rickert M. A cryo-jaw designed for in vitro tensile testing of the healing Achilles tendons in rats. *J Biomech* 2004; 37: 1719–22.
411. Wnuk T, Blacha J, Mazurkiewicz T, Olchowik G, Chyzynska M. The mechanical and histological estimation of calcaneal tendon callus in rats after PRP injection. *Pol Orthop Traumatol.* 2012 May 24;77: 5-9.
412. 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.
413. Wren T.A., S. A. Yerby, G. S. Beaupré, and D. R. Carter, "Mechanical properties of the human achilles tendon," *Clinical Biomechanics*, vol. 16, no. 3, pp. 245–251, Mar. 2001.
414. 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.
415. 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.
416. Xie X, Wu H, Xie G, Huangfu X, Zhao J. The effect of platelet-rich plasma on patterns of gene expression in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. *J Surg Res.* 2013. 180(1): 80-8.
417. 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.
418. 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.
419. Yinger K, Mandelbaum BR, Almekinders LC. Achilles rupture in the athlete. Current science and treatment. *Clin Podiatr Med Surg.* 2002; 19: 231-50.
420. 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.
421. 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.



422. 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.
423. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood.* 2000 Jun; 95(12): 4004-4007.
424. 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.
425. Yuehuei H. An, Freidman RJ. *Animal Models in Orthopaedic Research.* CRC; 1 Ed. Septiembre 30, 1998.
426. 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.
427. 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.
428. 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.
429. 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.
430. 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.