

Estandarización del plasma rico en plaquetas como medicamento para la artrosis

Lucía Gato Calvo

Tesis Doctoral UDC / 2019

Directores:

Francisco Javier Blanco García

Elena Fernández Burguera

Tutor:

Francisco Javier Blanco García

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Memoria presentada para optar al grado de Doctor Internacional



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



D. Francisco Javier Blanco García, Director Científico del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y **Dña. Elena Fernández Burguera**, investigadora postdoctoral del CIBER-BBN y del INIBIC.

CERTIFICAN:

Que **Dña. Lucía Gato Calvo**, Graduada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Estandarización del plasma rico en plaquetas como medicamento para la artrosis”**.

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor Internacional.

Dr. Francisco Javier Blanco García

Dra. Elena Fernández Burguera

En A Coruña, 05 de Diciembre de 2018



UNIVERSITÄT
HEIDELBERG
ZUKUNFT
SEIT 1386

Parte de la investigación incluida en esta Tesis ha sido realizada bajo la supervisión de la Dra. Karen Bieback, líder del *Stem Cell Lab*, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Heidelberg, Alemania, durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2016.

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a todas esas personas anónimas que, desinteresadamente, han cedido una parte de sí para hacer posible este trabajo. Muchas gracias a todos esos donantes que depositan su confianza en la investigación para mejorar las expectativas de otras personas.

Gracias a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Blanco y la Dra. Elena Fernández Burguera, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo dentro de la Unidad de Medicina Regenerativa del Grupo de Investigación en Reumatología del INIBIC. Gracias por ayudarme a dar los primeros pasos en el mundo de la investigación, formarme y guiarme durante todo el proceso que hoy me permite optar al título de Doctora.

Tengo que agradecer también al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, la Universidade de A Coruña, la Fundación Profesor Novoa Santos, la Fundación Barrié y la Sociedad Española de Reumatología la financiación de mi formación doctoral, mi estancia predoctoral en el extranjero y mi asistencia a congresos.

Gracias a todos mis compañeros del INIBIC, presentes y pasados, por haberme enseñado y ayudado a lo largo de estos años. Cada minuto, cada hora, cada día, cada semana, cada mes... todos habéis contribuido de una u otra forma a que este barco llegase a buen puerto.

Tamara, gracias por tus inagotables consejos y buen humor. Contigo he aprendido a ver las cosas desde otro punto de vista y me has ayudado a crecer como profesional y como persona.

Ángela, contigo empecé a aprender en qué consistía la investigación. Gracias por enseñarme a moverme en el laboratorio, por confiar en mí y por dejarme cacharrear. Así decidí que, definitivamente, quería dedicarme a esto.

Cris, gracias por todas las horas que hemos pasado juntas en la poyata, por todas las alegrías y penas compartidas, y por tu amistad. Eres una gran persona, trabajadora y perseverante, y estoy segura de que llegarás tan lejos como tú quieras.

Noemi, gracias por todos los momentos de aprender enseñando y enseñar aprendiendo. No hay crisis técnica de la que no podamos salir airoas y con una sonrisa.

Al grupo de Genómica, por toda la experiencia y ayuda técnica: Sara, Merce, Estefa, María Eugenia, Ángel, Nacho, Andrea y Durán. Al grupo de Proteómica, por todas las dudas resueltas y aprendizajes sobre la marcha: Valentina, Patricia, Lucía, Bea, María y Lucía G. A mis vecinos de U, el grupo CellCom, por las risas y tropezones y por la animación del trabajo a deshoras y a desdías: Marta, Adrián, Paula, Raquel y Marina. A Clara, Rocío y María, por todas las horas y espacios compartidos. A Carlos, por el flujo de conocimientos y sus consejos desinteresados. Y también al grupo de Biología del Cartílago: Bea, Paloma, Uxía e Irene.

No podría dejar de agradecer la ayuda técnica de Noa, Puri y Mariajo, porque todo se puede hacer cuando se sabe cómo. Tampoco podría olvidarme de la inestimable ayuda de Almudena, Esther y José Luis, del Servicio de Hematología, ni de toda la enorme gestión administrativa y burocrática de Fani y Pilar.

A Paula, Elba, Noe, Laura y Miri... por estar siempre ahí y ayudarme a avanzar en la introducción, nudo y desenlace de este capítulo de mi vida.

Y por supuesto a mi familia, por todo el apoyo incondicional, la comprensión y los momentos de risa y desconexión. Especialmente a mi madre, Fina... todo esto empezó allá por 2009, cuando tu mayor sueño era que yo estudiase en la Universidad. De ti he aprendido la determinación y la capacidad de sacrificio que me han traído hasta aquí. Ha sido un camino largo y accidentado del que has visto lo mejor y lo peor, pero, año tras año, has ido borrando mis inseguridades y empujándome para seguir avanzando. Jamás podré agradecerte todo lo que has hecho por mí y, si alguien se merece una dedicatoria y sentirse parte de este triunfo, sin duda eres tú.

GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE	XI
ABREVIATURAS	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIII
ÍNDICE DE TABLAS	XXXI
RESÚMENES	XXXV
RESUMEN.....	XXXVII
RESUMO.....	XXXIX
SUMMARY.....	XLI
INTRODUCCIÓN	1
1 ESTRUCTURA DE LAS ARTICULACIONES. LA ARTICULACIÓN DIARTRODIAL.....	3
1.1 <i>El cartílago articular</i>	5
2 LA ARTROSIS.....	11
2.1 <i>Definición</i>	11
2.2 <i>Alteraciones moleculares: inflamación y OA</i>	11
2.3 <i>Alteraciones fisiológicas y anatómicas en la OA</i>	13
2.4 <i>Epidemiología y coste socioeconómico</i>	15
2.5 <i>Opciones terapéuticas</i>	16
3 EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	19
3.1 <i>La plaqueta</i>	19
3.2 <i>Aplicación clínica de las plaquetas: el plasma rico en plaquetas</i>	23
3.3 <i>Metodologías de preparación</i>	23
3.4 <i>Marco legal para su obtención y aplicación</i>	26
3.5 <i>Indicaciones principales del PRP y sus derivados para el tratamiento de la OA</i>	28
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	37
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	43
1.1 <i>Obtención de sangre periférica</i>	43
1.2 <i>Obtención de cartílago articular</i>	43
1.3 <i>Obtención y cultivo de condrocitos articulares</i>	44
1.4 <i>Obtención y cultivo de BM-MSCs</i>	44
2 PREPARACIÓN DE PRP ESTANDARIZADO.....	45

3 CONDICIONES EXPERIMENTALES Y ESTÍMULOS EMPLEADOS	47
4 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA, OSTEOGÉNICA Y ADIPOGÉNICA DE MSCs.....	48
4.1 Diferenciación condrogénica	48
4.2 Diferenciación osteogénica	51
4.3 Diferenciación adipogénica.....	52
5 ESTUDIOS DE POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO	53
6 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR	54
7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	54
7.1 Extracción de ARN.....	54
7.2 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN	56
7.3 Síntesis de ADN complementario.....	57
7.4 Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR.....	57
8 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA Y LIPÍDICA MEDIANTE ELISA	60
8.1 Cuantificación proteica de IL-6, IL-8, MMP-13, TNF α e IL-1Ra.....	60
8.2 Cuantificación fosfolipídica de PGE ₂	61
9 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT.....	61
9.1 Extracción y cuantificación de proteínas celulares totales.....	61
9.2 Separación electroforética SDS-PAGE.....	62
9.3 Transferencia a membrana.....	63
9.4 Inmunodetección.....	63
9.5 Cuantificación y análisis de los datos.....	64
10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	64
10.1 Tinción inmunocitoquímica	64
10.2 Tinción inmunohistoquímica.....	66
11 ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS.....	66
11.1 Procesado histológico	66
11.2 Procesado citológico.....	66
11.3 Hematoxilina-eosina	67
11.4 Tricómico de Masson	67
11.5 Safranina O.....	68
11.6 Safranina O-fast green	68
11.7 Azul alcian-periodic acid Schiff.....	69

11.8 Azul de toluidina.....	70
11.9 Rojo alizarina.....	71
11.10 Oil-Red-O.....	71
11.11 Análisis de imagen por microscopía	72
12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	72
RESULTADOS.....	73
1 ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL PRP	75
2 EFECTOS DEL PRP SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR	77
3 DIFERENCIACIÓN DE <i>BM-MSCs</i> ESTIMULADAS CON L-PRP.....	80
3.1 Estudios de condrogénesis en formato tridimensional en pellet.....	80
3.2 Estudios de osteogénesis.....	85
3.3 Estudios de adipogénesis.....	87
4 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA DE <i>MSCs</i> INCLUIDAS EN G-PRP.....	91
4.1 Estabilidad de los biomateriales.....	91
4.2 Viabilidad celular en los biomateriales.....	93
4.3 Influencia de la concentración de plaquetas en la inducción de la condrogénesis	93
5 POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DEL L-PRP EN CONDROCITOS Y CARTÍLAGO OA	98
5.1 Efectos del L-PRP sobre la expresión génica de mediadores proinflamatorios en condrocitos OA	98
5.2 Efectos del L-PRP sobre la secreción de mediadores proinflamatorios en condrocitos OA	106
5.3 Efectos del L-PRP sobre la expresión proteica de enzimas involucradas en el proceso inflamatorio en condrocitos OA	111
5.4 Efectos del L-PRP sobre la degradación inflamatoria de la matriz en explantes de cartílago OA	119
DISCUSIÓN	123
1. ESTANDARIZACIÓN DEL PRP EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS.....	125
2. EFECTO DEL PRP ESTANDARIZADO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR.....	128

3. INDICACIÓN 1: TRATAMIENTO INTRAARTICULAR PARA FAVORECER LA CONDROGÉNESIS	131
4. INDICACIÓN 2: SOPORTE CON MSCs PARA APLICACIONES DE INGENIERÍA TISULAR DEL CARTÍLAGO	134
5. INDICACIÓN 3: TERAPIA INTRAARTICULAR ANTIINFLAMATORIA	136
6. MEDIADORES Y RUTAS IMPLICADAS EN LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS DERIVADOS DE PRP DESARROLLADOS	147
CONCLUSIONES.....	153
CONCLUSIONES.....	155
CONCLUSIONS	156
BIBLIOGRAFÍA.....	157
ANEXOS	187
ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	189
ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	195
ARTÍCULOS.....	195
CAPÍTULOS DE LIBRO	195
PROCEEDINGS DE CONFERENCIAS	195
COMUNICACIONES ORALES.....	196
COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	197

ABREVIATURAS

18S	Subunidad ribosomal 18S
AA-PAS	Azul alción- <i>periodic acid Schiff</i> / ácido peryódico de Schiff
ACAN	Agrecano
ACR	<i>American College of Rheumatology</i> / Colegio Americano de Reumatología
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> / proteína desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospodina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> / adenosín difosfato
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Ag	Agarosa / <i>agarose</i>
AH	Ácido hialurónico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i> / fosfatasa alcalina
AP-1	<i>Activation protein 1</i> / proteína de activación 1
ARA	Ácido araquidónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT	Azul de toluidina
AT-MSCs	<i>Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells</i> / células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> / adenosín trifosfato
Auto	Automático
<i>bFGF</i>	<i>Basic fibroblast growth factor</i> / factor básico de crecimiento de fibroblastos
BM-MSCs	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells</i> / células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> / proteína morfogénica ósea
C	Cerrado
C-	Control negativo
C/EBP- β	<i>CCAAT/enhancer binding protein β</i> / proteína β de unión a CCAAT/potenciador
c/p	células/pocillo
C+	Control positivo
CAEIG	Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia
<i>cAMP</i>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> / adenosín monofosfato cíclico
CD	Centrifugación doble
CE	Conformidad Europea
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
<i>CILP</i>	<i>Cartilage intermediate layer protein</i> / proteína de capa intermedia de cartílago
COL	Colágeno
<i>COMP</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i> / proteína oligomérica de matriz de cartílago
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CS	Centrifugación simple

CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> / ligando de quimioquina con motivo C-X-C
DAB	3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> / medio de Eagle modificado según Dulbecco
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Endothelial growth factor</i> / factor de crecimiento endotelial
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> / ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EQ	Escala de valoración de calidad de vida Euro-Qol
Eri	Eritrocitos
F	Formaldehido
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i> / proteína 4 de unión a ácidos grasos
GFs	<i>Growth factors</i> / factores de crecimiento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> / Administración de Alimentos y Medicamentos
G	Galgas
GAGs	Glucosaminoglicanos
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> / gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GP	Glucoproteína
G-PRP	Gel de plasma rico en plaquetas estandarizado / <i>gel of standardized platelet rich plasma</i>
GRO α	<i>Growth-regulated oncogene α</i> / oncogén α regulado por el crecimiento
GSH	Glutación
H-E	Hematoxilina-eosina
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> / factor de crecimiento de hepatocitos
HMW	<i>High molecular weight</i> / alto peso molecular
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> / hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
ICQ	Inmunocitoquímica
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> / factor de crecimiento insulínico
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IKDC	<i>International Knee Documentation Committee</i> / comité internacional de documentación de la rodilla
IL	Interleuquina / <i>interleukin</i>
IL-1Ra	Receptor antagonista de IL-1
INIBIC	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
KOOS	<i>Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score</i> / puntuación de resultados de daño en la rodilla y artrosis
L	Lisado de PRP
Leu	Leucocitos
LMW	<i>Low molecular weight</i> / bajo peso molecular
LP	<i>Leukocyte-poor</i> / pobre en leucocitos
L-PRP	Lisado de plasma rico en plaquetas estandarizado / <i>lysate of standardized platelet rich plasma</i>

LPS	Lipopolisacárido
LR	<i>Leukocyte-rich</i> / rico en leucocitos
MAdipo	Medio adipogénico comercial
MCondro	Medio condrogénico comercial
MEC	Matriz extracelular
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> / metaloproteasa de matriz
MOsteo	Medio osteogénico comercial
MP	Marcador de peso molecular
MSCs	<i>Mesenchymal stromal cells</i> / células mesenquimales estromales
NANOG	Homeodominio Nanog
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> / Centro Nacional de Información para la Biotecnología
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i> / factor nuclear κ B
NI	No indicado
NO	<i>Nitric oxide</i> / óxido nítrico
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i> / sintasa 2 de óxido nítrico
nt	Nucleótidos
OA	<i>Osteoarthritis</i> / artrosis
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i> / Sociedad Internacional para la Investigación de la Artrosis
P/E	Penicilina/estreptomina
p/v	peso/volumen
ParaF	Paraformaldehído
PBGD	Porfobilinógeno desaminasa
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / tampón fosfato salino
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> / factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PECAM	<i>Platelet and endothelial cell adhesion molecule</i> / molécula de adhesión a plaquetas y células endoteliales
PEF	<i>Platelet enrichment factor</i> / factor de enriquecimiento en plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂ sintasa
PLA2	<i>Phospholipase A2</i> / fosfolipasa A2
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> / fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POU5F1	<i>POU class 5 homeobox 1</i> / factor de transcripción 1 con homeodominio POU de clase 5
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i> / receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas / <i>platelet rich plasma</i>
PSA	Persulfato amónico
PTGES	Prostaglandina E sintasa
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> / difluoruro de polivilideno
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> / reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RCT	<i>Randomized clinical trial</i> / ensayo clínico aleatorizado

<i>ROM</i>	<i>Range of motion</i> / rango de movimiento
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i> / especies reactivas de oxígeno
<i>RPL13A</i>	<i>Ribosomal protein L13A</i> / proteína ribosomal L13A
<i>RUNX2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i> / factor de transcripción 2 relacionado con Runt
SAuto	Semi-automático
SBF	Suero bovino fetal
SC	Semi-cerrado
<i>SDS</i>	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> / dodecil sulfato sódico
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrilamye gel electrophoresis</i> / electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
Sec. Ref.	Secuencia de referencia en NCBI
SER	Sociedad Española de Reumatología
SO	Safranina O
<i>SO-FG</i>	<i>SO-fast green</i> / verde rápido
<i>SOX9</i>	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i> / región Y de determinación del sexo-caja 9
SS	Suero salino
<i>SYSADOAs</i>	<i>Symptomatic slow action drugs for osteoarthritis</i> / fármacos sintomáticos de acción lenta para la artrosis
<i>TBP</i>	<i>TATA box binding protein</i> / proteína de unión a la caja TATA
<i>TBS</i>	<i>Tris-buffered saline</i> / tampón Tris salino
<i>TE</i>	<i>Tissue engineering</i> / ingeniería de tejidos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<i>TGF</i>	<i>Transforming growth factor</i> / factor de crecimiento transformante
<i>TIMP</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i> / inhibidor tisular de metaloproteasas
<i>TLR</i>	<i>Toll-like receptor</i> / receptor tipo Toll
TM	Tricrómico de Masson
<i>TNFα</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> / factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
<i>TXA₂</i>	Tromboxano A ₂
U	Unidades
<i>UPL</i>	<i>Universal Probe Library</i> / librería universal de sondas
<i>VAMP</i>	<i>Vesicle-associated membrane protein</i> / proteína de membrana asociada a vesículas
<i>VAS</i>	<i>Visual analog scale</i> / escala visual analógica
<i>VEGF</i>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> / factor de crecimiento vascular endotelial
<i>vWF</i>	<i>von Willebrand factor</i> / factor de von Willebrand
WB	<i>Western blot</i>
<i>WOMAC</i>	<i>Western Ontario & McMaster Universities Osteoarthritis Index</i> / índice de artrosis de las universidades de Western Ontario y McMaster
α -tub	Alfa tubulina
β -ACT	Beta-actina

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Anatomía de la articulación de la rodilla.	4
Fig. 2: MEC del cartílago articular hialino.	8
Fig. 3: Estructura del cartílago articular adulto.	10
Fig. 4: Mediadores biológicos implicados en la OA.	12
Fig. 5: Afectación de una articulación OA.	14
Fig. 6: Coste anual por paciente de la OA de rodilla y de cadera.	16
Fig. 7: Algoritmo terapéutico para la OA de rodilla.	17
Fig. 8: Megacariocito y plaquetas.	20
Fig. 9: Morfología plaquetaria en estado de reposo (a, c) y activación (b, d).	20
Fig. 10: Ejemplo de reparación de un defecto osteocondral con soportes de PRP.	31
Fig. 11: Esquema del proceso de preparación de los lisados de PRP.	46
Fig. 12: Contenido proteico total de L-PRP0-15.	75
Fig. 13: Cuantificación de la citoquina antiinflamatoria IL-1Ra en L-PRP0-15.	76
Fig. 14: Cuantificación de la citoquina antiinflamatoria IL-1Ra en los medios de cultivo suplementados con un 10% de L-PRP0-15 tras 48 h.	76
Fig. 15: Efecto de los L-PRPs en la proliferación y viabilidad de condrocitos humanos OA.	78
Fig. 16: Efecto de los L-PRPs en la proliferación y viabilidad de <i>BM-MSCs</i>	79
Fig. 17: Expresión génica en <i>pellets</i> de <i>BM-MSCs</i> cultivados durante 21 días en <i>DMEM</i> 0% suplementado con un 10% de L-PRP1,5-15, en comparación con MCondro (C+) o <i>DMEM</i> 10% (C-).	81
Fig. 18: Expresión génica en <i>pellets</i> de <i>BM-MSCs</i> cultivados durante 21 días en MCondro suplementado con un 10% de L-PRP0,75-3, en comparación con MCondro (C+) o <i>DMEM</i> 10% (C-).	83
Fig. 19: Tinciones histoquímicas de los <i>pellets</i> de <i>BM-MSCs</i> cultivados durante 21 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MCondro (C+) o MCondro más 10% de L-PRP0,75-3.	84
Fig. 20: Detalles de la tinción TM de los <i>pellets</i> de <i>BM-MSCs</i> cultivados durante 21 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MCondro (C+) o MCondro más 10% de L-PRP0,75-3.	84
Fig. 21: Expresión génica de los marcadores de osteogénesis <i>RUNX2</i> (A) y <i>ALP</i> (B) en <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MOsteo (C+) o <i>DMEM</i> 0% más 10% de L-PRP0,75-3.	85
Fig. 22: Tinción rojo alizarina de las <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MOsteo (C+) o <i>DMEM</i> 0% más 10% de L-PRP0,75-3.	86

Fig. 23: Expresión génica de los marcadores de osteogénesis <i>RUNX2</i> (A) y <i>ALP</i> (B) en <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MOsteo (C+) o MOsteo más 10% de L-PRP _{0,75-3}	87
Fig. 24: Tinción rojo alizarina de las <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MOsteo (C+) o MOsteo más 10% de L-PRP _{0,75-3}	87
Fig. 25: Expresión génica de los marcadores de adipogénesis <i>FABP4</i> (A) y <i>PPARγ</i> (B) en <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MAdipo (C+) o <i>DMEM</i> 0% más 10% de L-PRP _{0,75-3}	88
Fig. 26: Tinción <i>Oil-Red-O</i> de las <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MAdipo (C+) o <i>DMEM</i> 0% más 10% de L-PRP _{0,75-3}	89
Fig. 27: Expresión génica de los marcadores de adipogénesis <i>FABP4</i> (A) y <i>PPARγ</i> (B) en <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MAdipo (C+) o MAdipo más 10% de L-PRP _{0,75-3}	90
Fig. 28: Tinción <i>Oil-Red-O</i> de las <i>BM-MSCs</i> cultivadas durante 14 días en <i>DMEM</i> 10% (C-), MAdipo (C+) o MAdipo más 10% de L-PRP _{0,75-3}	90
Fig. 29: Apariencia de los G-PRPs con <i>BM-MSCs</i> a tiempo final de cultivo.	91
Fig. 30: Tinción H-E de un G-PRP con <i>BM-MSCs</i> desestabilizado tras 21 días de cultivo.	92
Fig. 31: Tinciones histoquímicas (A-C) e IHQs (D-E) de un G-PRP con <i>BM-MSCs</i> desestabilizado tras 21 días de cultivo.	93
Fig. 32: Actividad celular de las <i>BM-MSCs</i> en los G-PRPs a lo largo del tiempo de cultivo.	93
Fig. 33: Expresión génica de marcadores de condrogénesis en <i>BM-MSCs</i> incluidas en geles de Ag o de PRP con 0,75; 1,5 o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l y cultivadas en <i>DMEM</i> 10% o en MCondro durante 21 días.	95
Fig. 34: Tinciones H-E (A-H) y TM (I-P) de geles de Ag o de PRP con 0,75; 1,5 o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l con <i>BM-MSCs</i> embebidas y cultivados en <i>DMEM</i> 10% (A-D e I-L, respectivamente) o en MCondro (E-H y M-P, respectivamente) durante 21 días.	96
Fig. 35: Tinciones AA-PAS (A-H) y SO (I-P) en geles de Ag o PRP con 0,75; 1,5 o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l con <i>BM-MSCs</i> embebidas y cultivados en <i>DMEM</i> 10% (A-D e I-L, respectivamente) o MCondro (E-H y M-P, respectivamente) durante 21 días.	97

Fig. 36: Expresión génica del marcador IL-6 en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	99
Fig. 37: Expresión génica del marcador IL-8 en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	100
Fig. 38: Expresión génica del marcador <i>TNFα</i> en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	101
Fig. 39: Expresión génica del marcador IL-1 β en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	102
Fig. 40: Expresión génica del marcador IL-Ra en condrocitos <i>OAr</i> (A) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	102
Fig. 41: Expresión génica del marcador COX-2 en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	104
Fig. 42: Expresión génica del marcador PTGES en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	104
Fig. 43: Expresión génica del marcador <i>MMP-13</i> en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	105
Fig. 44: Expresión génica del marcador <i>NOS2</i> en condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	106
Fig. 45: Cuantificación de la citoquina IL-6 secretada por condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	107
Fig. 46: Cuantificación de la citoquina IL-8 secretada por condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	108

Fig. 47: Cuantificación de la citoquina <i>TNFα</i> secretada por condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	108
Fig. 48: Cuantificación de la <i>PGE₂</i> secretada por condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	109
Fig. 49: Cuantificación de la <i>MMP-13</i> secretada por condrocitos <i>OAr</i> (A) y <i>OAc</i> (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	111
Fig. 50: Cuantificación de la <i>NOS2</i> intracelular sintetizada por condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	112
Fig. 51: Cuantificación de la <i>NOS2</i> intracelular sintetizada por condrocitos <i>OAc</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	112
Fig. 52: Tinción ICQ de <i>NOS2</i> intracelular en condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	113
Fig. 53: Tinción ICQ de <i>NOS2</i> intracelular en condrocitos <i>OAc</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	114
Fig. 54: Cuantificación de la <i>COX-2</i> intracelular sintetizada por condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	115
Fig. 55: Cuantificación de la <i>COX-2</i> intracelular sintetizada por condrocitos <i>OAc</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	115
Fig. 56: Tinción ICQ de <i>COX-2</i> intracelular en condrocitos <i>OAr</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	116
Fig. 57: Tinción ICQ de <i>COX-2</i> intracelular en condrocitos <i>OAc</i> co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en <i>DMEM</i> 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular.	117

Fig. 58: Tinción ICQ de *MMP-13* intracelular en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. 118

Fig. 59: Tinción ICQ de *MMP-13* intracelular en condrocitos *OAc* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. 119

Fig. 60: Tinción SO en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. 120

Fig. 61: Tinción AT en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. 121

Fig. 62: Tinción IHQ para *MMP-3* en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular..... 122

Fig. 63: Tinción IHQ para *MMP-13* en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. 122

Fig. 64: Expresión génica y secreción/expresión proteica de los marcadores inflamatorios incluidos en el estudio. 139

Fig. 65: Esquema de los efectos antiinflamatorios y condroprotectores de IL-4, IL-10 e IL-13 en el cartílago articular en el proceso *OA*. 149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes de la MEC del cartílago articular.	7
Tabla 2: Contenido y funciones de los mediadores contenidos en los diferentes gránulos citoplasmáticos de las plaquetas.....	22
Tabla 3: Ejemplos de sistemas comerciales de preparación de PRP.....	25
Tabla 4: Sistemas propuestos para la clasificación de PRP.....	26
Tabla 5: Garantías mínimas para el uso del plasma autólogo y sus fracciones.	27
Tabla 6: Condiciones experimentales empleadas en los distintos estudios.	48
Tabla 7: Medios utilizados para los estudios de inducción condrogénica en formato <i>pellet</i>	49
Tabla 8: Medios utilizados para los estudios de promoción condrogénica en formato <i>pellet</i>	49
Tabla 9: Composición de los geles y condiciones de cultivo para la determinación de la concentración de plaquetas óptima.	51
Tabla 10: Medios utilizados para los estudios de inducción osteogénica en formato 2D.	51
Tabla 11: Medios utilizados para los estudios de promoción osteogénica en formato 2D.	52
Tabla 12: Medios utilizados para los estudios de inducción adipogénica en formato 2D.	52
Tabla 13: Medios utilizados para los estudios de promoción adipogénica en formato 2D.	52
Tabla 14: Listado de cebadores y sondas utilizados en los experimentos de <i>qRT-PCR</i> . ..	59
Tabla 15: Listado de cebadores y sondas empleados en las pruebas de estabilidad de expresión de genes de referencia.....	59
Tabla 16: Genes de referencia empleados en los distintos experimentos.	59
Tabla 17: Tampones y colorantes empleados en la técnica de <i>WB</i>	62
Tabla 18: Composición de los geles empleados en la separación electroforética <i>SDS-PAGE</i>	62
Tabla 19: Listado de anticuerpos y diluciones empleados en los análisis de expresión proteica mediante <i>WB</i>	64
Tabla 20: Listado de anticuerpos empleados en las tinciones <i>IHQ</i> e <i>ICQ</i>	65
Tabla 21: Caracterización basal y post-centrifugación de las muestras de sangre empleadas en el estudio.	75
Tabla 22: Contenido proteico de los PRPs preparados con distintas concentraciones absolutas de plaquetas.	75

Tabla 23: Ejemplos de ensayos clínicos que valoran la eficacia del PRP como tratamiento intraarticular.....137

RESÚMENES

Resumen

La artrosis (*osteoarthritis, OA*) es la patología articular más frecuente (afecta a un 15% de la población mundial), incapacitante y de etiología incierta. La inflamación crónica de bajo grado tiene un papel fundamental en su desarrollo y progresión y culmina en el desequilibrio entre el anabolismo y el catabolismo del cartílago articular, que tiene muy baja capacidad de regeneración.

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto autólogo con potencial terapéutico, pero su eficacia clínica en la *OA* no se ha demostrado de forma concluyente. Esto se debe, principalmente, a la falta de estandarización en los métodos de preparación, con la consecuente heterogeneidad de los derivados de PRP resultantes y, como resultado, a la disparidad en los resultados tanto preclínicos como clínicos.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue estandarizar lisados de PRP en base a concentraciones absolutas de plaquetas conocidas y, por lo tanto, con composición independiente de la concentración basal de plaquetas del donante. Su posible utilidad en tres indicaciones relevantes en la *OA* se testó en modelos *in vitro* con células mesenquimales estromales (*mesenchymal stromal cells, MSCs*) o condrocitos *OA* (de rodilla o cadera). En particular, las aplicaciones evaluadas fueron:

1. Terapia intraarticular con propiedades condrogénicas.
2. Soporte tridimensional bioactivo para la regeneración de lesiones del cartílago.
3. Terapia intraarticular antiinflamatoria.

Los resultados en nuestros modelos mostraron que los derivados de PRP en forma de lisado no solo no presentan capacidad condrogénica, sino que la inhiben y, en cambio, promueven la diferenciación al linaje osteogénico, con independencia de la dosis plaquetaria. En cambio, cuando las *MSCs* están embebidas en los geles de fibrina resultantes de la activación de los PRPs, el aumento de la concentración de plaquetas resulta beneficioso. Por otro lado, sí se demostraron efectos anticatabólicos, antioxidantes y antiinflamatorios al utilizar concentraciones de plaquetas muy inferiores a los valores fisiológicos. Por el contrario, el enriquecimiento plaquetario resultó proinflamatorio, especialmente en condrocitos *OA* de cadera. Estos resultados moleculares se corroboraron, además, en un modelo *ex vivo* de 21 días con cartílago *OA*.

En conclusión, en este estudio se propuso una metodología de estandarización novedosa para la preparación de derivados de PRP, basada en la concentración absoluta de plaquetas, demostrando que la estandarización de los productos de PRP es imprescindible para evaluar

sus efectos de manera objetiva. Este es, además, el primer estudio, que tengamos conocimiento, en el que se comparan los efectos de PRPs sobre condrocitos de rodilla y de cadera de manera separada.

Resumo

A artrose (*osteoarthritis, OA*) é a patoloxía articular máis frecuente (afecta a un 15% da poboación mundial), incapacitante e de etioloxía incerta. A inflamación crónica de baixo grao ten un papel fundamental no seu desenvolvemento e progresión e culmina no desequilibrio entre o anabolismo e o catabolismo da cartilaxe articular, que ten moi baixa capacidade de rexeneración.

O plasma rico en plaquetas (PRP) é un produto autólogo con potencial terapéutico, pero a súa eficacia clínica na *OA* non se ten demostrado de maneira concluínte. Isto débese, principalmente, á falta de estandarización nos métodos de preparación, coa consecuente heteroxeneidade dos derivados de PRP resultantes e, como resultado, á disparidade nos resultados tanto preclínicos coma clínicos.

O obxectivo desta Tese Doutoral foi estandarizar lisados de PRP en base a concentracións absolutas de plaquetas coñecidas e, polo tanto, con composición independente da concentración basal de plaquetas do donante. A súa posible utilidade en tres indicacións relevantes na *OA* testouse en modelos *in vitro* con células mesenquimais estromais (*mesenchymal stromal cells, MSCs*) ou condrocitos *OA* (de xeonllo ou de cadeira). En particular, as aplicacións avaliadas foron:

1. Terapia intraarticular con propiedades condroxénicas.
2. Soporte tridimensional bioactivo para a rexeneración de lesións da cartilaxe.
3. Terapia intraarticular antiinflamatoria.

Os resultados nos nosos modelos amosaron que os derivados de PRP en forma de lisado non só non presentan capacidade condroxénica, senón que a inhiben e, en cambio, promoven a diferenciación á linaxe osteoxénica, con independencia da dose plaquetaria. En cambio, cando as *MSCs* están embebidas nos xeles de fibrina resultantes da activación dos PRPs, o aumento da concentración de plaquetas resulta beneficioso. Por outro lado, sí se demostraron efectos anticatabólicos, antioxidantes e antiinflamatorios ao empregar concentracións de plaquetas moi inferiores aos valores fisiolóxicos. Pola contra, o enriquecemento plaquetario resultou proinflamatorio, especialmente en condrocitos *OA* de cadeira. Estes resultados moleculares corroboráronse, ademáis, nun modelo *ex vivo* de 21 días con cartilaxe *OA*.

En conclusión, neste estudio propúxose unha metodoloxía de estandarización novidosa para a preparación de derivados de PRP, baseada na concentración absoluta de plaquetas, demostrando que a estandarización dos produtos de PRP é imprescindible para avaliar os

seus efectos de maneira obxectiva. Este é, ademais, o primeiro estudo, que teñamos coñecemento, no que se comparan os efectos de PRPs sobre condrocitos de xeonllo e de cadeira de maneira separada.

Summary

Osteoarthritis (OA) is the most frequent joint pathology (it affects 15% of world population), disabling and of uncertain etiology. Low-grade chronic inflammation has a fundamental role in its development and progression and culminates in the imbalance between the anabolism and the catabolism of articular cartilage, which has a poor regeneration capacity.

Platelet rich plasma (PRP) is an autologous product with therapeutic potential, but its clinical efficacy for OA has not been conclusively proved. This is mainly due to the lack of standardization of preparation methods, the consequent heterogeneity in the resulting PRP derivatives and, as a result, the disparity in both preclinical and clinical results.

The objective of this Doctoral Thesis was to standardize PRP lysates based on defined absolute platelet concentrations and, thus, a composition independent from the basal platelet concentration of the donor. Its potential application in three relevant indications for OA was tested by means of *in vitro* models with mesenchymal stromal cells (MSCs) or OA chondrocytes (from knee or hip). The evaluated applications were:

1. Intraarticular therapy with chondrogenic properties.
2. Tridimensional scaffold for the regeneration of cartilage injuries.
3. Intraarticular anti-inflammatory therapy.

The results of our models showed that PRP derivatives in lysate form do not only lack chondrogenic capacity, but also inhibit it and, conversely, promote the differentiation to the osteogenic lineage, independently of platelet dose. Instead, when MSCs are embedded in the fibrin gels resulting from PRPs activation, the increase in platelet concentration is beneficial. On the other hand, anti-catabolic, anti-oxidant and anti-inflammatory effects were proved when using platelet concentrations much lower than physiological values. Conversely, platelet enrichment was pro-inflammatory, especially in hip OA chondrocytes. These molecular results were further corroborated in a 21-day *ex vivo* model with OA cartilage.

In conclusion, this study proposed an innovative standardization methodology for the preparation of PRP, based in absolute platelet concentration, and showed that the standardization of PRP products is essential to objectively evaluate its effects. As far as we know, this is also the first study that separately compares the effects of PRPs on knee and hip chondrocytes.

INTRODUCCIÓN

1 ESTRUCTURA DE LAS ARTICULACIONES. LA ARTICULACIÓN DIARTRODIAL

El aparato locomotor posibilita la interacción con el medio a través del movimiento y sostiene y protege los demás órganos del cuerpo. Está constituido por huesos, articulaciones, músculos, tendones y ligamentos. Las articulaciones son las uniones entre las superficies de contacto de dos o más huesos y pueden clasificarse en tres grandes grupos, en función de las características histológicas del tejido que separa los huesos y del rango de movimiento articular (de Toro, 2010):

- Articulaciones fibrosas (o sinartrosis): los huesos están unidos directamente por tejido conjuntivo fibroso y el grado de movilidad entre ellos es muy escaso o nulo. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, las líneas de sutura craneales.
- Articulaciones cartilagosas (o anfiartrosis): las superficies óseas están unidas por cartílago fibroso y ligamentos firmes y la movilidad es bastante limitada. A este tipo pertenecen, por ejemplo, las sínfisis de los discos intervertebrales.
- Articulaciones sinoviales (o diartrosis) (Fig. 1): son las más numerosas y se caracterizan por la presencia de una cavidad articular, la cual determina un rango de movimiento muy amplio. La cavidad articular está delimitada por una cápsula con membrana sinovial y las superficies óseas están recubiertas de cartílago hialino.

La articulación sinovial es una estructura especializada en cuya funcionalidad participan múltiples elementos de tejido conectivo, organizados de manera que permiten la estabilidad y movimiento del esqueleto. En toda articulación sinovial se pueden encontrar los siguientes elementos (Moore y Agur, 2003; Jiménez-Castellanos Ballesteros *et al.*, 2002):

- Cartílago articular hialino: reviste los componentes óseos en contacto, proporcionando una superficie lisa que reduce el coeficiente de fricción articular y absorbiendo una parte importante de las fuerzas de compresión soportadas por la articulación, disminuyendo así la carga soportada por el hueso subcondral.
- Hueso subcondral: es hueso compacto que subyace al cartílago articular, aislándolo de la vascularización e inervación del hueso esponjoso.
- Medios de coaptación: son piezas accesorias de fibrocartílago que facilitan la congruencia de las superficies articulares. Incluyen los meniscos articulares (dos anillos incompletos que se encuentran estabilizando las superficies articulares de la rodilla), el disco articular (tabique que divide la cavidad articular en dos cámaras para aumentar la estabilidad y absorber tensiones, como en la articulación

temporomandibular) y el rodete articular (anillo que aumenta la cavidad articular y la estabiliza, como en la articulación coxofemoral).

- **Medios de unión:** pueden ser activos (músculos periarticulares y sus tendones) o pasivos (ligamentos y elementos de tejido conjuntivo fibroso denso) y se encargan de mantener la estabilidad articular, uniendo entre sí los elementos óseos. Entre los segundos se incluye la cápsula articular y los ligamentos (capsulares, intracapsulares y extracapsulares, en función de su localización con respecto a la cavidad articular). La cápsula articular es el principal elemento de protección de la articulación sinovial. Está constituida por una membrana fibrosa que limita internamente con la membrana sinovial, cerrando la cavidad articular. La membrana fibrosa es un manguito resistente que constituye una prolongación del periostio.

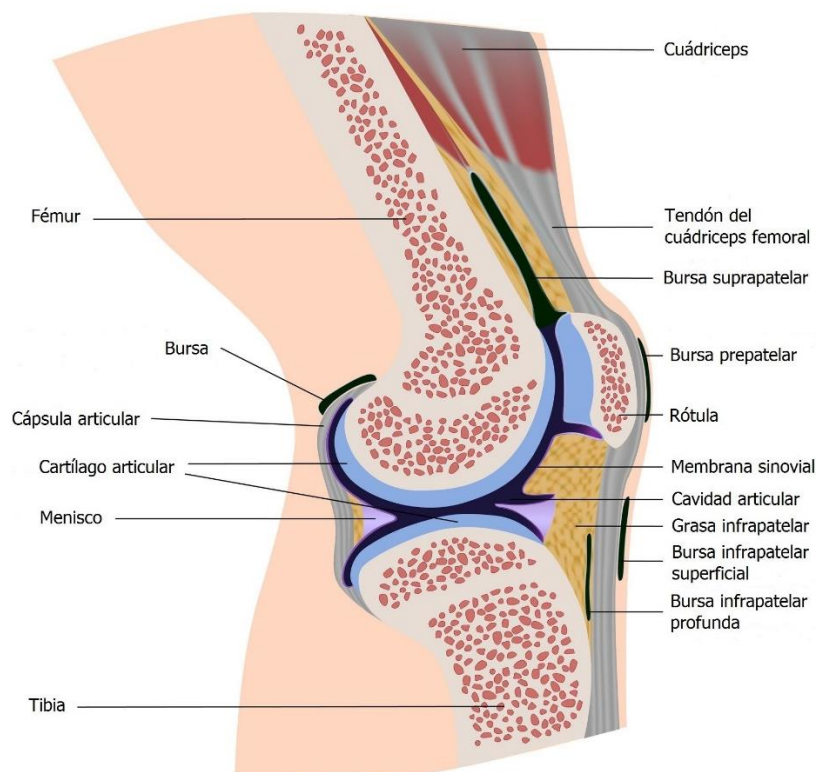


Fig. 1: Anatomía de la articulación de la rodilla. Imagen tomada y modificada de <http://kneeinjuryinfo.com/anatomy-of-the-knee>.

- **Membrana sinovial y líquido sinovial:** es una membrana fina y transparente que reviste el interior de la cápsula articular y la superficie ósea intracapsular que no está cubierta por cartílago articular. Se encarga de secretar y regular el volumen y contenido del líquido sinovial, que es esencialmente un filtrado de plasma, transparente y viscoso debido al alto contenido en ácido hialurónico (AH) y lubricina, que lubrica la articulación y nutre el cartílago (Cuervo-Aguilera, 2018;

Welsch, 2009). Puede considerarse como parte de la cápsula articular (de Toro, 2010) pero, por su funcionalidad diferenciada, aquí se comenta independientemente.

- Cavidad articular: es el pequeño espacio que queda comprendido entre las superficies articulares y la membrana sinovial, estando ocupado por el líquido sinovial.

1.1 El cartílago articular

El cartílago es un tipo de tejido conectivo especializado que cumple funciones de sostén. Está constituido por un único tipo celular, el condrocito, y una abundante matriz extracelular (MEC), producida y mantenida por estas células. Se pueden diferenciar tres grandes tipos de cartílago en el ser humano adulto (Welsch, 2009):

- Elástico: se encuentra en el pabellón auricular, la epiglotis y la laringe, entre otros sitios.
- Fibroso: aparece en el anillo fibroso de los discos intervertebrales, los meniscos y discos articulares, las zonas de inserción tendón-hueso y la articulación temporomandibular.
- Hialino: es el más abundante y se localiza en las epífisis óseas de las articulaciones sinoviales, por lo que también se conoce como cartílago articular. Otras ubicaciones incluyen las vías respiratorias, el esternón o ciertas partes del esqueleto nasal.

Existe un cuarto tipo de cartílago en el ser humano, el cartílago fetal, que se encuentra solo durante la etapa inicial de desarrollo y se caracteriza por su alto contenido en condrocitos, además de por presentar vasos sanguíneos.

En el ámbito de este trabajo, nos centraremos en el cartílago articular hialino, un tejido de apariencia lisa y blanquecina que cuenta con tan solo unos pocos milímetros de espesor (2-4 mm) y que se caracteriza por ser avascular, aneural y alinfático. Estas particularidades determinan que el aporte de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de desechos celulares, deban realizarse mediante difusión a través de la MEC desde el líquido sinovial y, en menor medida, desde el hueso subcondral (Couceiro-Follente y Silva-Ribera, 2010).

1.1.1 El condrocito

El condrocito es el único componente celular del cartílago articular adulto y se encarga de sintetizar y mantener las moléculas altamente especializadas de la MEC. Son células redondeadas o poligonales que se encuentran en lagunas de la MEC y, aunque inicialmente se creía que constituían unidades aisladas e independientes (Richter, 2009), recientemente se ha demostrado que los condrocitos próximos se comunican entre sí mediante proyecciones citoplasmáticas (Mayan *et al.*, 2015). Dada su relativa escasez con respecto a la celularidad de otros tejidos, se dice que el cartílago articular es hipocelular; la densidad celular en un cóndilo femoral es de $14,5 \pm 3,0 \cdot 10^3$ células/mm² entre los 20 y los 30 años, tendiendo a disminuir con la edad.

La naturaleza avascular del cartílago determina que los condrocitos se encuentren en un ambiente con bajas concentraciones de nutrientes y una baja tensión de oxígeno, que oscila entre el 10% en la zona superficial y el 1% en la zona profunda. Por ello, la glucosa es su principal fuente de energía y su metabolismo es pausado. A pesar de su relativa quiescencia, los condrocitos mantienen un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos de la MEC y son capaces de responder a estímulos bioquímicos, estructurales o físicos a través de la síntesis de enzimas, factores de crecimiento (*growth factors, GFs*), citoquinas y moléculas de la MEC. En esta capacidad de respuesta reside su gran importancia clínica, ya que el balance de estímulos que reciben a través de la MEC puede alterar la homeostasis articular de forma positiva o negativa. En general, la actividad mitótica reducida y la baja tasa de actividad sintética determinan que la capacidad de auto-regeneración del tejido sea muy limitada (Caramés, 2018; Goldring *et al.*, 2009).

1.1.2 La matriz extracelular. Propiedades y función del cartílago articular

Los condrocitos están rodeados inmediatamente por la matriz pericelular, que es rica en proteoglicanos y carece de fibrillas de colágeno (COL). Alrededor de ella se encuentra la matriz territorial, especialmente rica en COL de tipo VI y que forma una estructura tipo cápsula alrededor de los condrocitos, protegiéndolos del estrés mecánico. Más allá de la matriz territorial se encuentra el grueso de la MEC, que se denomina matriz interterritorial (Caramés, 2018). Los componentes de la MEC determinan sus propiedades y características biomecánicas y, por lo tanto, su funcionalidad. El componente principal es el COL de tipo II (COLII), aunque también se pueden encontrar COLs de tipo V, VI, IX y XI. El otro componente principal de la MEC son los proteoglicanos, concretamente el agregano

(ACAN), aunque también se pueden encontrar diversos tipos de proteoglicanos sulfatados, AH y otros componentes menos abundantes, pero no por ello menos importantes estructuralmente, como el biglicano, la decorina, la fibronectina o el perlecano, entre otros (Couceiro-Follente y Silva-Ribera, 2010) (ver Tabla 1).

Tabla 1: Componentes de la MEC del cartílago articular. Adaptada de Goldring *et al.* (2009).

MOLÉCULA	FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN
COLs	
Tipo II	Componente principal de las fibras de COL. Fuerza de tensión.
Tipo VI	Red microfibrilar pericelular que une AH, biglicano y decorina.
Tipo IX	Conexiones entre fibras. Fuerza de tensión.
Tipo X	Red hexagonal característica de la zona hipertrófica y calcificada.
Tipo XI	Nucleación de las fibrillas de COL.
Proteoglicanos	
ACAN	Unión a AH estabilizada por proteína de unión. Fuerza de compresión.
Perlecano	Distribución pericelular. Adhesión célula-MEC.
Biglicano	Distribución pericelular. Unión a COLVI y <i>TGF-β</i> .
Decorina	Distribución interterritorial. Control de forma/tamaño de fibrillas y unión a COLII.
Otras moléculas	
AH	Retención de ACAN en la MEC.
Proteína de unión	Estabilización de la asociación ACAN-AH.
COMP	Distribución interterritorial. Estabilización de la red de COL.
CILP	Restringida a zona de transición/profunda.
Fibronectina	Adhesión celular a COL y proteoglicanos.
Lubricina	Restringida a zona superficial. Lubricación de la articulación.
Proteínas de membrana	
Ancorina CII	Adhesión a COLII.
Integrinas	Unión célula-MEC a través de COLI, COLII, COLVI o fibronectina. Señalización intracelular.

COMP: cartilage oligomeric matrix protein (proteína oligomérica de matriz de cartílago); *CILP: cartilage intermediate layer protein* (proteína de capa intermedia de cartílago); *TGF: transforming growth factor* (factor de crecimiento transformante).

Los COLs son las macromoléculas más abundantes de la MEC (60-70% del peso seco) y, entre ellos, el COLII es el más abundante (90-95%). Están formados por una triple hélice constituida por tres cadenas polipeptídicas idénticas (en el caso de COLII, tres cadenas α -1(II)) y forman un entramado tridimensional diseñado para inmovilizar los agregados de proteoglicanos, descargar las fuerzas de tracción y proporcionar una alta resistencia a la tensión.

Los proteoglicanos, por su parte, son las segundas macromoléculas más abundantes de la MEC. Al igual que los COLs, son sintetizados por los condrocitos y están intercalados entre la malla de COL. El proteoglicano más abundante es el ACAN, cuya estructura consiste en un eje proteico central al que se unen numerosas cadenas laterales de glucosaminoglicanos

(GAGs) mediante enlaces covalentes. Los GAGs son polisacáridos con numerosas cargas negativas, las cuales les otorgan una naturaleza altamente hidrofílica y les permiten retener grandes cantidades de agua; los más comunes son el condroitín sulfato, el queratán sulfato y el dermatán sulfato. El AH enlaza cientos de cadenas de ACAN para formar grandes complejos macromoleculares que quedan retenidos en la red de COL, impidiendo que difundan hacia el espacio articular (Fig. 2).

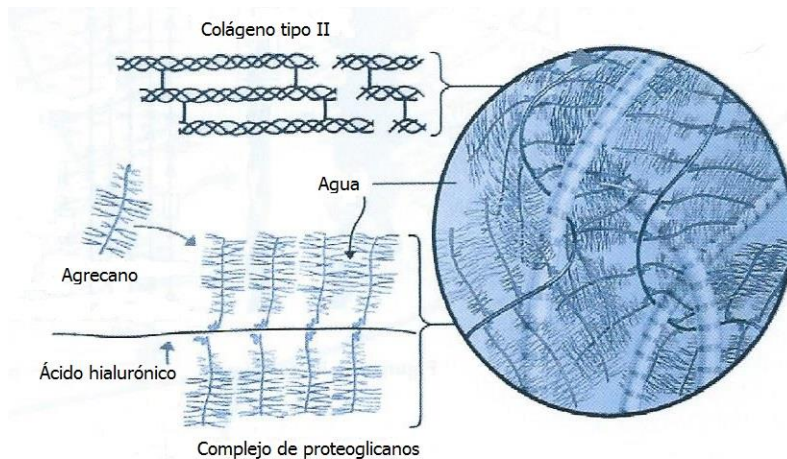


Fig. 2: MEC del cartílago articular hialino. Esquema de la estructura molecular del COLII, el ACAN y los complejos de proteoglicanos y su organización entrecruzada en la MEC. Imagen tomada y modificada de Benito-Ruiz (2010).

Los proteoglicanos tienen una relevancia estructural crítica, dado que son los responsables del elevado grado de hidratación del cartílago articular, cuyo contenido en agua puede alcanzar el 75-80%. Así, la presión osmótica generada por las numerosas cargas eléctricas negativas de los proteoglicanos induce la entrada y retención de una gran cantidad de agua. Las fuerzas de compresión generadas durante el movimiento expulsan el agua de los intersticios de la MEC, creando una resistencia debida a las fuerzas eléctricas que la retienen. Una vez cesa la fuerza deformante, el agua es atraída de nuevo al interior de la MEC, que recupera su forma original. Este mecanismo hidrodinámico, unido a la propia consistencia de la MEC, proporciona una gran resistencia a la compresión y constituye, además, el principal mecanismo de nutrición y oxigenación de los condrocitos (Perera *et al.*, 2012; Couceiro-Follente y Silva-Ribera, 2010).

1.1.3 Estructura histológica

En el cartílago articular maduro, los condrocitos constituyen un 2-5% del volumen total del tejido y se encargan de sintetizar y mantener una MEC abundante y compleja, que representa un 95-98% del peso seco total. Esta MEC está formada por un 70-80% de agua

y un 20-30% de lo que se denomina “peso seco”, en el que se incluye, a grandes rasgos, un 50% de COL, un 30-35% de proteoglicanos y un 15-20% de otras proteínas de matriz. No obstante, el tejido no es homogéneo en todo su espesor, de tal forma que se pueden diferenciar cuatro regiones, en las que la composición, organización y propiedades de mecánicas de la MEC, así como la morfología, tamaño y actividad metabólica celular varían con la profundidad (Caramés, 2018; Benito-Ruiz, 2010; Goldring *et al.*, 2009) (Fig. 3):

- Zona I, superficial o tangencial: está en contacto con el líquido sinovial y supone un 10-20% del espesor total del cartílago. Contiene numerosos condrocitos de pequeño tamaño, aplanados y dispuestos en paralelo a la superficie articular. Las fibrillas de COL son muy finas y se orientan también en paralelo a la superficie, mientras que el contenido en proteoglicanos es reducido. La parte más superficial de la zona I se denomina lámina *splendens* y es acelular, proporcionando una superficie de muy bajo coeficiente de fricción que protege al cartílago frente a la abrasión. Además, aporta resistencia a las fuerzas de cizallamiento, tracción y compresión derivadas de la locomoción.
- Zona II, media o de transición: representa un 40-60% del grosor total y contiene condrocitos más grandes y esféricos, menos numerosos y distribuidos aleatoriamente, bien en solitario o bien en pequeños grupos. El contenido en proteoglicanos aumenta y las fibras de COL son aquí más gruesas y se orientan de forma oblicua. Aporta resistencia a las fuerzas de compresión.
- Zona III, profunda o radial: constituye un 30% del volumen total del cartílago. Los condrocitos son más grandes, de morfología elíptica y organizados en columnas perpendiculares a la superficie articular. Es la región con mayor contenido en proteoglicanos y menor contenido en agua. También tiene las fibras de COL más grandes, distribuidas de la misma forma que los condrocitos. Aporta también resistencia a las fuerzas de compresión.
- Zona IV o calcificada: se ubica sobre el hueso subcondral y contiene cartílago mineralizado, en el que los condrocitos son más escasos, redondeados e hipertróficos. Esta capa está separada de la zona radial por el frente de calcificación o *tidemark* y carece de proteoglicanos. La función de este estrato consiste en anclar el cartílago articular al hueso subcondral, adonde transmite las fuerzas de compresión.

A grandes rasgos, la densidad celular descende progresivamente desde la zona superficial hacia la zona profunda, al igual que el contenido en agua, que pasa de ser de un 75-80% a un 65-70%. En la superficie hay también una mayor proporción de COL en relación al contenido en proteoglicanos, pero esta situación se invierte hacia la zona profunda. Al mismo tiempo, el tamaño celular va aumentando, siendo los condrocitos de las zonas de transición y profunda dos veces más grandes que los de la zona superficial (Goldring *et al.*, 2009).

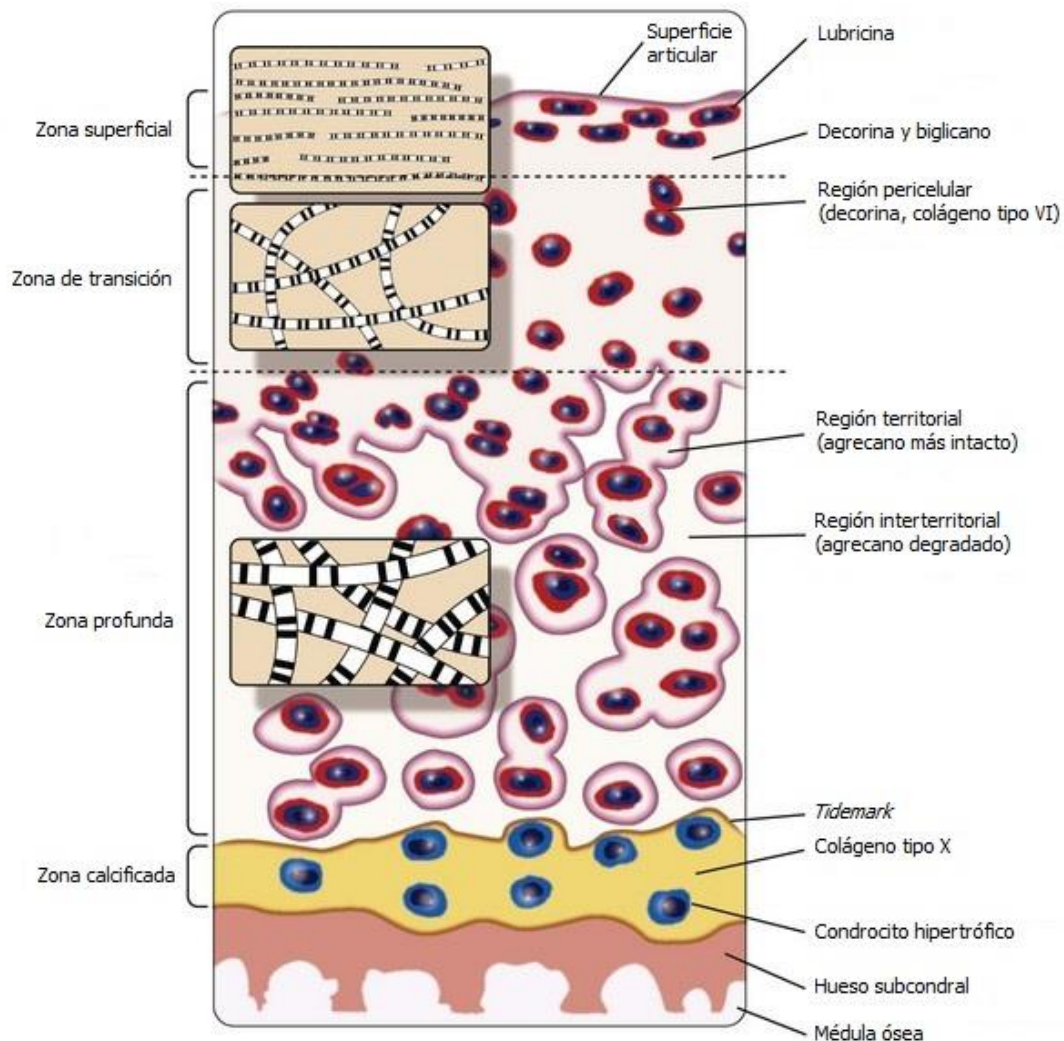


Fig. 3: Estructura del cartílago articular adulto. Esquema de la zonación del cartílago articular, destacando los cambios en el tamaño de los condrocitos, el diámetro de las fibrillas de COL y la composición local específica de la MEC. Imagen tomada y modificada de Goldring *et al.* (2009).

2 LA ARTROSIS

2.1 Definición

La Sociedad Internacional para la Investigación de la Artrosis (*Osteoarthritis Research Society International, OARSI*) define la artrosis (*osteoarthritis, OA*) como una patología caracterizada “por el estrés celular y la degradación de la MEC, la cual es iniciada por micro- y macro-lesiones que activan respuestas de reparación maladaptativas, incluyendo rutas proinflamatorias de inmunidad innata”. Se desconoce la etiología exacta de la *OA*, pero actualmente se acepta que se manifiesta en primer lugar como un trastorno molecular (metabolismo articular anormal) seguido de alteraciones anatómicas y/o fisiológicas (degradación del cartílago, remodelación del hueso, pérdida de la función articular normal) que culminan en la enfermedad sintomática (Kraus *et al.*, 2015).

2.2 Alteraciones moleculares: inflamación y *OA*

La *OA* es un desorden multifactorial en el que la inflamación crónica de bajo grado desempeña un papel crítico en el desarrollo y progresión de la degeneración articular, aunque todavía no está claro si desempeña un papel causal en la patogenia de la enfermedad o bien es un efecto de un proceso mecánico/degradativo primario.

Los mediadores biológicos involucrados en los procesos patológicos de la *OA* incluyen citoquinas, quimioquinas, *GFs*, adipoquinas, mediadores lipídicos como las prostaglandinas y leucotrienos, óxido nítrico (*nitric oxide, NO*) y proteinasas (Fig. 4). La acción de estos mediadores activa la destrucción de la MEC, inhibe la síntesis de sus componentes (y, por tanto, su reparación) y promueve la apoptosis. De hecho, está ampliamente reconocido que, en la *OA*, además de la degradación de la MEC, el cartílago experimenta una pérdida significativa del número de condrocitos debido a la muerte celular por apoptosis, siendo marcadamente hipocelular con respecto al cartílago articular sano. Así, la pérdida de MEC y la muerte de los condrocitos crea un ciclo degenerativo en el que la progresión de una agrava la otra, existiendo una correlación directa entre el grado de daño en el cartílago y la apoptosis de los condrocitos (Hwang y Kim, 2015).

La interleuquina (IL) 1 beta (IL-1 β) es la citoquina proinflamatoria más característica de la *OA*, hecho que se conoce desde los años 80 (Bunning *et al.*, 1986; Hamerman y Klagsbrun, 1985). Otro dato que se conoce desde hace tiempo es que este mediador actúa habitualmente junto con el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha, TNF α*), otra citoquina proinflamatoria cuya actividad en solitario es de 100 a 1.000 veces

inferior a la de IL-1 β (Attur *et al.*, 2002), pero que, en conjunto, desencadenan efectos sinérgicos para favorecer la destrucción de tejido e inhibir la reparación (Pelletier *et al.*, 1991; Shinmei *et al.*, 1990).

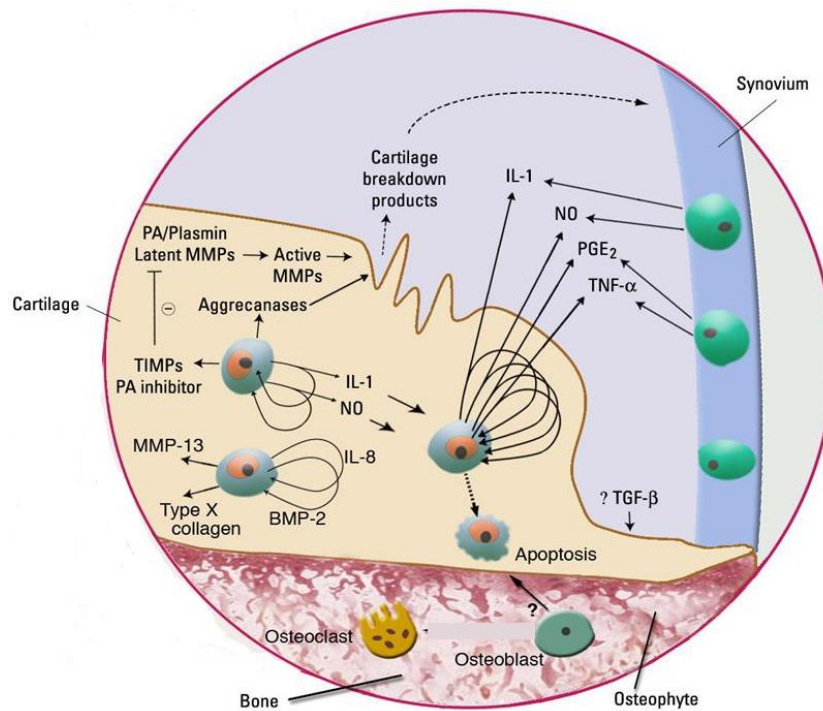


Fig. 4: Mediadores biológicos implicados en la OA. Esta patología se caracteriza por los niveles intraarticulares incrementados de mediadores como IL-1 β , TNF α , NO, PGE₂, MMP-13 e IL-6, entre otros. Imagen tomada y modificada de Abramson *et al.* (2006).

El efecto sinérgico IL-1 β /TNF α se debe a que, aun teniendo receptores de membrana independientes y bien diferenciados, ambos mediadores activan el mismo grupo de rutas de señalización intracelular para producir efectos similares, incrementando la inflamación y el catabolismo articular. En concreto, tanto IL-1 β como TNF α activan el factor nuclear κ B (*nuclear factor κ B*, NF- κ B), pieza clave de una de las principales rutas de transcripción de la OA. De esta manera se activa la expresión de la citoquina IL-6, la quimioquina IL-8 y, en un bucle de retroalimentación positiva, la propia síntesis de las citoquinas IL-1 β y TNF α . Además, ambos mediadores inhiben la síntesis de los componentes de matriz COLII y proteoglicanos, al tiempo que inducen la expresión de enzimas degradadoras. Concretamente, los condrocitos activados producen las metaloproteasas de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs) MMP-1, MMP-3, MMP-13 y ADAMTS (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, proteína desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina) de tipo 4 y 5, responsables de la degradación de COL (en el cartílago, MMP-13 es la más relevante, ya que digiere específicamente COLII) y

proteoglicanos (*ADAMTS-4* y *-5* se dirigen específicamente al ACAN) (Wojdasiewicz *et al.*, 2014; Blanco y Rego-Pérez, 2010; Monfort-Faure y Trujillo-Martín, 2010).

Por otra parte, otro de los efectos de $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$ es el aumento de los niveles de *NO* a través de la activación de la expresión de la isoforma inducible de su sintasa (*nitric oxide synthase 2*, *NOS2*). Ambos mediadores inducen también la síntesis de mediadores lipídicos (eicosanoides) y, en particular, de prostaglandina E_2 (PGE_2). Esto es así debido a la sobreexpresión de sus enzimas de síntesis, la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*) y la sintasa microsomal de prostaglandina E o, simplemente, prostaglandina E sintasa (*PTGES*) (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Se sabe que el *NO* contribuye a la destrucción del cartílago *OA* mediante la inducción de la expresión de *MMPs*, la inhibición de la síntesis de COL y proteoglicanos y la inducción de la apoptosis de los condrocitos en un mecanismo mediado por la producción de PGE_2 (Rahmati *et al.*, 2016; Scher *et al.*, 2007; Notoya *et al.*, 2000). En cuanto a PGE_2 , sus efectos sobre los condrocitos son complejos y parece ejercer una doble función en el cartílago. De esta forma, la PGE_2 puede producir efectos anabólicos (inhibición de la degradación y activación de la síntesis de las proteínas de la MEC) o catabólicos (promoción de la degradación de la MEC, inhibición de la proliferación celular y activación de la apoptosis). Esto puede deberse a la existencia de cuatro receptores diferentes para este mediador, a los que podría unirse con distintas afinidades para desencadenar respuestas divergentes en función del contexto articular (Otsuka *et al.*, 2009; Goldring y Berenbaum, 2004; Coleman *et al.*, 1994). Tanto PGE_2 como *NO* contribuyen significativamente al dolor sintomático de la *OA* (Lee *et al.*, 2013a).

El estrés oxidativo es otro de los procesos críticos en la progresión de la *OA*. Tanto $IL-1\beta$ como $TNF\alpha$ producen alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyendo las reservas energéticas celulares en forma de adenosín trifosfato (*ATP*, *adenosine triphosphate*). La $IL-1\beta$, además, estimula la formación de radicales libres de oxígeno, o especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, *ROS*), que dañan directamente el cartílago articular. El *NO* es uno de los principales mediadores de estrés oxidativo, siendo capaz de reaccionar con *ROS* para formar peroxinitrito (un compuesto tóxico para las células y tejidos) y aumentando la susceptibilidad de los condrocitos a agentes oxidantes (Wojdasiewicz *et al.*, 2014; Whiteman *et al.*, 2004).

2.3 Alteraciones fisiológicas y anatómicas en la OA

Como ya se ha comentado anteriormente, en la fisiopatología de la *OA* están involucrados todos los tejidos que conforman la articulación, resultando especialmente importantes el

cartílago articular, la membrana sinovial y el hueso subcondral, dada su elevada actividad proinflamatoria y procatabólica (Robinson *et al.*, 2016). La teoría más extendida sitúa el inicio de la enfermedad en el cartílago, donde el desequilibrio entre el anabolismo y el catabolismo de los condrocitos compromete la integridad de la MEC debido a la combinación de estímulos mecánicos y mediadores biológicos fuera de los rangos fisiológicos (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Las articulaciones más comúnmente afectadas por la OA son las de las manos, columna vertebral, rodillas, caderas y pies. Tradicionalmente, la patología se caracteriza por el deterioro y pérdida del cartílago articular, pero la concepción de la enfermedad ha cambiado y, actualmente, se reconoce que afecta a todo el conjunto de la articulación: provoca la fibrilación y degradación del cartílago articular, el engrosamiento del hueso subcondral y la formación de quistes, microfracturas y osteofitos, la inflamación de la membrana sinovial, la degeneración de ligamentos y meniscos, la debilitación de los músculos y la hipertrofia de la cápsula articular (Fig. 5). No consiste simplemente en una degeneración pasiva, sino que constituye un proceso activo debido al desequilibrio entre los procesos de degradación y reparación tisular (catabolismo y anabolismo) (Fernández-Gutiérrez, 2018; Robinson *et al.*, 2016; Arden *et al.*, 2014).

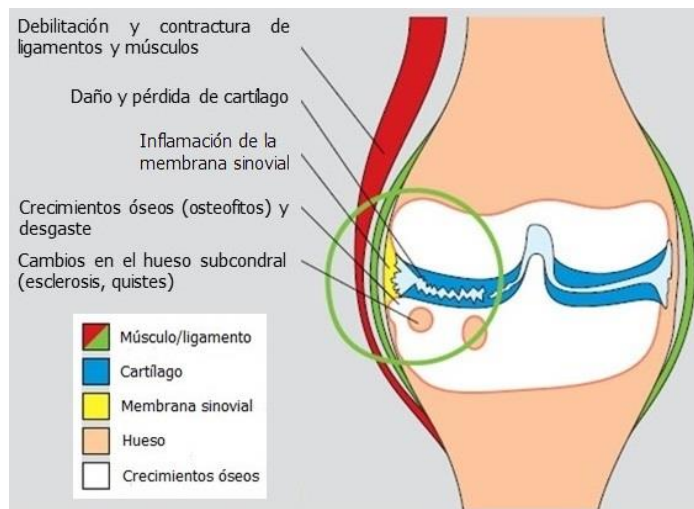


Fig. 5: Afectación de una articulación OA. Representación esquemática de una rodilla OA y los principales cambios experimentados por los distintos tejidos que la integran. Imagen tomada y modificada de Arden *et al.* (2014).

La gran heterogeneidad en el grado de afectación de los distintos componentes articulares y en los cuadros clínicos de los pacientes, e incluso entre las distintas articulaciones de un mismo paciente, complica la definición de la enfermedad (Blanco y Tornero Molina, 2016). De hecho, recientemente se ha propuesto una división fenotípica de la OA en base a su

origen, grupo de edad afectado y localización principal. De esta forma se distinguirían los fenotipos post-traumático, metabólico, de envejecimiento, genético y doloroso. No obstante, todavía no se ha alcanzado un consenso en cuanto a la caracterización de cada subgrupo (Arden *et al.*, 2014).

2.4 Epidemiología y coste socioeconómico

La OA es la patología articular más frecuente, con una prevalencia de alrededor de un 15% a nivel mundial. La sintomatología incluye dolor, rigidez, crepitación y, en estadios avanzados, deformidad, inestabilidad y atrofia muscular. Por ello, la OA es ya una de las diez enfermedades más incapacitantes en los países desarrollados. Los factores de riesgo para el desarrollo y progresión de esta patología incluyen la edad (más del 70% de los mayores de 50 años tienen signos radiológicos en alguna localización), el género (la prevalencia es mayor entre las mujeres, sobre todo tras la menopausia), la obesidad (especialmente correlacionada con el desarrollo de OA de rodilla), el grupo étnico, la predisposición genética, factores ocupacionales como el daño o sobreuso articular y la presencia de traumatismos y daños previos en el cartílago (Fernández-Gutiérrez, 2018; Arden *et al.*, 2014). Entre ellos, la edad es el factor de mayor relevancia. Considerando que la población mundial mayor de 60 años aumentará un 10% en los próximos treinta años, y si bien el envejecimiento no conlleva ineludiblemente el desarrollo de OA, se ha predicho que el alargamiento de la esperanza de vida y el incremento de los niveles de obesidad convertirán a esta patología en la cuarta causa de discapacidad a nivel global en el año 2020 (Organización Mundial de la Salud, 2015; Kingsbury *et al.*, 2014).

Además de su profundo impacto sobre la calidad de vida de las personas afectadas, la OA está también asociada a un considerable coste socioeconómico. Este coste es el resultado acumulativo del absentismo laboral, los gastos médicos y los servicios sociales y comunitarios. Aunque los datos disponibles sobre el impacto en la productividad laboral son limitados, la Sociedad Española de Reumatología (SER) calcula un coste anual superior a 4.700 millones de euros, equivalente al 0,5% del PIB, con un coste medio por paciente de unos 1.500 euros (Fig. 6) (Loza *et al.*, 2009).

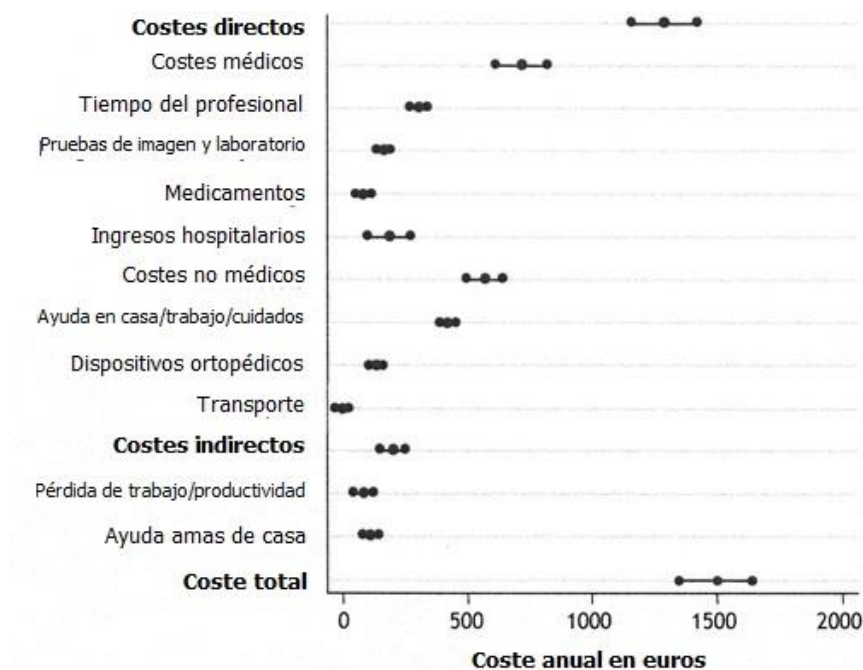


Fig. 6: Coste anual por paciente de la OA de rodilla y de cadera. Imagen tomada y modificada de Loza et al. (2009).

2.5 Opciones terapéuticas

Actualmente, ninguno de los tratamientos disponibles para la OA cura la enfermedad. Todos ellos son de tipo paliativo, dirigidos a aliviar el dolor y la inflamación, pero no existe ningún tratamiento eficaz que recupere las propiedades del cartílago articular o que, al menos, detenga la progresión de la enfermedad. Cada paciente recibe un tratamiento individualizado y ajustado a sus características con el objetivo de controlar el dolor, mantener la funcionalidad de la/s articulación/es y reducir al máximo la progresión de la enfermedad. La presencia o ausencia de comorbilidades ha permitido definir algoritmos de tratamiento como el que se presenta en la Fig. 7.

Como se puede ver, la primera aproximación es un tratamiento no farmacológico, en el que se intenta evitar la progresión de la enfermedad mediante la reducción de los factores de riesgo. Generalmente, se recomienda hacer ejercicios moderados de fortalecimiento, usar cuñas en el calzado y apoyos durante la locomoción, perder peso y aplicar frío o calor para aliviar el dolor. Cuando esta aproximación no es suficiente, se aplican tratamientos farmacológicos adecuados a la presencia o ausencia de comorbilidades de tipo cardiovascular o gastrointestinal. Entre estos medicamentos se incluyen compuestos sintomáticos de acción rápida, como los analgésicos (paracetamol, opiáceos débiles y opiáceos fuertes) y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs, asociados a importantes

efectos secundarios gastrointestinales, cardiovasculares y renales), y de acción lenta (conocidos como *SYSADOAs*, *symptomatic slow action drugs for osteoarthritis*). Estos últimos pueden administrarse por vía oral (condroitín sulfato, diacereína, glucosamina) o por vía intraarticular (AH). En casos de sinovitis aguda y en estadios tardíos de la enfermedad se recomienda aplicar inyecciones intraarticulares de glucocorticoides (Blanco, 2018).

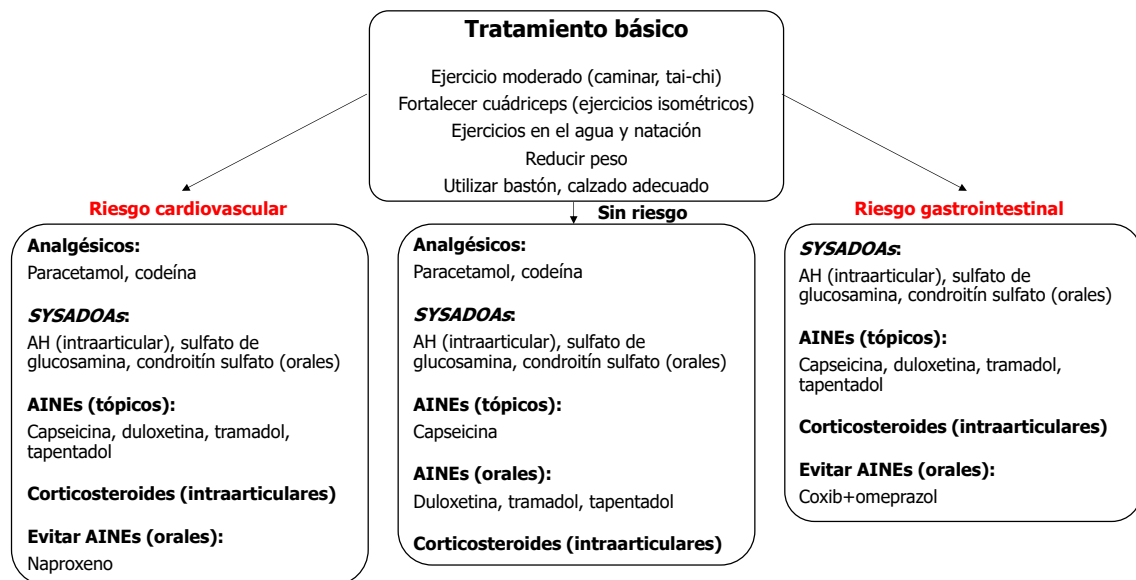


Fig. 7: Algoritmo terapéutico para la OA de rodilla. Gráfico tomado y modificado de Blanco (2018).

En los últimos años se han probado agentes de acción central y diversas terapias biológicas pero, aunque su eficacia es buena, se han detectado mayores efectos adversos de lo esperado (Hochberg, 2012). Así mismo, existen numerosas terapias en fase de investigación que todavía necesitan más evidencias para poder implantarse en la práctica clínica. Este es el caso, por ejemplo, de las terapias con células mesenquimales estromales (*mesenchymal stromal cells, MSCs*), la ingeniería de tejidos (*tissue engineering, TE*) o el plasma rico en plaquetas (PRP). En general, cuando la *OA* alcanza un estadio avanzado y resulta muy sintomática e incapacitante, se recurre a la cirugía de reemplazo protésico, o artroplastia, para atenuar el dolor y recuperar la funcionalidad articular.

Las *MSCs* son células no especializadas que se auto-renuevan mediante división celular y que, bajo ciertas condiciones, pueden diferenciarse en tipos celulares especializados. Presentan dos grandes ventajas frente a las células madre embrionarias y fetales: no plantean problemas éticos y, además, al ser obtenidas de forma autóloga, se evita la inducción de una posible respuesta inmune (Mobasheri *et al.*, 2009). Las *MSCs* fueron aisladas inicialmente a partir de aspirados de médula ósea (*bone marrow, BM*), pero desde

entonces han podido obtenerse a partir de numerosos tejidos, incluyendo el periostio, el músculo, la membrana sinovial y el tejido adiposo, entre otros (Roelofs *et al.*, 2013). Las distintas poblaciones de *MSCs* no son homogéneas, sino que presentan una considerable variabilidad fenotípica. Por este motivo, la *International Society for Cellular Therapy* ha definido una serie de criterios que permiten identificarlas (Dominici *et al.*, 2006):

- Capacidad de adherencia al plástico de los recipientes de cultivo.
- Expresión (y ausencia de expresión) de ciertos marcadores de superficie. En concreto, más de un 95% de la población celular debe expresar CD73, CD90 y CD105, mientras que más de un 98% no debe expresar CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a, ni HLA-DR.
- Capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

La *TE*, por su parte, es una disciplina emergente de la medicina regenerativa que constituye una alternativa prometedora para la reparación de lesiones articulares. Plantea la reconstrucción de los tejidos para recuperar su estructura y funcionalidad, empleando para ello biomateriales constituidos por células, soportes tridimensionales y *GFs* (Zhao *et al.*, 2013; Hollander *et al.*, 2006). En el caso del cartílago, las células empleadas pueden ser condrocitos o *MSCs*; en la actualidad se tiende a usar más estas últimas, ya que presentan una serie de ventajas frente a los condrocitos, como puede ser su mayor disponibilidad y su relativa facilidad de obtención y cultivo (Vinatier *et al.*, 2009). En cuanto a los soportes, se buscan materiales biocompatibles, estructural y mecánicamente estables, que puedan encapsular las células a trasplantar y que permitan la integración con el tejido receptor (Mobasheri *et al.*, 2009). Estos materiales pueden ser polímeros artificiales (ácido poliglicólico, ácido poliláctico) o polímeros naturales (alginato, gelatina, fibrina) (Anitua *et al.*, 2010). Los polímeros sintéticos presentan dos grandes limitaciones: las células tienden a sufrir apoptosis (debido a la carencia de interacciones con la MEC) y la tasa de degradación es constante, por lo que no puede adaptarse a las necesidades celulares (Brower *et al.*, 2011). Así, se prefieren los soportes naturales para favorecer la viabilidad celular e intentar asegurar el éxito de la terapia de regeneración. Por último, los *GFs* pueden administrarse durante el período de cultivo *in vitro* y/o ser incorporados en la estructura del biomaterial. Esta segunda opción es la más apropiada, ya que posibilita la liberación controlada de *GFs* en el espacio y tiempo, allí donde las células los necesitan y durante un período más prolongado para mejorar la diferenciación celular (Anitua *et al.*, 2008).

3 EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS

3.1 La plaqueta

Las plaquetas, o trombocitos, son pequeños fragmentos citoplasmáticos, irregulares y anucleados que proceden de la fragmentación de los megacariocitos de la *BM* (Fig. 8), originándose en un proceso independiente de la división nuclear conocido como endomitosis. Aun siendo anucleadas, las plaquetas son células metabólicamente activas y contienen numerosos orgánulos funcionales como retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias. Con un diámetro de 2 a 3 μm y una vida media de 7 a 12 días, sus funciones más conocidas son la coagulación y la hemostasia para evitar la pérdida de sangre, pero no son las únicas. La fragmentación de los megacariocitos es estimulada fundamentalmente por la trombopoyetina y ocurre de manera continuada, asegurando una producción de unas 10^{11} plaquetas/día para poder mantener la población plaquetaria en sangre (Yun *et al.*, 2016).

La mayoría de las funciones plaquetarias están ligadas directamente a su activación, un proceso que ocurre de manera natural al producirse una lesión en la pared de un vaso sanguíneo. En condiciones normales, las plaquetas circulantes se encuentran en estado de reposo y tienen un aspecto discoidal. Cuando se produce un daño en el endotelio vascular, el COL y otras proteínas de matriz quedan expuestos en la lesión y provocan la activación de las plaquetas, las cuales adquieren una morfología esférica y emiten numerosas proyecciones citoplasmáticas (Fig. 9). La activación supone el inicio de la agregación plaquetaria y la liberación del contenido de sus gránulos citoplasmáticos, lo que a su vez produce el reclutamiento de más plaquetas y la activación de la cascada de coagulación para bloquear la pérdida de sangre mediante la formación de un coágulo o trombo (Dovlatova, 2015).

El citoplasma de las plaquetas presenta cuatro tipos de gránulos: gránulos α , gránulos densos, lisosomas y gránulos T, estos últimos descritos recientemente (Thon *et al.*, 2012).

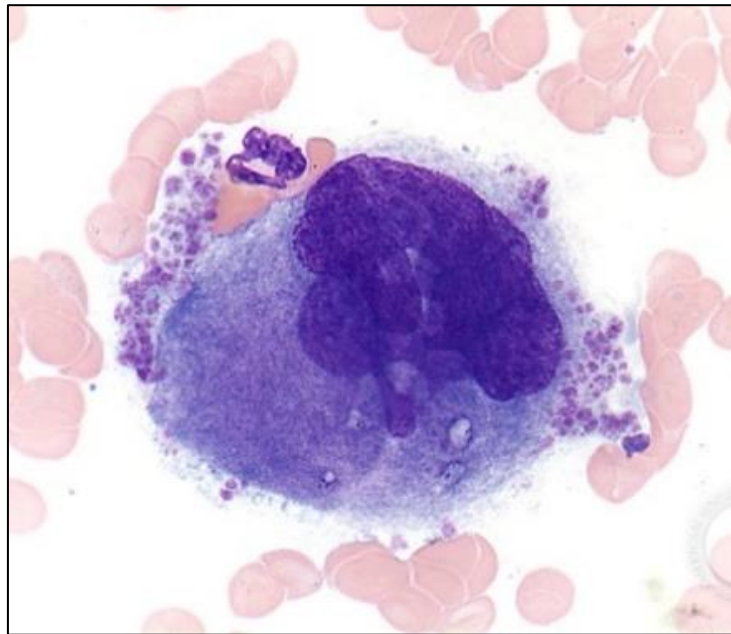


Fig. 8: Megacariocito y plaquetas. Las plaquetas en formación se pueden ver como pequeños fragmentos citoplasmáticos de apariencia granular en la periferia del megacariocito. Imagen tomada de <https://imagebank.hematology.org/image/1186/platelet-forming-megakaryocyte--1?type=upload>

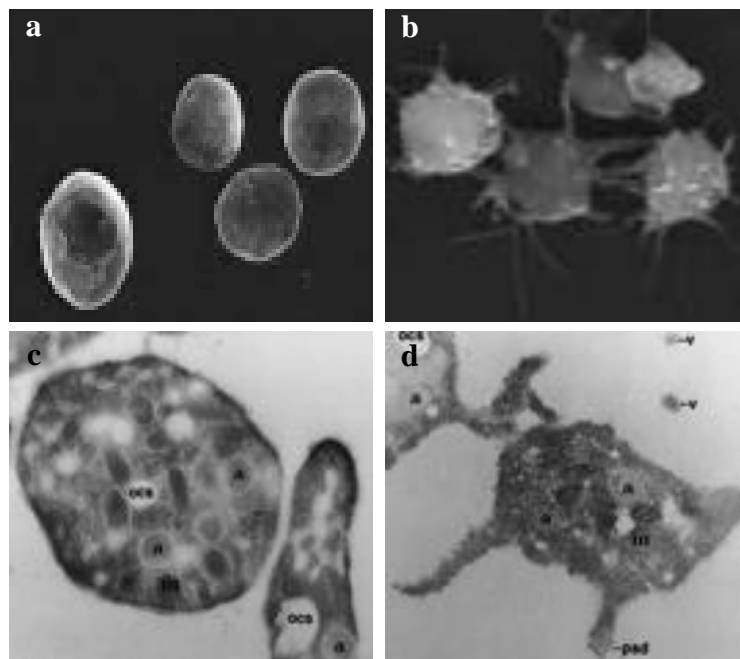


Fig. 9: Morfología plaquetaria en estado de reposo (a, c) y activación (b, d). Imágenes de microscopía electrónica tomadas de Bettach *et al.* (2003) y Hughes *et al.* (2000).

En conjunto, las plaquetas contienen más de 800 proteínas y moléculas diferentes, incluyendo citoquinas, quimioquinas, proteínas de membrana, metabolitos, moléculas

mensajeras, *GFs* y numerosas proteínas solubles (Di Michele *et al.*, 2012). Cada tipo de gránulo tiene un contenido característico (ver Tabla 2): los gránulos α son los más abundantes y contienen una gran cantidad de proteínas, tales como factores hemostáticos (fibrinógeno, factor de von Willebrand (*von Willebrand factor*, *vWF*)), factores angiogénicos (angiogenina, factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, *VEGF*)) y antiangiogénicos (angiostatina, factor plaquetario 4), *GFs* como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet derived growth factor*, *PDGF*) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (*basic fibroblast growth factor*, *bFGF*), moléculas de adhesión e interacción célula-célula y célula-MEC (P-selectina, integrinas), proteasas (*MMP-2*, *MMP-9*) y citoquinas (*TNF α* , *TNF β* , IL-1 β); los gránulos densos contienen pequeñas moléculas hemostáticas no proteicas (catecolaminas como la serotonina y la histamina, adenosín difosfato (*ADP*, *adenosine diphosphate*) y *ATP*, Ca^{2+} , Mg^{2+}) y los lisosomas presentan hidrolasas, glicosidasas y otras proteínas con actividad bactericida. El contenido granular se sintetiza ya en el megacariocito y es, precisamente, este estado preformado lo que permite una rápida liberación de mediadores tras la activación plaquetaria. No obstante, las plaquetas también pueden sintetizar proteínas con su propia maquinaria de traducción a partir del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que portan, derivado también de los megacariocitos. Estudios recientes indican que esta actividad sintética estaría regulada por micro-ARNs silenciadores, cuya acción se modula con la activación plaquetaria (Yun *et al.*, 2016; Cimmino y Golino, 2013). Así, además de su ya citado papel en la coagulación y la hemostasia, los trombocitos están también implicados en los procesos de vasoconstricción, inflamación, respuesta inmunológica, angiogénesis y regeneración tisular. Su participación en numerosos mecanismos de señalización fisiológica determina, consecuentemente, su relación con múltiples patologías (Golebiewska y Poole, 2015; Idzko *et al.*, 2015; Speth *et al.*, 2015; Weyrich *et al.*, 2014).

Tabla 2: Contenido y funciones de los mediadores contenidos en los diferentes gránulos citoplasmáticos de las plaquetas.

Gránulo	Contenido	Funciones
α	Proteínas adhesivas	Fibrinógeno, <i>vWF</i> , trombospondina, fibronectina, vitronectina, laminina 8
	Proteínas plasmáticas	Albúmina, IgG
	<i>GFs</i>	<i>VEGF</i> , <i>PDGF</i> , <i>bFGF</i> , <i>TGF-β1</i> , <i>EGF</i> , <i>HGF</i> , <i>IGF</i> , angiopoyetina, <i>MMP-1</i> , <i>MMP-9</i> , angiostatina, <i>TIMP-1</i> , <i>BMP-2</i> , <i>BMP-4</i>
	Quimioquinas proinflamatorias	<i>GRO-α</i> , <i>CXCL4</i> , <i>CXCL5</i> , IL-8
	Factores de coagulación	Factor V/Va, factor XI, factor XIII, protrombina, multimerina
	Factores fibrinolíticos	Plasmina, plasminógeno
	Factores antifibrinolíticos	α_2 -macroglobulina, α_2 -antiplasmina
	Inhibidores de coagulación	Antitrombina, inhibidor C1, proteína S
	Proteínas inmunitarias	Precusores de los complementos C3 y C4, inhibidor de C1, factor H, trombocidinas
	Proteínas de membrana	Glicoproteína IIb/IIIa, GPVI, receptores Fc, <i>PECAM</i> , GPIb-IX-V, P-selectina
δ	<i>ADP</i> , <i>ATP</i> , serotonina, histamina, Ca^{2+} , <i>TXA_2</i> , pirofosfato, polifosfato, 5-hidroxitriptamina, P-selectina, integrina $\alpha II-\beta 3$	Hemostasia primaria
Lisosoma	Catepsinas, hexosaminidasa, β -galactosidasa, arilsulfatasa, β -glucuronidasa, fosfatasa ácida	Digestión celular, fibrinólisis, degradación de matriz, remodelación de vasculatura
T	<i>TLR9</i> , PDI, <i>VAMP-8</i>	Defensa inmunitaria

IgG: inmunoglobulina G, *EGF*: *endothelial growth factor* (factor de crecimiento endotelial), *HGF*: *hepatocyte growth factor* (factor de crecimiento de hepatocitos), *IGF*: *insulin-like growth factor* (factor de crecimiento insulínico), *TIMP*: *tissue inhibitor of metalloproteinases* (inhibidor tisular de metaloproteasas), *BMP*: *bone morphogenetic protein* (proteína morfogénica ósea), *GROα*: *growth-regulated oncogene α* (oncogén α regulado por el crecimiento), *CXCL*: *chemokine (C-X-C motif) ligand* (ligando de quimioquina con motivo C-X-C), GP: glucoproteína, *PECAM*: *platelet and endothelial cell adhesion molecule* (molécula de adhesión a plaquetas y células endoteliales), *TXA₂*: tromboxano A₂, *TLR*: *Toll-like receptor* (receptor tipo Toll), PDI: proteína disulfuro isomerasa, *VAMP*: *vesicle-associated membrane protein* (proteína de membrana asociada a vesículas).

La función plaquetaria está asociada a la iniciación de las cascadas de coagulación sanguínea y consiste en una serie compleja de procesos bioquímicos y celulares que se pueden dividir en cuatro etapas: adhesión, activación, secreción y agregación. Las lesiones en la pared del endotelio vascular exponen sus proteínas de matriz, las cuales unen el *vWF* circulante y éste, a su vez, se une a las plaquetas. Al mismo tiempo, las plaquetas reconocen y se unen directamente a las proteínas de matriz. Ambos procesos, directo e indirecto,

constituyen la fase inicial de adhesión plaquetaria y activan rutas de señalización intracelular que llevan a reforzar la adhesión y activar las plaquetas. En estas rutas de señalización tiene un papel especialmente destacable el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y provocan el cambio morfológico y la degranulación característicos de la activación plaquetaria. Comienza así la etapa de secreción, en la cual las plaquetas liberan el contenido de sus gránulos citoplasmáticos e inician la síntesis de *ROS* y TXA_2 . Una vez estabilizado el coágulo, se inicia la etapa de agregación, en la que las plaquetas adheridas y activadas reclutan y activan más plaquetas circulantes. La unión al fibrinógeno y la conversión de protrombina en trombina activa permiten consolidar finalmente el coágulo hemostático. Posteriormente, las propias plaquetas serán las encargadas de alterar la estructura de la matriz de fibrina así formada para coordinar la contracción y retracción del coágulo (Swieringa *et al.*, 2018; Vilahur *et al.*, 2018; Yun *et al.*, 2016; Cimmino y Golino, 2013).

3.2 Aplicación clínica de las plaquetas: el plasma rico en plaquetas

El uso terapéutico de los concentrados de plaquetas fue descrito originalmente por Whitman *et al.* en 1997. No obstante, los pegamentos de fibrina derivados de la sangre ya se empleaban treinta años antes para sellar heridas y estimular su curación (Matras, 1970). La inclusión de las plaquetas en los preparados terapéuticos permitió abandonar los tratamientos con *GFs* recombinantes, que tienen un elevado coste y un tiempo de almacenamiento muy reducido. En cambio, los concentrados de plaquetas se obtienen mediante procedimientos sencillos y de bajo coste, lo que permitió aplicar tratamientos con concentraciones altas de *GFs* para la regeneración de tejidos. En 1998, los concentrados de plaquetas empezaron a ser conocidos como plasma rico en plaquetas, PRP, originalmente definido como un volumen de plasma autólogo con un contenido en plaquetas superior al de la sangre periférica (Marx *et al.*, 1998); en función del individuo y del momento, este recuento oscila entre 150.000 y 400.000 plaquetas/ μl para una persona sana. Desde entonces, se han desarrollado múltiples sistemas para su preparación.

3.3 Metodologías de preparación

Las metodologías de obtención del PRP son muchas y muy variables. Resumidamente, pueden ser manuales o automáticas, en sistemas abiertos o cerrados y basarse en una centrifugación simple, una centrifugación doble o una filtración selectiva de la sangre. Además, la activación de las plaquetas puede realizarse de forma mecánica (mediante ciclos

de congelación-descongelación) o química. En este último caso, se puede emplear trombina para provocar una activación rápida y una liberación masiva de *GFs*, o bien se puede recurrir a compuestos de calcio para conseguir una activación lenta y una liberación progresiva a lo largo del tiempo. Otra opción es aplicar directamente el PRP obtenido, sin activar, para que sean los propios factores tisulares los que inicien el proceso (Fioravanti *et al.*, 2016; Dhurat y Sukesh, 2014).

Si consideramos todas estas posibilidades, entenderemos que la composición del PRP es altamente variable. Los eritrocitos suelen eliminarse, pero no siempre es así. El contenido en leucocitos puede ser nulo, equivalente a la concentración en la sangre periférica o varias veces superior a la misma. En cuanto a las plaquetas, podemos encontrar desde preparados sin plaquetas hasta concentrados con recuentos plaquetarios cinco, ocho o más veces superiores a los fisiológicos. En consecuencia, los *GFs* plasmáticos y plaquetarios pueden estar presentes en concentraciones muy dispares. Todas estas variables influyen en la respuesta biológica del tejido y, por lo tanto, en la eficacia del tratamiento (Anitua *et al.*, 2012; Dohan-Ehrenfest *et al.*, 2009). De ahí que, en numerosos ámbitos, no exista un consenso acerca de la eficacia o ineficacia del PRP para el tratamiento de determinadas condiciones patológicas (Zhang *et al.*, 2016a; Roselló-Camps *et al.*, 2015; Andía *et al.*, 2014).

Hoy en día, además de los innumerables métodos “caseros” de preparación, en el mercado se pueden encontrar más de una veintena de sistemas comerciales para obtener PRP con unas características “definidas”, que consisten en factores de enriquecimiento con respecto a la composición de partida (ver Tabla 3). Dada la elevadísima complejidad en su composición y las diferencias inter- e intra-individuo (Mazzocca *et al.*, 2012), cada PRP es único y muy difícil, si no imposible, de caracterizar.

En este contexto, varios autores han propuesto hasta cinco sistemas de clasificación, más o menos completos, para poder definir mejor el tipo de PRP en base a la especificación de ciertas variables que se consideran críticas: el factor de enriquecimiento plaquetario (*platelet enrichment factor*, *PEF*), la presencia/ausencia de leucocitos, el método de activación y la descripción detallada del protocolo de preparación (ver Tabla 4) (Lana *et al.*, 2017; Magalon *et al.*, 2016; Mautner *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2012; DeLong *et al.*, 2012). No obstante, ninguna de estas clasificaciones se ha aceptado formalmente y las descripciones del PRP siguen siendo muy heterogéneas.

Tabla 3: Ejemplos de sistemas comerciales de preparación de PRP.

Nombre	Sistema	Círculo	Procedimiento	Activador	Composición PEF/Leu/Eri
<i>Accelerate PRP Sport</i>	Manual	SC	CS	Trombina	3-8x
<i>ACP</i>	Manual	C	CS	-	2-3x/No Leu/No Eri
<i>Angel</i>	Auto	C	CS	-	2-18x/Leu al gusto
<i>BioCUE</i>	NI	NI	NI	NI	Equivalente a <i>GPS II</i>
<i>Cascade</i>	Manual	SC	CS	CaCl ₂	5x
<i>Centrepid</i>	Manual	SC	CD	-	5x/2-3x Leu
<i>Cyclone</i>	NI	NI	NI	-	Equivalente a <i>Pure PRP II</i>
<i>Dr. PRP</i>	Manual	SC	CD	-	NI
<i>GLO PRP</i>	Manual	SC	CD	-	4-8x
<i>GPS II and III</i>	Manual	SC	CS	-	3-9,3x/5x Leu
<i>Kyocera Medical PRP Kit</i>	Manual	SC	CD	CaCl ₂	NI
<i>Magellan</i>	Auto	C	CD	Trombina CaCl ₂	2-13x
<i>Peak</i>	Auto	C	CS	-	8x/4-6x Leu/(1/3) Eri
<i>PRGF-Endoret</i>	Manual	SC	CS	CaCl ₂	2-3x
<i>Pure PRP II</i>	Manual	C	CD	-	6-16x/3-7x monocitos/No Eri
<i>Regenexx-SCP</i>	Manual	NI	NI	-	20-40x/Leu bajos/Eri bajos
<i>RegenKit</i>	Manual	SC	CS	-/gluconato de Ca	1-2x/1,5x10 ³ Leu/No Eri
<i>Res-Q 60 PRP</i>	SA	C	CS	-	Equivalente a <i>Pure PRP II</i>
<i>Selphyl</i>	Manual	SC	CS	CaCl ₂	1-2x
<i>SmartPREP2</i>	SAuto	SC	CD	-	4-8x/3-4x Leu/1x Eri
<i>Smith & Nephew PRC</i>	NI	NI	Filtración	NI	4x
<i>TropoCells</i>	Manual	Abierto	CS	-	4-5x/NI/No Eri

Auto: automático; SAuto: semi-automático; C: cerrado; SC: semi-cerrado; CS: centrifugación simple; CD: centrifugación doble; Leu: leucocitos; Eri: eritrocitos; NI: no indicado.

Tabla 4: Sistemas propuestos para la clasificación de PRP.

Sistema de clasificación		Variables						
Mishra <i>et al.</i> , 2012	<u>Tipo de PRP</u>		<u>PEF</u>					
	1: Leu aumentados, sin activar 2: Leu aumentados, activado 3: Leu ausentes/mínimos, sin activar 4: Leu ausentes/mínimos, activado		A: [plaquetas]>5x basal B: [plaquetas]<5x basal					
PAW (DeLong <i>et al.</i> , 2012)	<u>P (plaquetas/μl)</u>		<u>A (activación)</u>		<u>W (Leu)</u>			
	P1: [plaquetas]≤basal P2: basal<[plaquetas]<7,5·10 ⁵ P3: 7,5·10 ⁵ <[plaquetas]<1,25·10 ⁶ P4: [plaquetas]>1,25·10 ⁶		Sí/no		>basal <basal			
Mautner <i>et al.</i> , 2015	<u>[plaquetas] absoluta</u>		<u>[Leu]</u>		<u>[Eri]</u>		<u>Activación</u>	
	células/μl+volumen inyectado		Incluir neutrófilos si >1%		%		Sí/no	
DEPA (Magalon <i>et al.</i> , 2016)	<u>Dosis inyectada</u>		<u>Eficiencia de captura de plaquetas</u>		<u>Pureza del PRP</u>		<u>Activación</u>	
	A: [plaquetas]>5·10 ⁹ B: 3·10 ⁹ <[plaquetas]<5·10 ⁹ C: 10 ⁹ <[plaquetas]<3·10 ⁹ D: [plaquetas]<10 ⁹		A: >90% B: 70%-90% C: 30%-70% D: <30%		A >90% B: 70%-90% C: 30%-70% D <30%		Sí/no	
MARSPILL (Lana <i>et al.</i> , 2017)	<u>Método</u>	<u>Activación</u>	<u>Eri</u>	<u>Centrifugación</u>	<u>PEF</u>	<u>Imagen</u>	<u>Leu</u>	<u>Luz</u>
	Ma/Auto	Sí/no	Rico/pobre	CS/CD	2-3x 4-6x 6-8x 8-10x	Sí/no	Rico/pobre	Sí/no

3.4 Marco legal para su obtención y aplicación

En el ámbito legislativo, el PRP es considerado un medicamento de uso humano al que, dadas sus características y su forma de obtención, no se le pueden aplicar las regulaciones de los medicamentos de producción industrial y no se puede considerar como un medicamento de terapia avanzada (según lo establecido en el Reglamento 2007/1394/CE). Por el contrario, el PRP se enmarca en el artículo 5 de la Directiva 2001/83/CE. Es decir, se considera un medicamento elaborado de acuerdo con la prescripción de un facultativo reconocido para un paciente individual concreto bajo su responsabilidad directa. En el

territorio nacional español, la normativa europea se transpuso mediante la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Posteriormente, en el año 2013, el INFORME/V1/23052013 de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) daba una visión concisa acerca de las consecuencias de la consideración del PRP como medicamento de uso humano y las garantías mínimas exigibles para su utilización en España (ver Tabla 5).

Tabla 5: Garantías mínimas para el uso del plasma autólogo y sus fracciones.

<p>Calidad de producción Sistema abierto: certificación de instalaciones, producción y control de calidad adecuados. Sistema cerrado: seguir las instrucciones del kit comercial, que deberá disponer de marcado CE para cada uso.</p>
<p>Eficacia Necesidad de ensayos clínicos para establecer niveles de evidencia adecuados en cada patología y tipo de PRP. Listado en colaboración con expertos de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aplicaciones con evidencias suficientes para recomendar el tratamiento con uno o varios tipos de PRP. - Aplicaciones con beneficio/riesgo negativo en las que se recomienda no uso. - Aplicaciones en las que se necesitan mayores evidencias para aceptar el uso.
<p>Trazabilidad Objetivo: aun siendo autólogo, impedir la transmisión de enfermedades infecciosas (analíticas y requisitos del Real Decreto 1088/2005).</p>
<p>Farmacovigilancia Comunicación a los Centros de Farmacovigilancia de cada Comunidad Autónoma de las sospechas de reacciones adversas.</p>
<p>Información Información mínima al paciente sobre calidad, eficacia, ventajas sobre otras terapias, riesgos conocidos y posibles reacciones adversas.</p>

CE: Conformidad Europea

A pesar de que los parámetros de calidad y seguridad del proceso de obtención y los requerimientos sanitarios del producto están muy bien delimitados, según lo establecido en la Directiva 2002/98/CE, la composición final no está estandarizada. Esto es así tanto a nivel de la AEMPS, como a nivel de la Unión Europea y de la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*) americana. Es decir, el contenido del producto que se va a aplicar a los pacientes no está definido y es el médico el responsable último de definir las características del compuesto terapéutico que va a aplicar, en función de su campo de trabajo y de las evidencias científicas disponibles.

La aplicación clínica del PRP tiene una trayectoria de largo recorrido en el ámbito de la odontología (Suárez-López Del Amo *et al.*, 2015) y la cirugía maxilofacial (Simonpieri *et al.*, 2012). Posteriormente empezó a aplicarse para tratar lesiones musculoesqueléticas. Su

uso en deportistas profesionales atrajo un gran interés y determinó el inicio de una etapa de intensa investigación clínica y preclínica (Brossi *et al.*, 2015). Así, otros ámbitos médicos en los que también se aplica el PRP son la cirugía cardíaca (Spartalis *et al.*, 2015), la cirugía pediátrica (Tavakolinejad *et al.*, 2014a), la ginecología (Dawood y Salem, 2018), la urología (Matz *et al.*, 2018), la cirugía plástica (Sommeling *et al.*, 2013) y la oftalmología (Anitua *et al.*, 2016). Más recientemente, la dermatología ha empezado a desarrollar terapias con PRP para curar heridas (Sclafani y Azzi, 2015), regenerar cicatrices (Zaleski-Larsen *et al.*, 2016) y tratar la alopecia (Singh y Goldberg, 2016). No obstante, en muchos de estos ámbitos existen controversias acerca de la eficacia del PRP para indicaciones específicas, lo que impide establecer su uso clínico rutinario. Este es el caso, por ejemplo, de la dermatología (Lynch y Bashir, 2016) o la odontología (Mihaylova *et al.*, 2017), entre otros.

3.5 Indicaciones principales del PRP y sus derivados para el tratamiento de la OA

La aplicación del PRP para el tratamiento de la OA ha ido ganando un interés creciente a lo largo de la última década. El tratamiento puede realizarse con tres enfoques diferentes, en función del tipo de defecto presente en el cartílago y el grado de progresión de la OA: 1) como agente inductor de proliferación y diferenciación condrogénica de las células a nivel local, para reparar lesiones de pequeño tamaño en presencia o ausencia de OA; 2) como soporte de MSCs para la TE del cartílago, para reparar lesiones de mayor tamaño en presencia o ausencia de OA; y 3) como agente antiinflamatorio que permita frenar la degeneración del cartílago una vez establecida la patología OA. A continuación, se presentan los hallazgos más relevantes para cada indicación.

3.5.1 El PRP como agente regenerativo

La consideración del PRP como potencial terapia para la regeneración del tejido cartilaginoso viene dada por su contenido en citoquinas anabólicas. Específicamente, los efectos condro-promotores y condro-protectores de los mediadores *TGF- β* , *IGF*, *bFGF* y *PDGF* han sido descritos por numerosos autores. Está ampliamente reconocido que estimulan la proliferación de condrocitos y MSCs. Además, promueven la síntesis de ACAN y COLII, dirigen la condrogénesis de las MSCs, previenen la apoptosis y disminuyen los efectos catabólicos de las MMPs y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (Xie *et al.*, 2014).

En concreto, los estudios preclínicos *in vitro* indican de forma unánime un importante efecto mitógeno del PRP en condrocitos porcinos (Akeda *et al.*, 2006), bovinos (Kaps *et al.*, 2002) y ovinos (Drengk *et al.*, 2009) y se ha visto el mismo efecto en condrocitos humanos procedentes de articulaciones sanas (Gaissmaier *et al.*, 2005) y OA (Spreafico *et al.*, 2009). También las MSCs ovinas (Drengk *et al.*, 2009) responden al estímulo del PRP aumentando su proliferación, al igual que las MSCs humanas (Mishra *et al.*, 2009). Además, en la mayoría de los casos, estas células se diferencian al linaje condrogénico. En cambio, no hay tanta concordancia acerca de los efectos condrogénicos del PRP en condrocitos. Así, tanto en condrocitos animales como humanos, algunos estudios encuentran un aumento en la expresión de marcadores de condrogénesis (COLII, ACAN, SOX9) y la acumulación de componentes de matriz (Spreafico *et al.*, 2009; Akeda *et al.*, 2006), mientras que otros indican un efecto inhibitorio (Drengk *et al.*, 2009; Kaps *et al.*, 2002).

Los efectos mitógeno y condrogénico del PRP, junto con su capacidad para estimular la migración de las MSCs (Krüger *et al.*, 2012), sugieren su posible aplicación intraarticular para acelerar la reparación de los defectos del cartílago. De hecho, en un modelo animal de oveja para la reparación de defectos condrales, la combinación de la técnica de microfractura (perforación del hueso subcondral para permitir el sangrado y migración de las MSCs) con inyecciones de PRP mejoró la reparación del tejido a los 3, 6 y 12 meses, si bien no se formó cartílago hialino (Milano *et al.*, 2012). Hapa *et al.* (2013) encontraron una mejora similar en un modelo de rata, mientras que Vaisman *et al.* (2012) no encontraron beneficio en conejo.

A nivel clínico, la combinación de la técnica de microfractura con la inyección intraarticular de PRP para tratar lesiones osteocondrales de tobillo ha demostrado aportar resultados significativamente mejores que la microfractura por sí sola (Guney *et al.*, 2015) o en combinación con AH (Görmeli *et al.*, 2015; Mei-Dan *et al.*, 2012). No obstante, la eficacia parece ser inferior a la de la mosaicoplastia (autotrasplante de fragmentos de cartílago) en términos de paliación del dolor (Guney *et al.*, 2016). El tratamiento combinado con microfractura más PRP también ha demostrado su efectividad para el tratamiento de la OA de rodilla en pacientes de 40-50 años (Lee *et al.*, 2013b).

3.5.2 El PRP como soporte en la ingeniería tisular del cartílago

Además de sus propiedades mitógenas, condro-promotoras y condro-protectoras, derivadas de los GFs, el PRP contiene también fibrinógeno y factores de coagulación, por lo que

puede activarse para formar un soporte tridimensional provisional de fibrina que permita reparar las lesiones del cartílago (Xie *et al.*, 2014).

La fibrina es una proteína formada por la polimerización del fibrinógeno plasmático durante el proceso natural de curación de las heridas. El proceso de polimerización es iniciado por la rotura proteolítica de una de las tres cadenas polipeptídicas que conforman las moléculas de fibrinógeno, realizada por la enzima trombina (Mosesson, 2005). La red tridimensional de fibrina así obtenida es un producto biocompatible y biodegradable en el que las plaquetas quedan atrapadas durante el proceso de coagulación, pudiendo actuar a modo de reservorio de *GFs* para la liberación local de moléculas bioactivas. Se ha demostrado que el uso de CaCl_2 para iniciar la polimerización promueve la formación de trombina nativa, imitando el proceso fisiológico y permitiendo una liberación más sostenida de *GFs*; esto puede ser de vital importancia para la adecuada regeneración del tejido y, además, evita el uso de trombina bovina, que se ha asociado con el desarrollo de coagulopatías (Anitua *et al.*, 2008).

En función del tipo de defecto presente en el cartílago, el PRP se puede aplicar como agente terapéutico de reparación acelular (gel de PRP solo), como soporte de condrocitos o *MSCs*, o bien combinado con otros polímeros (COL, ácido glicólico, ácido poliláctico, copolímeros) y condrocitos o *MSCs* para aportar una mejor reparación del tejido (Zhu *et al.*, 2013). En cualquier caso, la coagulación *in situ* del PRP permite rellenar completamente el defecto a tratar, lo que puede aportar una mejor integración del tejido de reparación con el tejido nativo (Fig. 10).

En general, diversas aproximaciones experimentales a la combinación de los soportes de PRP con *MSCs* de *BM* y de tejido adiposo (*adipose tissue-derived MSCs*, *AT-MSCs*) para la reparación del cartílago han aportado resultados prometedores (Moroz *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2012; Fortier *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2010). No obstante, éste es un campo en investigación que todavía genera controversia, ya que también hay estudios que cuestionan la idoneidad del PRP como soporte para la *TE* del cartílago (Liou *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2012).

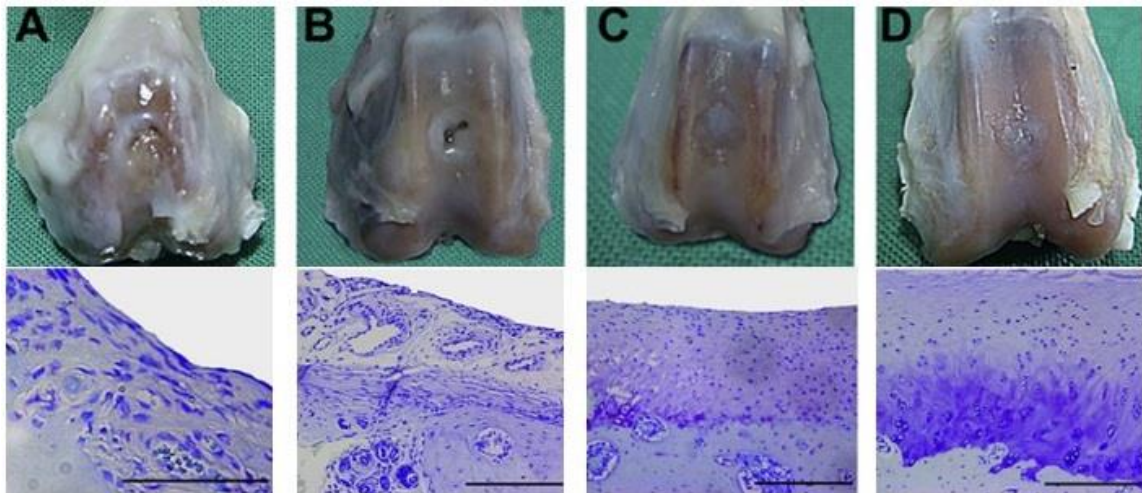


Fig. 10: Ejemplo de reparación de un defecto osteocondral con soportes de PRP. Las fotos representan la apariencia macroscópica y microscópica (tinción azul de toluidina, AT) de los defectos osteocondrales practicados en rodilla de conejo 6 semanas después de la cirugía en los grupos de tratamiento control (A), solo PRP (B), PRP+AT-MSCs (C) y PRP+BM-MSCs (D). La combinación de PRP y MSCs rellena por completo los defectos y resulta en la formación de un tejido similar al cartílago. La integración con el cartílago nativo es mejor cuando el PRP se combina con BM-MSCs. Las barras de escala representan 200 μ m. Imágenes tomadas y modificadas de Xie *et al.* (2012).

3.5.3 El PRP como agente antiinflamatorio

Otro hecho ampliamente descrito es que, entre los cientos de moléculas contenidas en las plaquetas, se pueden encontrar también mediadores pro- y antiinflamatorios. El contenido significativamente superior en mediadores antiinflamatorios sugiere que el PRP podría tener un efecto supresor de la inflamación en la OA, con lo que protegería el cartílago y reduciría el dolor sintomático (Woodel-May *et al.*, 2011). Entre las moléculas antiinflamatorias se incluyen, por ejemplo, los receptores solubles de $TNF\alpha$ ($sTNF-RI$ y $-RII$), las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13 y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra). Este último es una citoquina natural de la familia de IL-1 β que se une a los mismos receptores, pero que no induce ninguna respuesta intracelular. De esta manera, IL-1Ra es capaz de inhibir los efectos de IL-1 al bloquear su interacción con los receptores (Jacques *et al.*, 2006). La administración terapéutica de IL-1Ra exógeno se propuso inicialmente en los años 90 (Caron *et al.*, 1996; Dinarello y Thompson, 1991), y desde entonces se han desarrollado varios productos comerciales basados en el PRP y enriquecidos en IL-1Ra (Barreto y Braun, 2016; O'Shaughnessey *et al.*, 2011; Baltzer *et al.*, 2009).

A nivel preclínico, los resultados de la aplicación de PRP en modelos de OA *in vitro* y en animales son dispares. Así, algunos estudios encuentran efectos antiinflamatorios y anticatabólicos (Gilbertie *et al.*, 2018; Simental-Mendía *et al.*, 2018; Moussa *et al.*, 2017;

Yin *et al.*, 2017; Osterman *et al.*, 2015; Woodel-May *et al.*, 2011), mientras que otros no encuentran beneficios (Van Buul *et al.*, 2011), o bien describen una agravación de la situación inflamatoria y la destrucción del cartílago (Lee *et al.*, 2016; Kisiday *et al.*, 2012). De manera más relevante, los resultados en ensayos clínicos son también inconcluyentes. Varios estudios han mostrado que las inyecciones intraarticulares de PRP producen una reducción en los índices de dolor y mejoras en las escalas de valoración funcional de los pacientes (Cole *et al.*, 2017; Joshi-Jubert *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Talay-Çalis *et al.*, 2015; Hart *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013b). Por el contrario, otros ensayos no han encontrado beneficios en la aplicación del PRP al compararla con otros tratamientos. Por ejemplo, Filardo *et al.* (2012) no encontraron diferencias entre las inyecciones intraarticulares de PRP y de AH en la rodilla OA. En conjunto, el análisis pormenorizado de los diferentes estudios disponibles en este ámbito parece favorecer el PRP sobre otros tratamientos intraarticulares, como el AH o el condroitín sulfato, para el tratamiento de la OA, pero su eficacia clínica sigue siendo objeto de debate (Shen *et al.*, 2017; Meheux *et al.*, 2016; Laudy *et al.*, 2015; Anitua *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014).

La enorme variabilidad en la composición del PRP, derivada de los métodos de preparación dispares y de la “estandarización” inadecuada, se ha identificado como la causa más probable para estos resultados contradictorios, además de dificultar en gran medida la comparación entre estudios. Numerosos autores han señalado la urgente necesidad de estandarizar adecuadamente la composición del agente terapéutico, el PRP, así como la dosificación y frecuencia de aplicación durante el tratamiento para poder alcanzar conclusiones definitivas acerca de su eficacia clínica (Bennel *et al.*, 2017; Degen *et al.*, 2017; Fitzpatrick *et al.*, 2017; Moatshe *et al.*, 2017; Pavlovic *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado que está constituido por una pequeña proporción de células (los condrocitos) inmersas en una compleja MEC que ellas mismas sintetizan y mantienen. Al tratarse de un tejido avascular, su capacidad de reparación es muy limitada. Además, la carencia de inervación determina que las lesiones no produzcan ningún dolor y esto favorece el avance del defecto, que puede acabar desencadenando *OA*.

La *OA* es la enfermedad reumática más prevalente a nivel mundial, con una elevada incidencia en nuestra región. Es una patología muy dolorosa e incapacitante, que deteriora enormemente la calidad de vida de los pacientes afectados. Se trata de una dolencia compleja y multifactorial, pero está ampliamente aceptado el papel central de la degeneración del cartílago articular y la inflamación en su establecimiento y evolución. La inflamación crónica de bajo grado es característica del proceso *OA*. A nivel molecular, esta patología se define por niveles elevados de citoquinas como $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$ y por la producción anormal de mediadores inflamatorios, catabólicos y oxidantes como PGE_2 , *MMPs* (*MMP-13* y *MMP-3*, fundamentalmente) y *NO*. En conjunto, estos factores actúan sinérgicamente para favorecer la degradación del cartílago articular (Wojdasiewicz *et al.*, 2014; Blanco y Rego-Pérez, 2010; Monfort-Faure y Trujillo-Martín, 2010). Los tratamientos existentes están dirigidos al alivio sintomático del dolor, pero no curan la enfermedad ni frenan su progreso. Por ello, en última instancia, es necesario realizar una cirugía de reemplazo protésico para recuperar la funcionalidad de la articulación.

En los últimos años se han ido desarrollando diversas alternativas terapéuticas dirigidas a la reparación de las lesiones del cartílago articular o a la resolución del proceso inflamatorio. Así, la terapia celular con *MSCs* pretende solventar el problema de la baja celularidad del cartílago hialino (más acusada todavía en la *OA*), al tiempo que se evita el rechazo inmunitario asociado a los alotrasplantes y los conflictos éticos asociados al uso de células madre embrionarias. Por otra parte, la *TE* propone aproximaciones basadas en la aplicación de biomateriales, solos o en combinación con *GFs* y/o células como las *MSCs*, para reparar defectos en la articulación. En lo referente a las terapias antiinflamatorias, actualmente se están investigando agentes terapéuticos alternativos como el sulfuro de hidrógeno, con resultados prometedores a nivel experimental (Vela-Anero *et al.*, 2017; Burguera *et al.*, 2014).

El PRP es un derivado sanguíneo que ha despertado un gran interés para el tratamiento de la *OA* en los últimos años, por su potencial como inductor de condrogénesis, como soporte de *TE* y como agente antiinflamatorio. Esto se debe a su particular composición, que lo

hace enormemente atractivo en ámbitos muy dispares. Contiene *GFs* anabólicos (*TGF- β* , *IGF*, *bFGF*, *PDGF*) que podrían proteger al cartílago frente a la degradación de las *MMPs* y promover la proliferación celular y la diferenciación condrogénica. También presenta una proporción importante de mediadores antiinflamatorios, que podrían ayudar a proteger el cartílago y reducir el dolor en la *OA*. Además, la fibrina plasmática es un producto biocompatible y biodegradable que se puede aplicar como biomaterial de *TE*, con las ventajas adicionales de aportar *GFs* y permitir la encapsulación sencilla de células como las *MSCs* (Xie *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2013; Woodel-May *et al.*, 2011). Actualmente hay una gran controversia en cuanto a la eficacia del PRP en todos estos ámbitos, debida en gran medida a la elevada heterogeneidad en su composición. Para poder alcanzar conclusiones definitivas, es indispensable estandarizar la composición del PRP y su régimen de aplicación clínica.

Por todo esto, para desarrollar este trabajo se ha planteado la hipótesis de que el PRP estandarizado en función del número absoluto de plaquetas es un potencial tratamiento para la *OA*.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la hipótesis planteada, los objetivos generales de esta tesis son:

1. Estandarizar el PRP en función de la concentración absoluta de plaquetas.
2. Determinar el potencial proliferativo y de diferenciación de los PRPs estandarizados en condrocitos y *BM-MSCs*.
3. Evaluar el potencial antiinflamatorio, anticatabólico y antioxidante de los PRPs estandarizados en condrocitos y cartílago *OA*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes voluntarios sin patologías reumáticas. Las muestras de tejido fueron donadas por pacientes sometidos a artroplastia o amputación de miembros inferiores en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) y el Hospital San Rafael de A Coruña. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CAEIG) (Código Registro 2015/499). Todos los donantes firmaron el correspondiente consentimiento informado (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica) (ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO) y las muestras se incluyeron en la Colección de Muestras para la Investigación de Enfermedades Reumáticas del Dr. Francisco Blanco García, autorizada por el CAEIG (Código Registro 2013/107) e inscrita en el Registro Nacional de Biobancos (Código Sección Colecciones C.0000424).

En este estudio se aplica la denominación de “células OA” o “tejido OA” a aquellos obtenidos de pacientes con OA diagnosticada.

1.1 Obtención de sangre periférica

La sangre periférica de 15 donantes voluntarios (96,3% mujeres y 3,7% hombres, con una edad media de $34,3 \pm 7,7$ años (rango: 23-45 años)), sin síntomas ni historial de OA, se obtuvo mediante venopunción braquial en tubos *Vacurette*® de 5 ml con una solución anticoagulante de citrato de sodio al 3,8% (*Vacurette* España, Madrid, España). Este anticoagulante se seleccionó debido a que inhibe de forma reversible la coagulación sanguínea y preserva la morfología y actividad plaquetaria, frente a otros anticoagulantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA*) o la heparina, que provocan una inhibición irreversible.

1.2 Obtención de cartílago articular

El cartílago articular se obtuvo de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia de cadera, debido a OA o fractura, y de cóndilos femorales y platillos tibiales de pacientes sometidos a artroplastia de rodilla o amputación supracondílea. Tras una resección inicial de láminas de cartílago de las piezas articulares, se obtuvieron explantes cilíndricos de 6 mm de diámetro con un sacabocados de biopsias (*Kai Europe GmbH, Solingen, Alemania*).

1.3 Obtención y cultivo de condrocitos articulares

El aislamiento de condrocitos se realizó según el método de Blanco y Lotz (1995). Resumidamente, las láminas de cartílago aisladas se trocearon mecánicamente en pequeños fragmentos con un escalpelo, y éstos se sometieron a una digestión enzimática secuencial. En primer lugar, se incubaron 10 min a 37°C en agitación en una solución de tripsina-EDTA (*Sigma-Aldrich* Química S.L., Madrid, España) al 10% en medio Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*) (*Lonza Ibérica S.A.U.*, Barcelona, España) con 1% penicilina/estreptomicina (P/E) (*Gibco-ThermoFisher Scientific*, Madrid, España). Una vez retirado el primer medio de digestión, los fragmentos de cartílago se sometieron a una segunda digestión enzimática en una solución de colagenasa tipo IV (*Sigma-Aldrich* Química S.L., Madrid, España) a 2 mg/ml en *DMEM* con 5% de suero bovino fetal (SBF) (*Gibco*) y 1% P/E (*DMEM* 5%), en la que se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche. La suspensión celular resultante se centrifugó 10 min a 300 x g, se descartó el sobrenadante y las células se contaron, se sembraron en frascos de cultivo (*Corning Optical Communications S.L.U.*, Madrid, España) en medio de expansión (*DMEM* 10%, consistente en *DMEM* suplementado con 10% SBF y 1% P/E) y se cultivaron a 37°C en una estufa humidificada y con un 5% de CO₂. Una vez alcanzada la confluencia, las células se despegaron del frasco de cultivo con una solución de tripsina-EDTA al 20% en suero salino (SS) (*Fresenius Kabi España S.A.U.*, Barcelona, España), y se resembraron en un mayor número de frascos de cultivo para su expansión (subcultivo). Todos los experimentos se realizaron con condrocitos en pase 1.

1.4 Obtención y cultivo de BM-MSCs

Todas las muestras de *BM* procedieron de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia de cadera debida a *OA* o fractura. Se realizaron lavados del hueso esponjoso con *DMEM* 5% con ayuda de una jeringa de 20 ml (*Covidien Spain S.L.*, Madrid, España) y una aguja de 19G *BD MicrolanceTM* (*BD Medical*, Madrid, España). La suspensión celular resultante se hizo pasar por un filtro de 41 µm de poro (*Merck Millipore*, Madrid, España) y se centrifugó 10 min a 300 x g para descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado celular en *DMEM* con 20% SBF y 1% P/E (*DMEM* 20%). Las células se sembraron en frascos adherentes y se mantuvieron en cultivo a 37°C en atmósfera húmeda al 5% en CO₂. Tras 48 h, se retiró el medio y se realizó un lavado con SS para eliminar las células no adherentes antes de reemplazar el medio de cultivo. Cuando las células alcanzaron el 70-

80% de confluencia, se realizaron subcultivos para evitar la diferenciación de las MSCs. En los dos subcultivos iniciales se realizó la técnica del *pre-plating* descrita por Richler y Yaffe (1970), a fin de eliminar los macrófagos y fibroblastos existentes en los cultivos. Para ello, las células se despegaron del frasco de cultivo con tripsina-EDTA 2x y se añadió DMEM 5%. La suspensión celular se mantuvo a 37°C y, tras 15 min, se recogió, se centrifugó 10 min a 300 x g y se resembró el precipitado celular en DMEM 20%. De esta manera, los fibroblastos y macrófagos, con mayor capacidad de adherencia, quedan adheridos al frasco de cultivo desechado, seleccionando así las BM-MSCs para su expansión. Todos los experimentos se realizaron con células en pase 3-4.

2 PREPARACIÓN DE PRP ESTANDARIZADO

El proceso de preparación se resume en la Fig. 11. En condiciones de esterilidad, a cada donante se le extrajeron aproximadamente 50 ml de sangre periférica y se realizó una caracterización con un hemocitómetro *Haematology Analyzer AcT diff-AL* (Beckman Coulter, Madrid, España) para conocer su composición basal. A continuación, la sangre entera se centrifugó 20 min a 200 x g en una centrífuga *Allegra™ X-22R* (Beckman Coulter) para separar la serie roja, la serie blanca y el plasma (Fig. 11. Centrifugación diferencial). Este último se aspiró cuidadosamente para no arrastrar glóbulos blancos y se introdujo en un nuevo tubo. Los plasmas de cada individuo se caracterizaron en el hemocitómetro y se mezclaron. El *pool* se caracterizó nuevamente para confirmar los recuentos plaquetarios y la ausencia de leucocitos, y se centrifugó 20 min a 1.500 x g para precipitar las plaquetas que, a continuación, se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial de plasma para generar un concentrado de PRP. El excedente de plasma se deplecionó totalmente de plaquetas mediante una centrifugación de 10 min a 4.000 x g, obteniendo así plasma pobre en plaquetas (PPP) (Fig. 11. Preparación de PRP y PPP).

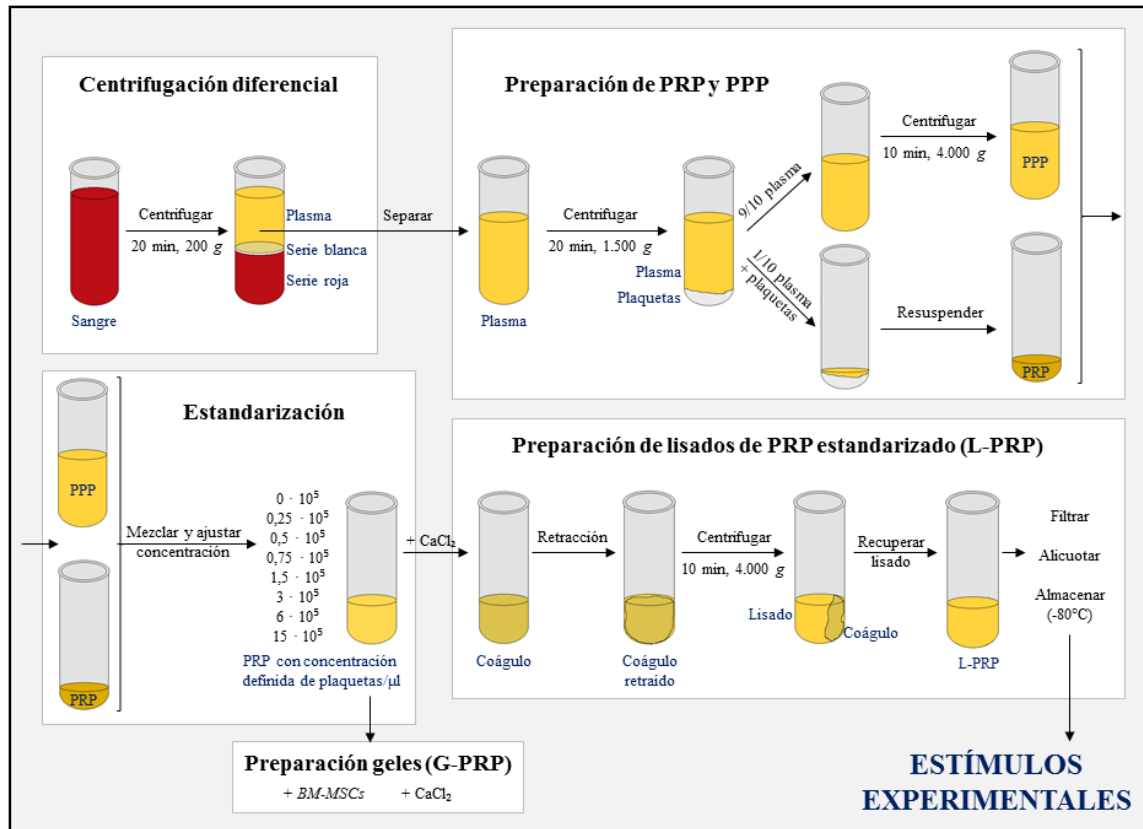


Fig. 11: Esquema del proceso de preparación de los lisados de PRP.

Los recuentos plaquetarios del PRP y del PPP se verificaron en el hemocitómetro y, seguidamente, ambos se emplearon para preparar PRPs con concentraciones absolutas de plaquetas conocidas. En concreto: $0,25 \cdot 10^5$; $0,50 \cdot 10^5$; $0,75 \cdot 10^5$; $1,50 \cdot 10^5$; $3 \cdot 10^5$; $6 \cdot 10^5$ y $15 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl (Fig. 11. Estandarización). Estas suspensiones, e incluyendo también el PPP (0), se coagularon a 37°C mediante la adición de $50 \mu\text{l}$ de CaCl_2 al 10% p/v por ml de plasma y, posteriormente, se incubaron a 4°C para provocar la retracción de los coágulos generados. Finalmente, una centrifugación de 10 min a $4.000 \times g$ y a 4°C permitió separar los lisados de PRP (L-PRP), o sueros, de los coágulos de fibrina (Fig. 11. Preparación de lisados de PRP estandarizado (L-PRP)). Estos L-PRPs se esterilizaron con un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de poro y se alicuotaron para almacenarlos a -80°C hasta su uso como suplementos de cultivo. Los distintos L-PRPs así generados se denotan como L-PRP0; L-PRP0,25; L-PRP0,5; L-PRP0,75; L-PRP1,5; L-PRP3; L-PRP6 y L-PRP15, en función de la concentración absoluta de plaquetas de su PRP de origen, siendo L-PRP0 el correspondiente al PPP. Los PRPs estandarizados destinados a la obtención de geles de PRP (G-PRP) se mezclaron con *BM-MSCs* y se activaron con CaCl_2 , de forma similar a los PRPs estandarizados destinados a la obtención de L-PRPs (Fig. 11. Geles).

3 CONDICIONES EXPERIMENTALES Y ESTÍMULOS EMPLEADOS

Las condiciones experimentales empleadas para cada estudio se detallan en la Tabla 6. En función del tipo de estudio a realizar, las células se sembraron con la densidad adecuada en placas de 6, 48 o 96 pocillos (*Corning*), en tubos de poliestireno de fondo cónico (Laboquimia, Lardero, España) o en *chamber-slides Millicell® EZ SLIDES (Merck Millipore)* de 8 pocillos.

Para los experimentos en formato bidimensional, tras la siembra en medio de expansión se dejó un período de adhesión y estabilización de 24 h antes de la aplicación de los estímulos correspondientes. Los explantes de cartílago se colocaron en placas de 48 pocillos y también se estabilizaron durante 24 h en *DMEM* 10%. Seguidamente, se realizó un lavado con SS y las células o explantes se incubaron en condiciones basales (Basal, *DMEM* 10%) o en presencia de los diferentes estímulos. Los estímulos se administraron en medio deplecionado (*DMEM* 0%, *DMEM* sin SBF y con P/E), excepto en los experimentos de diferenciación adipogénica y osteogénica de las *BM-MSCs*, en los que además se emplearon los medios comerciales de diferenciación apropiados (medio adipogénico, MAdipo, y medio osteogénico, MOsteo).

Para los experimentos en formato tridimensional, es decir, la diferenciación condrogénica de las *BM-MSCs* en formato *pellet* y en los G-PRPs, los estímulos se aplicaron inmediatamente después de la siembra. En estos casos, de forma similar a los estudios de diferenciación adipogénica y osteogénica, los estímulos se administraron en *DMEM* 0% y en medio comercial de diferenciación condrogénica (MCondro). Los tiempos de incubación para cada tipo de estudio se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones experimentales empleadas en los distintos estudios.

Estudio	Recipiente de cultivo	Densidad celular	Estímulos	Tiempo final
Viabilidad celular y proliferación				
Cuantificación de células y proteína total	Placa de 6	10·10 ⁴ c/p	Basal, DMEM 0% + (L-PRP0,75-15)	72 h
<i>AlamarBlue</i> ®	Placa de 96	2,5·10 ⁴ c/p		
Diferenciación adipogénica/osteogénica				
<i>qRT-PCR</i>	Placa de 6	20·10 ⁴ c/p	Basal, MAdipo, MOsteo, DMEM 0% + (L-PRP0,75-3), MAdipo + (L-PRP0,75-3), MOsteo + (L-PRP0,75-3)	14 días
Tinciones histoquímicas	<i>Chamber-slide</i> de 8	3·10 ⁴ c/p		
Diferenciación condrogénica convencional (<i>pellet</i>)				
Todos los estudios	Tubo de fondo cónico	25·10 ⁴ c/tubo	Basal, MCondro, DMEM 0% + (L-PRP1,50-15), MCondro + (L-PRP0,75-3)	21 días
Diferenciación condrogénica en biomaterial (G-PRP)				
Todos los estudios	Placa de 48	150·10 ⁴ c/gel	Basal, MCondro	21 días
Inflamación				
<i>qRT-PCR</i>	Placa de 6	10·10 ⁴ c/p	Basal, DMEM 0% + IL-1β, DMEM 0% + IL-1β + (L-PRP0-15)	48 h
<i>Western blot (WB)</i>	Placa de 6	30·10 ⁴ c/p		
<i>ELISA</i>	Placa de 96	5·10 ⁴ c/p		
Inmunocitoquímica	<i>Chamber-slide</i> de 8	3·10 ⁴ c/p		
Histoquímica e inmunohistoquímica	Placa de 48	1 explante/p	Basal, DMEM 0% + IL-1β, DMEM 0% + IL-1β + (L-PRP0,75 y 15)	21 días

c/p: células/pocillo, c/tubo: células/tubo, c/gel: células/gel, explante/p: explante/pocillo, Basal: DMEM 10%.

4 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGÉNICA, OSTEOGÉNICA Y ADIPOGÉNICA DE MSCs

4.1 Diferenciación condrogénica

4.1.1 Diferenciación condrogénica en *pellet*

Se testó el potencial condrogénico de los distintos L-PRPs utilizando el método convencional en *pellet* propuesto por Johnstone *et al.* (1998), con mínimas modificaciones. Se introdujeron 2,5·10⁵ células en tubos de fondo cónico de poliestireno y se centrifugaron 10 min a 300 x g. Se retiró cuidadosamente el medio de expansión para no alterar el precipitado celular y se añadieron los distintos medios de estimulación. Tras 24 h, se

despegó el precipitado celular del fondo del tubo mediante un golpe seco y se mantuvo el cultivo durante 21 días, renovando los medios cada 3 días.

Las condiciones de estimulación para el estudio de la **inducción condrogénica** fueron *DMEM* 10% (control negativo de diferenciación, C-), MCondro (control positivo de diferenciación, C+) y *DMEM* 0% + 10% de L-PRP1,5-15 (ver también Tabla 7). El MCondro utilizado fue *hMSC Chondrogenic Differentiation BulletKit™ Medium* (Lonza) suplementado con 10 ng/ml de *TGF-β3* (*ProSpec-Tany Technogene Ltd.*, Rejovot, Israel), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se empleó un total de n=5 donantes de *BM-MSCs*.

Tabla 7: Medios utilizados para los estudios de inducción condrogénica en formato *pellet*.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (<i>DMEM</i> 10%)	<i>BM-MSCs</i>	$2,5 \cdot 10^5$	21 días
C+ (MCondro)			
<i>DMEM</i> 0% + 10% L-PRP1,5-15			

Para el estudio de la **promoción condrogénica**, las condiciones de estimulación fueron *DMEM* 10% (C-), MCondro (C+) y MCondro + 10% de L-PRP1,5-15 (ver también Tabla 8). Para este estudio se empleó un total de n=3 donantes de *BM-MSCs*.

Tabla 8: Medios utilizados para los estudios de promoción condrogénica en formato *pellet*.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (<i>DMEM</i> 10%)	<i>BM-MSCs</i>	$2,5 \cdot 10^5$	21 días
C+ (MCondro)			
MCondro + 10% L-PRP1,5-15			

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, tres *pellets* de cada condición se procesaron para la realización de estudios de biología molecular. En particular, para evaluar la condrogénesis, se analizó la expresión de los genes COLII, ACAN y región Y de determinación del sexo-caja 9 (*SRY* (*sex determining region Y*)-*box 9*, *SOX9*). Se analizaron también los genes COLI, COLX y factor de transcripción 2 relacionado con Runt (*Runt-related transcription factor 2*, *RUNX2*) para evaluar el grado de hipertrofia y los genes factor de transcripción 1 con homeodominio POU de clase 5 (*POU class 5 homeobox 1*, *POU5F1*) y homeodominio Nanog (*NANOG*) como marcadores de indiferenciación celular. Además, un *pellet* de cada condición se procesó para estudios histoquímicos y se realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina (H-E), tricómico de Masson (TM), AT, azul

alción-ácido peryódico de Schiff (*AA-periodic acid Schiff (PAS)*) y safranina O-verde rápido (*SO-fast green (FG)*).

4.1.2 Diferenciación condrogénica en gel de PRP

También se exploró el potencial del PRP como soporte tridimensional de *MSCs* para su aplicación en tratamientos de *TE* del cartílago que requieran capacidad para inducir la condrogénesis y la síntesis de matriz, y se estudió el efecto de la dosis de plaquetas en la diferenciación condrogénica de la *MSCs*.

Esta parte del estudio se realizó durante una estancia predoctoral, entre septiembre y diciembre de 2016, en el *Stem Cell Lab* (Facultad de Medicina, Universidad de Heidelberg, Alemania), con el grupo de la Dra. Karen Bieback. Teniendo en cuenta la duración de la estancia y la disponibilidad de células en el laboratorio, se estableció una densidad celular de $6 \cdot 10^6$ *MSCs/ml* y un tiempo final de cultivo de 21 días.

Los G-PRPs se obtuvieron en estrictas condiciones de esterilidad mezclando un volumen mínimo de *BM-MSCs* de $n=4$ donantes en PRP sin activar. Se emplearon concentraciones de 0,75; 1,5 y $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l. Luego, se añadieron 50 μ l de CaCl_2 por ml de PRP para activar la coagulación. Antes de que ésta se produjese, las suspensiones de PRP+*MSCs* se repartieron en placas de 48 pocillos (250 μ l/pocillo), haciendo duplicados de todos los tipos de gel incluidos en cada experimento para poder realizar los distintos análisis.

Como control negativo se emplearon geles inertes de agarosa de punto de fusión bajo (Ag) (*Sigma-Aldrich*) con *BM-MSCs* a la misma densidad celular que en los geles de PRP. Se preparó una solución de Ag al 2% p/v, que se esterilizó en autoclave y se alicuotó. Para obtener los geles, se empleó un termobloque para calentar las alícuotas a 65°C y dejarlas enfriar lentamente hasta alcanzar los 37°C, manteniéndolas en todo momento en el termobloque para evitar la solidificación. Una vez alcanzada la temperatura fisiológica, se añadieron las células resuspendidas en medio de expansión, mezclándolas en proporción 1:1 para conseguir una concentración final de Ag del 1%, y se repartieron las suspensiones de la misma forma que los geles de PRP. Una vez consolidados todos los geles, se añadieron los medios de estimulación apropiados, que en este caso fueron *DMEM* 10% (para probar la capacidad intrínseca de los G-PRPs para inducir la diferenciación de las *MSCs* embebidas) o *MCondro* (para estudiar sus efectos como promotores de la condrogénesis). El cultivo se mantuvo durante un total de 21 días (Tabla 9), renovando los medios cada 3 días.

Tabla 9: Composición de los geles y condiciones de cultivo para la determinación de la concentración de plaquetas óptima.

Matriz	Densidad plaquetaria (plaquetas/ μ l)	Tipo celular	Densidad celular (células/ml)	Medio de cultivo	Duración
PRP	0,75·10 ⁵ 1,5·10 ⁵ 3·10 ⁵	<i>BM-MSCs</i>	6·10 ⁶	<i>DMEM</i> 10% (Inducción) MCondro (Promoción)	21 días
Ag	-				

Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se retiraron los medios y se lavaron los geles con SS. Uno de los duplicados de cada tipo de gel se procesó para la realización de estudios moleculares. Se cuantificó la expresión de los genes COLII, ACAN y *SOX9*. También se estudió la hipertrofia a través del gen COLI. El otro duplicado se procesó para la realización de tinciones histológicas (H-E, TM, AT, AA-PAS, SO y SO-FG) e inmunohistoquímicas (IHQ) (COLII y COLI).

4.2 Diferenciación osteogénica

Para estudiar la diferenciación osteogénica, se sembraron 2·10⁵ c/p en placas de 6 pocillos y 3·10⁴ c/p en *chamber-slides* de 8 pocillos en medio de expansión. Tras 24 h, se estimularon con los medios apropiados y se mantuvo el cultivo durante 14 días, renovando los medios cada 3 días. Este estudio se repitió en n=4 donantes diferentes.

Para el estudio de la **inducción osteogénica**, los estímulos fueron *DMEM* 10% (C-), MOsteo (C+) y *DMEM* 0% + 10% de L-PRP0,75-3 (ver también Tabla 10). El MOsteo utilizado fue *hMSC Osteogenic Differentiation BulletKit™ Medium* (Lonza).

Tabla 10: Medios utilizados para los estudios de inducción osteogénica en formato 2D.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (<i>DMEM</i> 10%)	<i>BM-MSCs</i>	2·10 ⁵ (placas 6 pocillos)	14 días
C+ (MOsteo)		3·10 ⁴ (<i>chamber-slides</i> 8 pocillos)	
<i>DMEM</i> 0% + 10% L-PRP0,75-3			

Para el estudio de la **promoción osteogénica**, los estímulos fueron *DMEM* 10% (C-), MOsteo (C+) y MOsteo + 10% de L-PRP0,75-3 (ver también Tabla 11).

Tabla 11: Medios utilizados para los estudios de promoción osteogénica en formato 2D.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (DMEM 10%)	BM-MSCs	2·10 ⁵ (placas 6 pocillos)	14 días
C+ (MOsteo)		3·10 ⁴ (<i>chamber-slides</i> 8 pocillos)	
MOsteo + 10% L-PRP0,75-3			

Una vez finalizado el periodo de diferenciación, las células sembradas para análisis de biología molecular se lavaron con SS y se continuó con el protocolo descrito en el apartado 7.1.1. Para evaluar la osteogénesis se cuantificó la expresión de los genes *RUNX2* y fosfatasa alcalina (*alkaline phosphatase, ALP*). Además, las células sembradas en *chamber-slides* se procesaron para su tinción con rojo alizarina (*Merck Millipore*), tal y como se describe en el apartado 11.9.

4.3 Diferenciación adipogénica

La adipogénesis se estudió de manera similar a la osteogénesis, sembrando las células de n=5 donantes en placas de 6 pocillos (a razón de 2·10⁵ c/p) y en *chamber-slides* (a razón de 3·10⁴ c/p) en medio de expansión. Tras 24 h, se estimularon con los medios apropiados y se mantuvo el cultivo durante 14 días, renovando los medios cada 3 días.

Para el estudio de la **inducción adipogénica**, los estímulos fueron DMEM 10% (C-), MAdipo (C+) y DMEM 0% + 10% de L-PRP0,75-3 (ver también Tabla 12). El MAdipo utilizado fue *hMSC Adipogenic Differentiation BulletKit™ Medium* (Lonza).

Tabla 12: Medios utilizados para los estudios de inducción adipogénica en formato 2D.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (DMEM 10%)	BM-MSCs	2·10 ⁵ (placas 6 pocillos)	14 días
C+ (MAdipo)		3·10 ⁴ (<i>chamber-slides</i> 8 pocillos)	
DMEM 0% + 10% L-PRP0,75-3			

Para el estudio de la **promoción adipogénica**, los estímulos fueron DMEM 10% (C-), MAdipo (C+) y MAdipo + 10% L-PRP0,75-3 (Tabla 13).

Tabla 13: Medios utilizados para los estudios de promoción adipogénica en formato 2D.

Condiciones	Tipo celular	Densidad celular	Duración
C- (DMEM 10%)	BM-MSCs	2·10 ⁵ (placas 6 pocillos)	14 días
C+ (MAdipo)		3·10 ⁴ (<i>chamber-slides</i> 8 pocillos)	
MAdipo + 10% L-PRP0,75-3			

Una vez finalizado el tiempo de cultivo, las células destinadas a la extracción de ARN se lavaron con SS y se siguió el protocolo descrito en el apartado 7.1.1. Para evaluar la adipogénesis se midió la expresión de los genes proteína 4 de unión a ácidos grasos (*fatty acid binding protein 4, FABP4*) y receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ*), mientras que las células sembradas en *chamber-slides* se procesaron para su tinción con *Oil-Red-O* (*Sigma-Aldrich*), según se describe en el apartado 11.10.

5 ESTUDIOS DE POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO

Se estudió el potencial del PRP estandarizado como fármaco anticatabólico, antioxidante y/o antiinflamatorio para tratar la OA. Para ello se empleó un modelo *in vitro* en el que se recrearon las condiciones inflamatorias de la OA estimulando condrocitos o cartílago OA con IL-1 β . Los condrocitos OA ($n \geq 3$ donantes) se sembraron en medio de expansión en placas de 6 pocillos, a razón de $1,5 \cdot 10^5$ c/p o de $3 \cdot 10^5$ c/p, para los estudios de expresión génica y expresión proteica, respectivamente. También se sembraron $5 \cdot 10^4$ c/p en placas de 96 pocillos para estudios de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*), y $3 \cdot 10^4$ c/p en *chamber-slides* de 8 pocillos para los estudios de inmunocitoquímica (ICQ). En todos los casos, los estímulos se aplicaron 24 h después de la siembra. Dichos estímulos incluyeron un control no inflamatorio (Basal, cultivado en DMEM 10%), un control positivo de inflamación (IL-1 β , cultivado en DMEM 0% suplementado con 5 ng/ml IL-1 β) y ocho condiciones de co-estimulación con 5 ng/ml de IL-1 β y 10% (v/v) L-PRP0-15. El tiempo de estimulación fue de 48 h.

Para estudiar si los L-PRPs podían ejercer efectos protectores en la MEC del cartílago, se realizaron experimentos en los que se introdujeron discos de cartílago de $n=5$ donantes en medio de cultivo y se estimularon con IL-1 β y lisados seleccionados. Los explantes de cartílago se incubaron en medio de expansión durante 24 h para su estabilización. Se estimularon entonces con IL-1 β y los lisados (10% v/v: L-PRP0,75 o L-PRP15) y se incubaron durante 21 días en placas de 48 pocillos en 0,5 ml de medio (1 explante/pocillo), renovando los medios cada 3 días.

En los estudios de expresión génica se evaluaron genes marcadores de inflamación (COX-2, PTGES, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α e IL-1Ra), de estrés oxidativo (NOS2) y de catabolismo de matriz cartilaginosa (MMP-13). Los ensayos de detección y cuantificación de proteínas

se dirigieron, mediante *WB*, a *NOS2* y *COX-2*; mediante *ELISA*, a *IL-6*, *IL-8*, *MMP-13*, *TNF α* , prostaglandina *E₂* (*PGE₂*) e *IL-1Ra*; y mediante *ICQ*, a *NOS2*, *COX-2* y *MMP-13*. En los estudios con explantes de cartílago se realizaron las tinciones histológicas *SO* y *AT* para estudiar la degradación de la MEC, junto con tinciones *IHQ* para detectar las enzimas degradadoras *MMP-3* y *MMP-13*.

6 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular de condrocitos y *BM-MSCs* se evaluó mediante el ensayo cuantitativo *AlamarBlue*[®] (*Invitrogen-ThermoFisher Scientific*). Este método se basa en un indicador colorimétrico, no citotóxico, permeable a las células e hidrosoluble que cambia de color en respuesta a una reacción química de reducción. Es decir, la respiración de las células en crecimiento modifica el estado de oxidación-reducción del medio en el que se encuentran y del indicador, que pasa de un estado oxidado (resazurina, azul) a un estado reducido (resofurina, rojo).

Para este estudio, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos, a razón de $2,5 \cdot 10^4$ c/p, en medio de expansión y, tras 24 h, se estimularon con un 10% v/v de L-PRP_{0,75-15} y se incubaron a 37°C durante 72 h. Pasado este tiempo, y en condiciones de oscuridad, se añadió un 10% (v/v) de *AlamarBlue*[®] a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 4 h. Finalmente, se cuantificó la absorbancia a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 600 nm, en el espectrofotómetro para placas *NanoQuant Infinite*[®] *M200* (*Tecan Ibérica Instrumentación S.L.*, Barcelona, España). Cada condición se ensayó por duplicado, empleándose un total de n=3 donantes de condrocitos y n=4 donantes de *BM-MSCs*. Los resultados se expresaron como porcentaje de *AlamarBlue*[®] reducido, considerando los valores obtenidos en la condición Basal como el 100% (normalizado como 1).

7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

7.1 Extracción de ARN

7.1.1 Células

Para extraer el ARN de las células tras los respectivos tiempos de estimulación, éstas se lavaron con SS y se añadió 1 ml de *TRIzol*[™] (*ThermoFisher*). Tras romper las membranas celulares con ayuda de la pipeta, se trasladó el contenido de cada pocillo a un tubo

Eppendorf® y se incubó 5 min a temperatura ambiente para permitir la correcta separación de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo (*Sigma-Aldrich*) y se mezclaron por agitación para realizar una separación trifásica de ARN, ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas. Tras una centrifugación de 15 min a 12.000 \times g y 4°C, se recuperó la fase acuosa superior (ARN) a un nuevo tubo *Eppendorf*® de fondo cónico de 1,5 ml, cuidando de no alterar la fase blanca intermedia (ADN) ni la fase rosada inferior (proteínas). Se prosiguió añadiendo 1 μ l de glicógeno (*Sigma-Aldrich*) y 0,5 ml de isopropanol (*Sigma-Aldrich*) para precipitar el ARN mediante una incubación de 10 min a temperatura ambiente y una centrifugación de 10 min a 12.000 \times g y 4°C. Se descartó la fase isopropílica y se lavó el ARN total con etanol al 75% y etanol absoluto (*Sigma-Aldrich*), de forma consecutiva. Una vez eliminados los restos de alcohol por evaporación, se resuspendió el precipitado en 10 μ l de agua.

7.1.2 Pellets

Para la extracción de ARN, tres *pellets* de cada condición ensayada se introdujeron en un tubo *Eppendorf*® de fondo redondo de 2,0 ml, se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline, PBS*) y se conservaron a -80°C. Se introdujeron dos esferas de circonio de 5 mm y dos de 2 mm de diámetro en cada tubo, y éstos se introdujeron en el soporte de un *Mixer Mill MM200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania)*. El conjunto se congeló en nitrógeno líquido y se introdujo en el tambor del molino para desintegrar las muestras. Se realizaron 3 ciclos de 90 s con una frecuencia de agitación de 25 hercios, congelando de nuevo en nitrógeno líquido entre ciclos.

Una vez finalizada la disgregación, se añadió 1 ml de *TRIzol*™ a cada tubo y se incubó 20 min en agitación circular a temperatura ambiente. A continuación, se recogió el homogenizado a un nuevo tubo, separándolo de las esferas de circonio, se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se hizo una separación trifásica de ARN, ADN y proteínas. Tras una centrifugación de 15 min a 12.000 \times g y 4°C, se recuperó la fase acuosa superior (ARN) a un nuevo tubo *Eppendorf*® de fondo cónico de 1,5 ml. Se añadió 1 μ l de glicógeno y 0,5 ml de isopropanol para precipitar el ARN mediante una incubación de 48 h a -20°C y se centrifugó 10 min a 12.000 \times g y 4°C. Después de descartar el sobrenadante y lavar el ARN total con etanol al 75% y etanol absoluto, de forma consecutiva, se dejaron evaporar los restos de alcohol y se resuspendió el precipitado en 10 μ l de agua.

7.1.3 Geles

En el caso de los G-PRPs con *BM-MSCs*, el procesado para la extracción de ARN se inició lavándolos con SS y extrayéndolos de la placa de cultivo con ayuda de unas pinzas de microcirugía. A continuación, se añadió 1 ml de *TRIzol*TM y se procedió a su disgregación con el homogenizador *IKA T10 basic Ultra-Turrax*[®] (*ThermoFisher*), manteniéndolos siempre en hielo para evitar la degradación del ARN. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se hizo una separación trifásica de ARN, ADN y proteínas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.1.1.

Por otra parte, en el caso de los geles de Ag con *BM-MSCs*, el procesado para la extracción de ARN se inició de la misma forma que el de los geles de PRP. Tras la homogeneización con *Ultra-Turrax*[®] y la separación trifásica, se añadió 1/2 volumen de etanol absoluto a la fase acuosa superior de ARN y se realizó un protocolo de extracción con *RNeasy*[®] *Mini Kit* (*Qiagen*, Madrid, España). La mezcla se transfirió a una columna *RNeasy*[®] y se centrifugó 15 s a 8.000 \times g, quedando el ARN retenido en el filtro de la columna. Se descartó el eluido y se añadieron 0,7 ml de tampón RW1, centrifugando nuevamente 15 s a 8.000 \times g para lavar la columna. Se desechó el eluido y se lavó con 0,5 ml de tampón RPE, centrifugando 15 s a 8.000 \times g y desechando el eluido dos veces, tras lo cual se centrifugó 1 min a máxima velocidad para secar la membrana y se colocó la columna en un *Eppendorf*[®] de 1,5 ml. Se añadieron 10 μ l de agua y se realizó una incubación de 10 min en hielo para resuspender el ARN, que se eluyó mediante una centrifugación de 1 min a 8.000 \times g. Para optimizar la recuperación de ARN, el eluido se introdujo nuevamente en la columna y se repitió la incubación en hielo y la centrifugación.

7.2 Cuantificación y análisis de la calidad del ARN

Se comprobó la pureza y concentración del ARN con un espectrofotómetro *NanoDrop*TM *1.000* (*Thermo Scientific*) y su integridad mediante un bioanalizador *Agilent 2.100* (*Agilent Technologies*, Madrid, España). Con el espectrofotómetro se midieron las absorbancias a 280, 260 y 230 nm para valorar la concentración de ARN (A260), la contaminación proteica (razón A260/A280) y la contaminación con sales y/o alcoholes (razón A260/A230). Con el bioanalizador se valoró la integridad del ARN obtenido y se confirmó su concentración, en base a la definición de las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades ribosomales 5S, 18S y 28S, y a la intensidad de la fluorescencia emitida, respectivamente.

7.3 Síntesis de ADN complementario

Una vez obtenido y analizado el ARN total, se realizó la retrotranscripción del ARNm a ADN complementario (ADNc). Para ello, 500 ng de ARN total fueron tratados previamente con 0,5 unidades (U) de *DNasa I* (Roche) y 0,5 µl de tampón con MgCl₂ en un volumen final de 8 µl, que se alcanzó añadiendo el volumen necesario de agua. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C y luego se inactivó el enzima añadiendo 0,5 µl de una solución de EDTA, incubando 10 min a 65°C.

Finalizado el tratamiento con *DNasa I*, se añadieron 1,5 µl de *SuperScript® VILO™* (Thermo Scientific) a cada tubo para realizar la transcripción reversa del ARNm. La mezcla se incubó 10 min a 25°C y 90 min a 42°C, forzando la terminación con una incubación de 5 min a 85°C. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la realización de los análisis de expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (*quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR*).

7.4 Cuantificación de la expresión génica mediante *qRT-PCR*

El análisis de expresión génica mediante *qRT-PCR* se realizó cargando el ADNc en una placa de 96 pocillos junto con los cebadores y las sondas *TaqMan®* específicos que se muestran en la Tabla 14. Los cebadores utilizados se diseñaron utilizando la aplicación de Roche para diseño de ensayos (www.universalprobelibrary.com). Cada reacción contenía 2 µl de ADNc, 5 µl de *LightCycler® 480 Probes Master*, 0,35 µl de cebadores directo y reverso, y sonda en una concentración de 200 nM. En el termociclador *LightCycler® 480 System* (Roche) se utilizó un programa de amplificación consistente en un ciclo de preincubación de 10 min a 95°C; hasta 45 ciclos de amplificación de 10 s a 95°C, 30 s a 60°C, y 1 s a 72°C; y un ciclo de atemperación de 20 s a 40°C.

Para analizar la expresión de los genes de interés indicados para cada estudio particular, se realizó en primer lugar un análisis de estabilidad de expresión de una batería de seis genes de referencia con muestras de ADNc de entre cinco y diez de las condiciones ensayadas en cada estudio. Los genes valorados fueron hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HPRT*), proteína ribosomal L13A (*ribosomal protein L13A, RPL13A*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH*), proteína de unión a la caja TATA

(*TATA box binding protein, TBP*), beta-actina (β -ACT) y porfobilinógeno desaminasa (PBGD) (Tabla 15).

Para determinar los genes de expresiones más estables se utilizó el algoritmo *geNORM* (Vandesompele *et al.*, 2002), y los genes seleccionados (número mínimo de dos, indicados en la Tabla 16) se emplearon para normalizar los niveles relativos de expresión de todos los genes de interés en cada caso particular en el programa *qBase+* (*Biogazelle NV*, Gent, Bélgica, www.biogazelle.com/qbaseplus).

Tabla 14: Listado de cebadores y sondas utilizados en los experimentos de *qRT-PCR*.

Gen	Sec. Ref.	Cebador directo (5' – 3')	Cebador reverso (5' – 3')	UPL	nt
ACAN	NM_001135.3	CGGTCTACCTCTACCTAACCA	GAGAAGGAACCGCTGAAATG	#38	93
ALP	NM_000478.5	CCTGCCTTACTAACTCCTTAGTGC	CGTTGGTGTTGAGCTTCTGA	#37	114
COLI	NM_000088.3	CTGGCCCCATTGGTAATGT	ACCAGGGAAACCAGTAGCAC	#1	86
COLX	NM_000493.3	CACCTTCTGCACTGCTCATC	GGCAGCATATTCTCAGATGGA	#6	91
COLII	NM_001844.4	TGGTGCTAATGGCGAGAAG	CCCAGTCTCTCCACGTTTCC	#4	94
COX-2	NM_000963.2	CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	#23	96
FABP4	NM_001442.2	CCACCATAAAGAGAAAACGAGAG	GTGGAAGTACGCCTTTCAT	#31	70
IL-1 β	NM_000576.2	TACCTGTCTGCGTGTTGAA	TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT	#78	76
IL-1Ra	NM_173841.2	CCCTCCCCATGGCTTTAG	TGAGTCAGCATTGTCTTACCT	#10	77
IL-6	NM_000600.3	GATGAGTACAAAAGTCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTCTGT	#40	130
IL-8	NM_000584.3	GAGCACTCCATAAGGCACAAA	ATGGTTCCTCCGGTGGT	#72	90
MMP-13	NM_002427.2	CCAGTCTCCGAGGAGAAACA	AAAAACAGCTCCGCATCAAC	#73	85
NANOG	NM_024865.3	GAGATGCCTCACACGGAGAC	AGGGCTGTCTGAATAAGCA	#69	70
NOS2	NM_000625.4	GCTGCCAAGCTGAAATTGA	GATAGCGCTTCTGGCTCTTG	#68	73
POU5F1	NM_001285986.1	TGAAGAACAAGTGCCAAATAGC	GCGGCTATACAAAAGTGGACAA	#42	75
PPAR γ	NM_001330615.1	TGAGAGGGGCCAAGCAAAG	ATAAATCACACGGCGCTCTT	#13	104
PTGES	NM_004878.4	CTGGGATGACAGGCATGAAT	GACTCACATGGGAGCCTTTT	#83	69
RUNX2	NM_001024630.3	GTGCCTAGGCGCATTTCA	TGACTGGCGGGGTGTAAG	#41	104
SOX9	NM_000346.3	GTACCCGCACTTGACAAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTC	#61	72
TNF α	NM_000594.2	GCAACAGGACATTGAGCAAG	TGGACTTGAACCATGGTAGT	#29	123

Sec. Ref.: secuencia de referencia, UPL: sonda *Universal Probe Library* (librería universal de sondas), nt: nucleótidos amplificados.

Tabla 15: Listado de cebadores y sondas empleados en las pruebas de estabilidad de expresión de genes de referencia.

Gen	Sec. Ref.	Cebador directo (5' – 3')	Cebador reverso (5' – 3')	UPL	nt
18S	NR_146119.1	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGTCCACCAACTAAGAACG	#77	110
β -ACT	NM_001101.3	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	GGATGCCACAGGACTCCA	#11	135
GAPDH	NM_002046.4	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAAATCC	#60	66
HPRT	NM_000194.2	TGATAGATCCATTCTATGACTG TAGA	CAAGACATTCTTTCCAGTTAAA GTTG	#22	127
PBGD	NM_000190.2	AGCTATGAAGGATGGGCAAC	TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA	#25	70
RPL13A	NM_012423.2	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATAACCTC	#28	95
TBP	NM_003194.4	GCCCATAGTGATCTTTGCAGT	CGCTGGAACCTCGTCTACTA	#67	139

Tabla 16: Genes de referencia empleados en los distintos experimentos.

Experimento	Genes de referencia empleados
Adipogénesis	<i>GAPDH, HPRT</i>
Osteogénesis	<i>HPRT, RPL13A</i>
Condrogénesis en <i>pellet</i>	<i>RPL13A, TBP</i>
Condrogénesis en gel	<i>HPRT, PBGD</i>
Inflamación	β -ACT, <i>GAPDH</i>

8 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA Y LIPÍDICA MEDIANTE ELISA

8.1 Cuantificación proteica de IL-6, IL-8, MMP-13, TNF α e IL-1Ra

Los sobrenadantes recuperados tras la co-estimulación de condrocitos con IL-1 β y los distintos L-PRPs durante 48 h se emplearon para cuantificar la cantidad secretada de IL-6, IL-8, MMP-13 y TNF α mediante kits comerciales de ELISA. También se cuantificó IL-1Ra en los lisados y medios suplementados. En cada caso se siguieron las instrucciones especificadas por el fabricante, que se explican brevemente a continuación.

La cantidad secretada de IL-6 y MMP-13 se cuantificó con los kits *Human IL-6 DuoSet® ELISA* y *Human Total MMP-13 DuoSet® ELISA* (R&D Systems – Bio-Techne, Lille, Francia). En ambos casos, se recubrió el fondo de los pocillos de una placa de 96 pocillos con el anticuerpo de captura frente a IL-6 o MMP-13. Posteriormente, se añadieron los sobrenadantes a evaluar y los estándares para la elaboración de la curva estándar. La cantidad de proteína unida al anticuerpo se determinó mediante el sistema estreptavidina-biotina y la reacción colorimétrica peroxidasa-sustrato, determinando la densidad óptica a 450 nm en el lector *NanoQuant Infinite® M200* y aplicando una corrección a 570 nm.

La cantidad secretada de IL-8 y la cantidad de IL-1Ra presente en los distintos lisados se cuantificó con los kits *Human IL-8/CXCL8 Quantikine® ELISA* y *Human IL-1ra/IL-1F3 Quantikine® ELISA* (R&D Systems). En este caso, los kits incluyen una placa de 96 pocillos pre-tapizada con el anticuerpo de captura frente a IL-8 o IL-1Ra, por lo que se añadieron los sobrenadantes, medios o L-PRPs a evaluar y los estándares. La cantidad de proteína unida al anticuerpo se determinó mediante la reacción colorimétrica peroxidasa-sustrato, midiendo la densidad óptica a 450 nm con corrección a 570 nm.

En el caso de TNF α , la determinación se hizo con un kit *Magnetic Luminex® Assay* (R&D Systems), que incluye unas micropartículas conjugadas con el anticuerpo de detección de TNF α . Los sobrenadantes y estándares se incubaron con las micropartículas y se empleó un sistema de detección biotina-estreptavidina-ficoeritrina para cuantificar la cantidad de proteína unida al anticuerpo en el analizador *Luminex® MAGPIX* (R&D Systems).

En todos los casos, la curva estándar se ajustó a una curva de regresión logística de cuatro parámetros mediante el programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, EE. UU.), excepto para TNF α , que requirió una curva de regresión logística de cinco parámetros. Los resultados se expresaron como ng/ml de cada una de las proteínas de interés.

8.2 Cuantificación fosfolipídica de PGE₂

La producción de PGE₂ se cuantificó mediante un *ELISA* competitivo específico (*Prostaglandin E₂ ELISA Kit – Monoclonal*, Cayman Chemical, Michigan, EE. UU.), con un rango de 7,8–1.000 pg/ml y una sensibilidad de 15 pg/ml. Los sobrenadantes recuperados tras la co-estimulación de condrocitos con IL-1 β y los distintos L-PRPs durante 48 h se emplearon para cuantificar la cantidad secretada de PGE₂. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, que se basa en la competición entre PGE₂ y un conjugado PGE₂-acetilcolinesterasa (trazador) por una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal anti-PGE₂. Dado que la concentración del trazador se mantiene constante en todos los pocillos y es la concentración de PGE₂ la que varía, la cantidad de trazador que es capaz de unirse al anticuerpo en un pocillo será inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ en dicho pocillo. La densidad óptica resultante de esta reacción fue analizada a 612 nm y los datos obtenidos se compararon con una curva estándar realizada con reactivos propios del kit. La curva estándar se ajustó a una curva de regresión logística de cuatro parámetros con el programa *GraphPad Prism* y los resultados se expresaron como ng/ml.

9 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

La expresión de las proteínas *NOS2* y *COX-2* en los condrocitos co-estimulados con IL-1 β y los distintos L-PRPs durante 48 h se analizó mediante esta aproximación. A continuación, se detallan los pasos seguidos para realizar esta técnica.

9.1 Extracción y cuantificación de proteínas celulares totales

Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con SS y las proteínas totales se obtuvieron mediante disrupción mecánica en un tampón de lisis (ver Tabla 17). A continuación, las muestras se hirvieron 5 min a 100°C, se cuantificaron con *Nanodrop® 1.000* a través de A280 y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Tabla 17: Tampones y colorantes empleados en la técnica de WB.

Tampón	Composición
Lisis	Tris-HCl 0,2 M a pH 6,8, glicerol al 20%, SDS al 2%, PMSF 0,1 mM al 1%, cóctel comercial de inhibición de proteasas al 1%
Carga (5X)	Tris-HCl 0,2 M a pH 6,8, glicerol al 50%, SDS al 10%, β-mercaptoetanol al 10%, azul de bromofenol al 0,1% (Bio-Rad, California, EE.UU.)
Electroforesis	Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%
Transferencia	Tris-base 50 mM, glicina 40 mM, SDS al 0,57%, metanol al 10% (VWR Chemicals, Llinars del Vallés, España)
Lavado	Tris-base 20 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween®-20 al 0,05%
Bloqueo	Leche desnatada al 5% en tampón de lavado
Azul de bromofenol	Azul de bromofenol 15 mM, Tris-base 49 mM
Rojo Ponceau	Ponceau al 0,1%, ácido acético al 5%

Tris: tris(hidroximetil)aminometano, SDS: dodecil sulfato sódico (*sodium dodecil sulphate*), PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*). Todos los reactivos sin casa comercial especificada proceden de Sigma-Aldrich.

9.2 Separación electroforética SDS-PAGE

La separación de las proteínas extraídas se realizó en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (*sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) de 1,5 mm de grosor. Se empleó un gel concentrador de acrilamida al 4% y, a continuación, un gel separador al 8% (ver Tabla 18). Se cargaron 20 µg de cada extracto proteico en una relación 1:4 con un tampón de carga (ver Tabla 17). Previamente, esta mezcla se hirvió 5 min a 100°C y se introdujo en hielo para evitar la renaturalización proteica. La electroforesis se desarrolló a 120 V durante 90 min usando el sistema *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Bio-Rad) y el tampón de electroforesis descrito en la Tabla 17.

Tabla 18: Composición de los geles empleados en la separación electroforética SDS-PAGE.

Componente	Casa comercial	Gel concentrador (4%)	Gel separador (8%)
Acrilamida/bisacrilamida 30:2,6	Bio-Rad	400 µl	2,66 ml
H ₂ O	-	2,2 ml	5,34 ml
Tris-HCl 2M, pH 8,8	Sigma-Aldrich	-	1,88 ml
Tris-HCl 1M, pH 6,8	Sigma-Aldrich	375 µl	-
SDS al 10%	Sigma-Aldrich	30 µl	100 µl
PSA al 20% (Bio-Rad)	Sigma-Aldrich	12 µl	25 µl
TEMED	Sigma-Aldrich	3 µl	12 µl

PSA: persulfato amónico, TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina. Todos los reactivos sin casa comercial especificada proceden de Sigma-Aldrich.

9.3 Transferencia a membrana

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride, PVDF*) (*Merck-Millipore*) de aproximadamente el mismo tamaño que el gel. Previamente, las membranas se equilibraron mediante incubaciones sucesivas de 5 min en metanol, agua y nuevamente metanol. A continuación, la membrana, el gel resultante de la electroforesis y dos esponjas absorbentes se sumergieron durante 15 min a 4°C en tampón de transferencia (ver Tabla 17). La transferencia tuvo lugar a 20 V durante 60 min empleando un *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (*Bio-Rad*). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (*Sigma-Aldrich*) para confirmar que la transferencia se había desarrollado correctamente y se lavó con tampón de lavado (ver Tabla 17) para realizar la inmunodetección de las proteínas de interés.

9.4 Inmunodetección

Para evitar uniones inespecíficas, la membrana se trató con tampón de bloqueo (ver Tabla 17) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación continua. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo frente a la proteína de interés, el anticuerpo primario (Tabla 19), en tampón de bloqueo a 4°C y en agitación circular durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, y tras lavar la membrana (cinco lavados de 6 min), se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario es un anticuerpo contra las inmunoglobulinas IgG del animal en el que se desarrolló el anticuerpo primario y conjugado con la enzima peroxidasa (Tabla 19). De nuevo, se realizaron cinco lavados de 6 min, y finalmente se detectó la banda proteica correspondiente a la proteína de interés empleando el sustrato quimioluminiscente *Luminata™ Classico Western HRP Substrate* (*Merck-Millipore*). La reacción se basa en que la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario unido a la membrana es capaz de transformar el sustrato en un compuesto que emite luz y que, por lo tanto, puede ser visualizado empleando una cámara de revelado (*Amersham™ Imager 600, GE Healthcare, Madrid, España*). En todos los casos, se utilizó la alfa tubulina (α -tub) como control de carga, ya que su expresión en la célula es alta y no se encuentra alterada por ninguno de los estímulos empleados.

Tabla 19: Listado de anticuerpos y diluciones empleados en los análisis de expresión proteica mediante WB.

Proteína	Animal	Isotipo	Casa comercial	Dilución
COX-2	Ratón	IgG2B Monoclonal	R&D Systems®	1:250
NOS2	Ratón	IgG1 Monoclonal	R&D Systems®	1:100
α -tub	Ratón	IgG1 Monoclonal	Sigma-Aldrich®	1:3.000
Anti-ratón	Oveja	IgG Monoclonal	GE Healthcare®	1:500 (NOS2, COX-2) 1:3.000 (α -tub)

9.5 Cuantificación y análisis de los datos

Para cuantificar la cantidad de proteína detectada mediante esta técnica, se calculó la intensidad de la señal emitida por cada banda mediante el programa informático *ImageQuant 5.2* (Molecular Dynamics, California, EE. UU.). Este programa asigna un valor arbitrario de señal de quimioluminiscencia a una región de la imagen seleccionada por el usuario, en la que se encuentra la banda de la proteína de interés. Posteriormente, se corrigieron los valores obtenidos dividiendo este valor por el adquirido para su control de carga, la α -tub, en el mismo experimento. Finalmente, los datos se expresaron como el número de veces la expresión proteica respecto al control positivo (estimulación solo con IL-1 β), designado como 1.

10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

10.1 Tinción inmunocitoquímica

Se analizó la expresión proteica intracelular de NOS2, COX-2 y MMP-13 empleando el sistema de detección *Dako REAL™ EnVision Peroxidase/DAB+* (Dako, Glostrup, Dinamarca). Los condrocitos sembrados en *chamber-slides* de 8 pocillos y co-estimulados durante 48 h con IL-1 β y los distintos L-PRPs, se lavaron dos veces con PBS a pH 7,6 y se fijaron según se describe en la Tabla 20.

Tras un lavado con PBS, se realizó un pretratamiento para la desenmascaración epítipo-antigénica, según lo indicado en la Tabla 20, y se lavó de nuevo con PBS. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió utilizando el inhibidor comercial *Dako REAL™*

Peroxidase-Blocking Solution (Dako) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un nuevo lavado con *PBS* y se incubaron todos los pocillos, a excepción del control negativo, con el anticuerpo primario durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min con *PBS* y se incubaron todos los pocillos, incluido el control negativo, con el anticuerpo secundario incluido en el kit de detección durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, y tras tres lavados de 10 min con *PBS*, se añadió el cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB; 1/50), que actúa como sustrato de la peroxidasa para formar un producto de color marrón que sirve como indicador de la cantidad de anticuerpo unido y, por tanto, de la cantidad de proteína de interés en la célula. Transcurridos 3-5 min, la reacción se detuvo con agua destilada, se desmontaron las *chamber-slides* y se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris (*Panreac*) durante 1 min, para localizar las reacciones proteína-anticuerpo dentro del contexto celular. Tras un aclarado en agua corriente y agua destilada, se realizó la deshidratación de las preparaciones en alcoholes de gradación creciente (70°, 96° y 100°) y el aclarado en xileno (*Panreac AppliChem*, Barcelona, España). Los portaobjetos se montaron con la resina sintética *DPX* (*Leica Biosystems*, Barcelona, España) y un cubreobjetos. Las células se visualizaron en el microscopio *Olympus BX61*, acoplado a una cámara digital *Olympus DP70* (*Olympus Iberia S.A.U.*, Barcelona, España).

Tabla 20: Listado de anticuerpos empleados en las tinciones IHQ e ICQ.

Proteína	Isotipo*	Casa comercial	Fijación IHQ	Fijación ICQ	Pretratamiento	Dilución IHQ	Dilución ICQ
ACAN	IgG	<i>Abcam</i> ®	F 3,7-4%	-	Condroitinasa ABC pH 6,0	1:50	-
COLI	IgG1	<i>Abcam</i> ®	F 3,7-4%	-	Proteinasa K	1:100	-
COLII	IgG1κ	<i>Abcam</i> ®	F 3,7-4%	-	Condroitinasa ABC pH 8,0	1:25	-
COX-2	IgG2B	<i>R&D Systems</i> ®	-	Acetona 4°C	TRITON® X-100 0,1%	-	1:50
<i>NOS2</i>	IgG1	<i>R&D Systems</i> ®	-	ParaF 4% 4°C	TRITON® X-100 0,1%	-	1:200
<i>MMP-3</i>	IgG2B	<i>Merck-Millipore</i> ®	F 3,7-4%	-	Condroitinasa ABC pH 6,8	1:25	-
<i>MMP-13</i>	IgG1κ	<i>ThermoFisher</i> ®	F 3,7-4%	ParaF 4% 4°C	Proteinasa K	1:50	1:40

* Todos son anticuerpos monoclonales de ratón. F: formaldehído, ParaF: paraformaldehído.

10.2 Tinción inmunohistoquímica

En los G-PRPs con *BM-MSCs* y los explantes de cartílago co-estimulados con IL-1 β y los distintos L-PRPs, ambos previamente fijados e incluidos en parafina como se describe en el apartado 11.1, se analizó la presencia de las proteínas COLII, COLI (geles), *MMP-3* y *MMP-13* (explantes) empleando el sistema de detección *Dako REAL™ EnVision Peroxidase/DAB+* (*Dako*, Glostrup, Dinamarca).

El protocolo se inició una vez rehidratadas las muestras. A continuación, se realizó un pretratamiento enzimático para la desenmascaración epítipo-antigénica (Tabla 20) y se lavó con *PBS*. Tras este lavado, se inhibió la peroxidasa endógena con la solución de bloqueo y se continuó el protocolo ya descrito en el apartado 10.1.

11 ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS

11.1 Procesado histológico

Los *pellets*, los G-PRPs+*BM-MSCs* y los discos de cartílago se fijaron en formaldehído al 3,7-4% (*Panreac Química S.A.U.*, Barcelona, España) durante 24 h, se deshidrataron con alcoholes de gradaciones crecientes (70°, 96° y absoluto) y se incluyeron en parafina. Este proceso se realizó en el inclusor automático *Spin Tissue Processor STP 120* (Especialidades Médicas Myr S.L., Tarragona, España) y luego se realizó la formación de los bloques en un centro modular de inclusión *Leica EG1150* (*Leica Microsystems S.L.U.*, Barcelona, España). Para realizar las tinciones se obtuvieron secciones de 4 μ m con un microtomo *Leica RM2155* (*Leica Microsystems*), se desparafinaron (10 min a 37°C), se aclararon con xileno (10 min) y se rehidrataron en una secuencia de alcoholes decrecientes (absoluto, 10 min; 96°, 10 min; 70°, 10 min) seguida de 10 min en agua destilada. Una vez que las secciones estuvieron rehidratadas se procedió con los protocolos de las distintas tinciones.

11.2 Procesado citológico

Las *chamber-slides* destinadas a las tinciones *Oil-Red-O* y rojo alizarina se lavaron dos veces con *PBS* frío para eliminar los restos de medio de cultivo. Seguidamente, se fijaron con paraformaldehído al 3,7-4% en *PBS* durante 10 min a 4°C y se siguieron los protocolos de tinción descritos en los apartados 11.9 y 11.10.

11.3 Hematoxilina-eosina

La tinción H-E permite valorar la estructura y morfología general de los tejidos. La eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras del citoplasma, y la hematoxilina es un colorante básico que tiñe el núcleo celular.

Reactivos:

- Eosina (*Panreac*) al 0,7% en agua destilada.
- Hematoxilina de Harris.

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 5 min. Después se realizó un lavado con agua destilada de 5 min y en agua corriente. Tras una inmersión en eosina de 1 min, se deshidrataron con pases (lavados breves) en alcoholes (96° y absoluto) y un lavado en xileno (10 min) y se montaron con *DPX*.

11.4 Tricómico de Masson

Las coloraciones tricrómicas tiñen las fibras de COL, que tienen afinidad por los colorantes ácidos debido a su riqueza en grupos catiónicos.

Reactivos:

- Solución de alumbre férrico: Sulfato amónico férrico (*Merck*) al 5% en agua destilada.
- Solución de hematoxilina de Weigert: Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales.
 - o Solución A: 1 g de hematoxilina férrica (*Panreac*) en 100 ml de alcohol absoluto.
 - o Solución B: 4 ml de cloruro férrico (*Merck*) al 20% y 1 ml de HCl (*VWR Chemicals*) en 95 ml de agua destilada.
- Solución de ácido pícrico: Ácido pícrico (*Sigma-Aldrich*) a saturación en alcohol de 96°.
- Solución de fucsina de Ponceau: 700 ml de la solución A y 450 ml de la B.
 - o Solución A: 0,5 g de fucsina ácida (*Merck*) y 1 ml de ácido acético (*Merck*) que se enrasan a un litro con agua destilada.
 - o Solución B: 1 g de Ponceau xilidina (*Merck*) y 1 ml de ácido acético que se enrasan a un litro con agua destilada.
- Ácido fosfomolibdico (*Merck*) al 1%.

- Solución de azul de anilina: Ácido acético al 2,5% y azul de anilina (*Sigma-Aldrich*) a saturación.

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se sumergieron en el alumbre férrico durante 30 min y, tras ello, en hematoxilina férrica de Weigert (10 min) para continuar con la solución de ácido pícrico (6 min). A continuación, las preparaciones pasaron 8 min por fucsina de Ponceau, seguido de 5 min en ácido fosfomolibdico y 12 min en azul de anilina. Finalmente, se lavaron los portaobjetos en agua, se deshidrataron con pases en alcohol y xileno, y se montaron con *DPX*.

Cuando se utiliza la tinción TM, el COL adquiere un color azul intenso, el tejido conjuntivo verde, los núcleos se tiñen de azul–negro y el citoplasma de rosa.

11.5 Safranina O

La SO es un colorante que indica la presencia de GAGs sulfatados (tales como el condroitín sulfato y el queratán sulfato), haciendo que la muestra adquiera mayor o menor intensidad de rojo en función de la cantidad de GAGs presentes.

Reactivos:

- Ácido acético al 1%: 1 ml de ácido acético glacial en 99 ml de agua destilada.
- Solución de safranina O al 0,1%: 0,1 g de safranina O (*Sigma-Aldrich*) en 100 ml de ácido acético glacial.
- Solución de hematoxilina férrica de Weigert.

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se sumergieron 7 min en hematoxilina férrica de Weigert, tras lo cual se lavaron 5 min en agua destilada y se pasaron a la SO durante 15 min. A partir de ahí, se deshidrataron, se aclararon y se montaron con *DPX*.

Con esta tinción, los núcleos se tiñen de negro y la MEC del cartílago se tiñe de tonalidad naranja-roja en función del contenido en GAGs (cuanto mayor contenido, mayor es la intensidad de la tinción).

11.6 Safranina O-fast green

Mientras la SO detecta GAGs sulfatados, el *FG* tiene mayor afinidad por las moléculas de fibrinógeno, lo que permite diferenciar claramente los depósitos de nueva síntesis de MEC

entre la matriz de los geles de PRP. Por otra parte, los núcleos celulares se tiñen de negro con la hematoxilina férrica.

Reactivos:

- Ácido acético al 1%.
- Solución de hematoxilina férrica de Weigert.
- Solución de safranina O al 0,1%.
- Solución de *fast green* al 0,05%: 0,5 gr de *fast green* (*Sigma Aldrich*) y 1 l de agua destilada.

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se tiñeron 10 min con hematoxilina férrica de Weigert y se lavaron 10 min en agua corriente. A continuación, se tiñeron 5 min con *FG*, se lavaron 10-15 s con ácido acético y se sumergieron 5 min en *SO*. Finalmente, se deshidrataron, se aclararon y se montaron con *DPX*.

11.7 Azul alción-*periodic acid Schiff*

La técnica de *PAS* oxida los tejidos mediante el ácido peryódico, o a veces el ácido crómico, para aumentar el número de grupos carbonilo, es decir, grupos aldehídos o grupos cetónicos en los tejidos. Después se aplica el reactivo de Schiff, que se une a esos grupos y los detecta. Por ejemplo, polisacáridos simples como el glucógeno, los mucopolisacáridos neutros y las mucoproteínas son compuestos *PAS* positivos; en cambio, los mucopolisacáridos ácidos (tales como el condroitín-4-sulfato y el *AH*) son *PAS* negativos.

El AA, por su parte, es un colorante básico que se une a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos ácidos, dando lugar a la formación de un compuesto salino entre ambos, sobre todo cuando el pH es suficientemente ácido. A un pH de 2,5, que es el que se ha utilizado, el AA colorea los mucopolisacáridos ácidos, tanto sulfatados como no sulfatados. En cambio, a un pH aproximado de 1, el AA solo colorea los mucopolisacáridos sulfatados, y a un pH aproximado de 0,5, solamente los mucopolisacáridos ácidos sulfatados más ionizables.

Reactivos:

- Solución de azul alción: 1g de azul alción (*Panreac*) en 97 ml de agua destilada y 3 ml de ácido acético glacial.
- Ácido peryódico (*Sigma-Aldrich*) al 0,5% en agua destilada.
- Reactivo de Schiff (*Merck*).

- Bisulfito sódico (*Merck*) al 2% en agua destilada.
- Hematoxilina de Harris.

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se sumergieron 30 min en AA, tras lo cual se lavaron en agua destilada y se cubrieron con ácido peryódico durante 10 min. Se lavaron de nuevo con agua destilada y se pasaron al reactivo de Schiff de 10 min a 1 h, dependiendo de la maduración del reactivo. Sin lavar, se sumergieron 10 min en bisulfuro sódico. Tras este paso, se lavaron en agua corriente caliente, después fría, y se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris para, finalmente, deshidratar, aclarar y montar con *DPX*.

Con la tinción AA-PAS, los mucopolisacáridos ácidos se tiñen de azul, los núcleos se observan en una tonalidad violácea y los mucopolisacáridos neutros presentan una tonalidad rosa-fucsia debido a la reacción con el PAS.

11.8 Azul de toluidina

El AT es un colorante metacromático, es decir, que cambia de color al teñir determinadas estructuras. La estructura responsable del cambio recibe el nombre de cromotropa, para distinguirla de las restantes que se colorean normalmente (ortocromáticas). La metacromasia está ligada esencialmente a la presencia de cargas electronegativas dispuestas con un determinado patrón de densidad en la superficie de las estructuras cromotropas. La distancia mínima entre éstas debe ser de 0,5 nm. Así, el AT cambia su color azul por un color rojizo al contactar con los proteoglicanos, estructuras ricas en lugares aniónicos de la MEC. Sin embargo, los núcleos y los citoplasmas adquieren la propia tonalidad del colorante, azul.

Reactivos:

- Tampón acetato a pH 4,2:
 - o Solución A: 2,7 g de acetato de sodio (*Sigma-Aldrich*) en 100 ml de agua destilada.
 - o Solución B: 1,1 ml de ácido acético 0,5 M y 100 ml de agua destilada.

Mezclar 30 ml de la solución A (pH 4,2) y 90 ml de la solución B.

- Solución al 0,2% de azul de toluidina (*Merck*) en tampón a pH 4,2.
- Solución acuosa al 4% de molibdato de amonio (*Panreac*).

Protocolo de tinción:

Los portaobjetos se sumergieron 5 min en AT y se lavaron, primero con tampón de acetato acético a pH 4,2 y después con agua destilada. Luego se trataron 10 min con molibdato de amonio, se deshidrataron, se aclararon y se montaron con *DPX*.

11.9 Rojo alizarina

El rojo alizarina S (sal sódica de ácido 3,4-dihidroxi-9,10-dioxo-2-antracenosulfónico) es un derivado de la antraquinona que se emplea para identificar precipitados cálcicos, ya que se une al calcio en un proceso de quelación para generar un producto birrefringente de color naranja-rojo intenso.

Reactivo:

- Solución de rojo alizarina S: 2 gr de rojo alizarina y 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 4,1-4,3.

Protocolo de tinción:

La *chamber-slide* fijada se lavó con *PBS* y se tiñó 5 min en rojo alizarina S al 1% en hidróxido de potasio previamente filtrado. Finalmente, las preparaciones se lavaron con *PBS*, se deshidrataron en acetona y acetona-xileno, se aclararon en xileno y se montaron con *DPX*.

11.10 Oil-Red-O

El *Oil-Red-O* (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol) es un colorante que tiñe lípidos homofásicos, es decir, aquellos que se encuentran en estado puro y son de carácter neutro. Esta misma característica es la que hace que se concentren en un territorio particular de la célula, por ejemplo, una gota de grasa en el citoplasma celular.

Reactivos:

- Solución madre: 100 ml de alcohol isopropílico al 60% (60 ml de isopropanol (*Panreac*) y 40 ml de agua destilada) y 0,5 gr de *Oil-Red-O*.
- Solución de trabajo: 60 ml de solución madre y 40 ml de agua destilada. Dejar reposar durante 10 min y filtrar en un baño a 56°C.
- Hematoxilina de Gill III (*Merck*).

Protocolo de tinción:

Las *chamber-slides* fijadas se lavaron suavemente con alcohol isopropílico al 60% y se tiñeron 20 min en la solución de trabajo. Se lavaron con alcohol isopropílico al 60% y con agua destilada y se hizo una contratinción sumergiéndolos 3 min en hematoxilina de Gill

III. Se lavaron 5 min en agua destilada y 5 min en agua corriente para provocar el viraje de la tinción. Las preparaciones se deshidrataron en acetona y acetona-xileno, se aclararon en xileno y se montaron con *DPX*.

En esta tinción se detectan los lípidos intracelulares teñidos de tonalidades rojizas intensas, mientras que los núcleos celulares adquieren un color azul debido a la contratinción con hematoxilina de Gill III.

11.11 Análisis de imagen por microscopía

Los portaobjetos se visualizaron por microscopía óptica en un microscopio *Olympus BX61* equipado con una cámara digital *Olympus DP70* (*Olympus España S.A.*, Madrid, España).

12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los experimentos, salvo que se indique lo contrario, se realizaron con tejido o células de, al menos, tres donantes diferentes ($n \geq 3$) y con duplicados o triplicados técnicos en cada experimento. Los resultados están expresados como media \pm error estándar (EE). En los experimentos de *qRT-PCR*, las gráficas se representan como datos individuales, pero los valores de expresión relativa se calcularon con el programa *qBase+* con la media geométrica de todos ellos y están expresados como la media geométrica \pm EE, según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

En todos los casos, el análisis estadístico se realizó con los programas *SPSS 18.0* (*IBM Analytics*, Nueva York, EE.UU.) y *GraphPad Prism v.5*. Para los diferentes estudios, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguidos de un test de Bonferroni de comparaciones múltiples, excepto en los casos en los que no se superó el test Shapiro-Wilk de normalidad o el test de homocedasticidad de Bartlett o de Levene. En estos casos, los datos se analizaron con metodologías no paramétricas, concretamente, la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test de Dunn de comparaciones múltiples. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando el *p*-valor fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1 ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL PRP

Se realizó un total de 33 extracciones de sangre periférica de 15 donantes (los datos epidemiológicos se encuentran en 1.1 Obtención de sangre periférica). Las composiciones medias en condiciones basales y post-centrifugación se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21: Caracterización basal y post-centrifugación de las muestras de sangre empleadas en el estudio. Se indican las concentraciones por μl de cada tipo celular.

		Plaquetas	Leucocitos	Eritrocitos
Basal	Media \pm EE	236 \pm 8 \cdot 10 ³	5,01 \pm 0,25 \cdot 10 ³	3,98 \pm 0,07 \cdot 10 ³
	Rango	148-335 \cdot 10 ³	3,05-7,80 \cdot 10 ³	3,27-4,70 \cdot 10 ³
Post-centrifugación	Media \pm EE	458 \pm 13 \cdot 10 ³	0,09 \pm 0,01 \cdot 10 ³	1,6 \pm 0,2 \cdot 10
	Rango	320-577 \cdot 10 ³	0,00-0,30 \cdot 10 ³	0,0-8,0 \cdot 10

De acuerdo con el planteamiento propuesto, la estandarización del PRP en base a la dosis absoluta de plaquetas, se estableció una curva de dosis con un rango de 0 a 15 \cdot 10⁵ plaquetas/ μl . Para comprobar que los efectos observados no se debían a diferencias en la cantidad de proteínas, se caracterizó el contenido proteico total los L-PRPs, que aparece recogido en la Tabla 22. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis y no se encontraron diferencias significativas ($p=0,48$). Por tanto, todos los L-PRPs contenían una media de 41,7 \pm 0,4 mg/ml de proteína, como se puede apreciar en la Fig. 12.

Tabla 22: Contenido proteico de los PRPs preparados con distintas concentraciones absolutas de plaquetas. La concentración de proteína se expresa como media \pm EE.

L-PRP	0	0,25	0,5	0,75	1,5	3	6	15
[Proteína] (mg/ml)	41,3 \pm 0,7	43,8 \pm 1,9	41,9 \pm 0,4	40,8 \pm 0,1	41,4 \pm 1,1	42,5 \pm 1,4	41,3 \pm 0,1	41,1 \pm 0,1

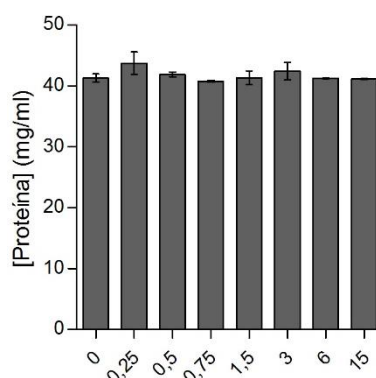


Fig. 12: Contenido proteico total de L-PRP0-15.

Adicionalmente, la presencia y concentración de IL-1Ra en los L-PRPs se cuantificó mediante un *ELISA* específico. Como se puede observar en la Fig. 13, la concentración de IL-1Ra fue esencialmente homogénea en todos los L-PRPs, con independencia de la concentración de plaquetas. En promedio, los L-PRPs mostraron un contenido de $97,7 \pm 2,2$ pg/ml de IL-1Ra, con un rango de $91,5 \pm 5,9$ pg/ml a $109,3 \pm 0,5$ pg/ml.

La cuantificación de IL-1Ra se realizó también en los medios de cultivo suplementados con un 10% de L-PRP0-15 tras una incubación de 48 h a 37°C , en ausencia de IL- 1β , para verificar la presencia de la proteína a tiempo final en los experimentos realizados (Fig. 14). La proteína pudo detectarse a las 48 h, siendo L-PRP0,25 y L-PRP1,5 los que presentaron las concentraciones máxima ($8,4 \pm 1,5$ pg/ml) y mínima ($5,4 \pm 0,2$ pg/ml), respectivamente.

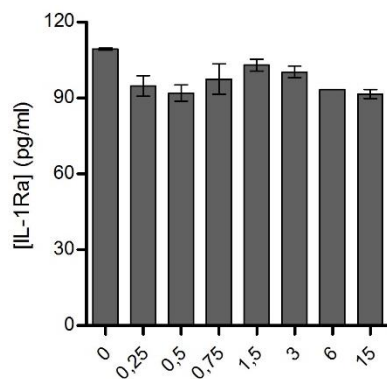


Fig. 13: Cuantificación de la citoquina antiinflamatoria IL-1Ra en L-PRP0-15.

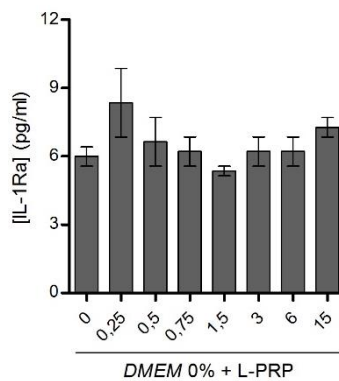


Fig. 14: Cuantificación de la citoquina antiinflamatoria IL-1Ra en los medios de cultivo suplementados con un 10% de L-PRP0-15 tras 48 h.

Por tanto, los L-PRPs se estandarizaron en función de la concentración absoluta de plaquetas ($0-15 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) y se demostró que presentaban un contenido homogéneo en proteína total y en IL-1Ra. Además, se constató la permanencia de IL-1Ra en los medios de cultivo tras 48 h de incubación.

2 EFECTOS DEL PRP SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR

Los condrocitos y las *BM-MSCs* se estimularon durante 72 h con medio *DMEM* 0% suplementado con un 10% de L-PRP0,75-15 y con una condición Basal de *DMEM* 10%, para comparar los efectos sobre la proliferación y la viabilidad celular respecto al cultivo con SBF que se usa de manera rutinaria para estas células. Se estudió la proliferación en base al número de células y el contenido total de proteína, y la viabilidad celular a tiempo final utilizando el reactivo de *AlamarBlue*®.

En ambos tipos celulares se observó un aumento de la proliferación, siguiendo un patrón cercano a la dosis-dependencia tanto para el número de células (Fig. 15A y Fig. 16A, para condrocitos y *BM-MSCs*, respectivamente) como el contenido proteico (Fig. 15B y Fig. 16B, para condrocitos y *BM-MSCs*, respectivamente). En el caso de los condrocitos (n=3), el número de células aumentó entre un $1,64 \pm 0,15$ para L-PRP0,75 y un $2,93 \pm 0,29$ para L-PRP15, aunque solamente se detectaron diferencias significativas para este último ($p=0,0249$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido proteico.

En lo referente a las *BM-MSCs* (n=4), el número de células fue significativamente mayor que en la condición Basal para las estimuciones con L-PRP1,5 ($2,08 \pm 0,16$, $p < 0,05$), L-PRP3, L-PRP6 ($2,23 \pm 0,22$ y $2,36 \pm 0,27$, respectivamente, $p < 0,01$) y L-PRP15 ($2,82 \pm 0,26$, $p < 0,001$), mientras que el contenido proteico total solo aumentó significativamente cuando las células fueron estimuladas con L-PRP15 ($2,92 \pm 0,69$, $p < 0,01$).

Por otro lado, la estimulación con los L-PRPs produjo un ligero aumento de la viabilidad celular, tanto en condrocitos (Fig. 15C) como en *BM-MSCs* (Fig. 16C), aunque las diferencias no fueron significativas ni se apreció un efecto dosis-dependiente.

El aumento de la proliferación celular también se vio reflejado en las imágenes de microscopía óptica de condrocitos (Fig. 15) y *BM-MSCs* (Fig. 16) tras las 72h de estimulación con los L-PRPs. En estas imágenes también se aprecia un aumento dosis-dependiente de la densidad celular.

En definitiva, no se afectó la viabilidad de los condrocitos ni *BM-MSCs* estimulados con L-PRP0,75-15 y, al mismo tiempo, ambos tipos celulares mostraron una respuesta proliferativa aproximadamente dependiente de dosis.

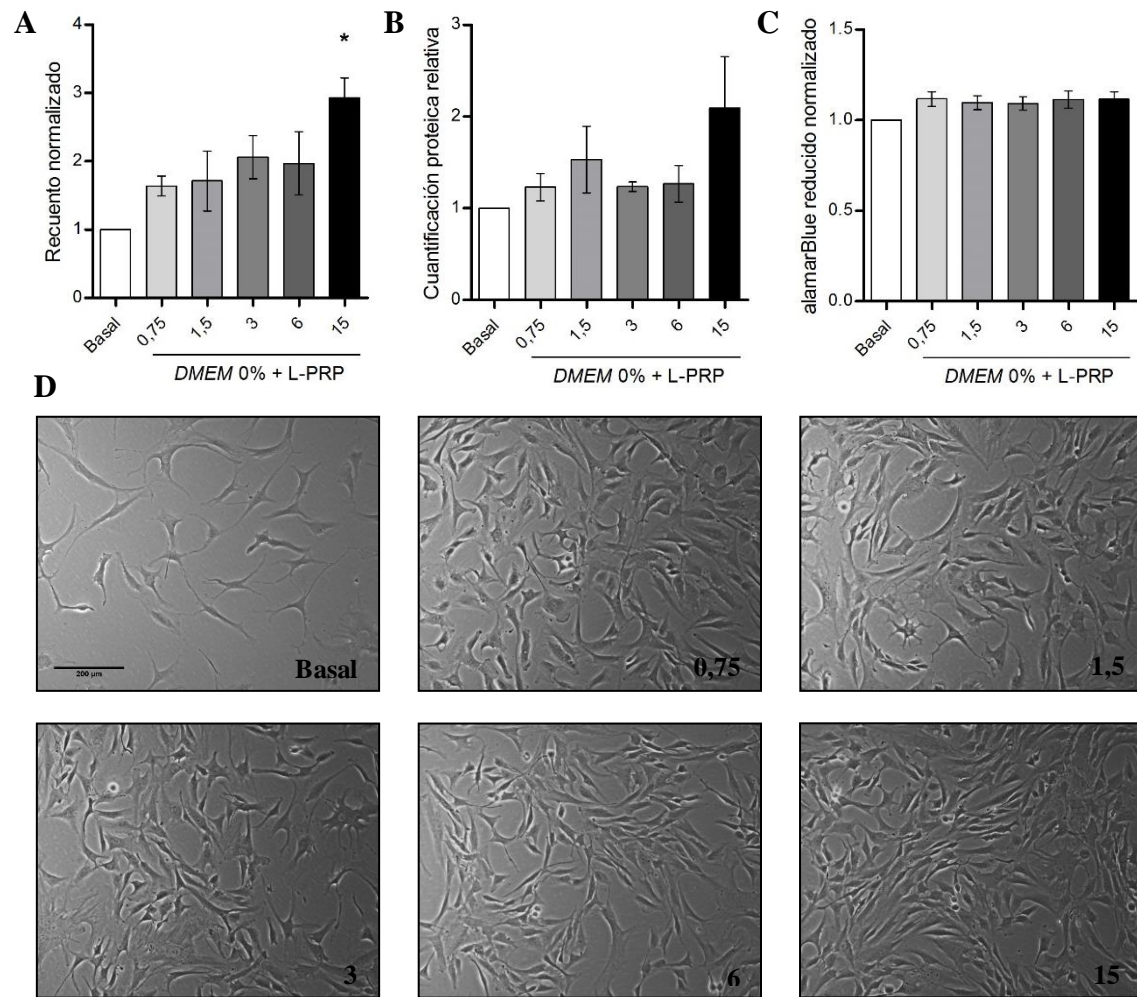


Fig. 15: Efecto de los L-PRPs en la proliferación y viabilidad de condrocitos humanos OA. El recuento celular (A), la proteína total (B) y la cantidad de *AlamarBlue*® reducido (C) tras la estimulación con un 10% de L-PRP0,75-15 en *DMEM* 0% durante 72 h se normalizaron frente a la condición Basal, cultivada en *DMEM* 10%. Imágenes de microscopía óptica (D) tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m. *diferencia significativa con respecto a Basal ($p < 0,05$).

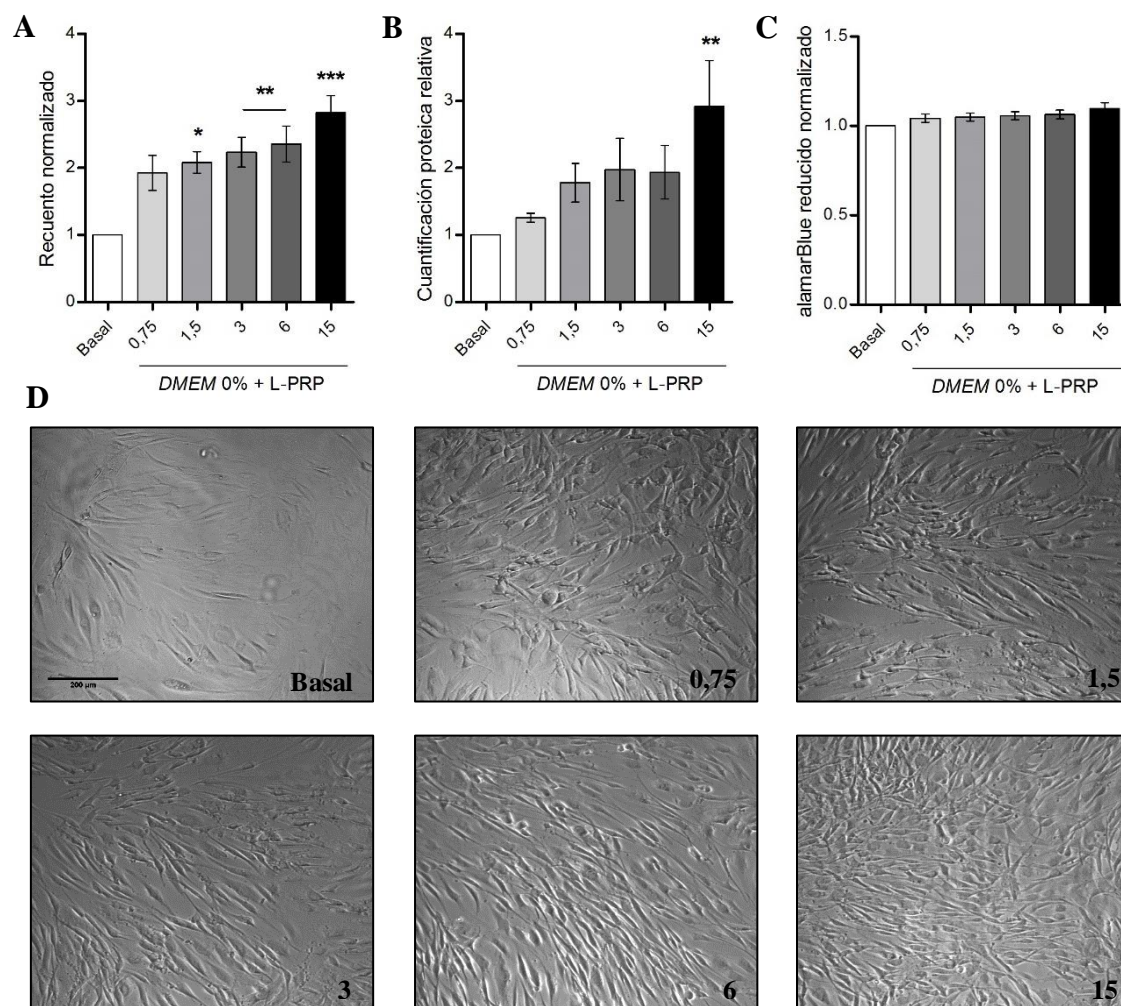


Fig. 16: Efecto de los L-PRPs en la proliferación y viabilidad de *BM-MSCs*. El recuento celular (A), la proteína total (B) y la cantidad de *alamarBlue*® reducido (C) tras la estimulación con un 10% de L-PRP0,75-15 en *DMEM* 0% durante 72 h se normalizaron frente a la condición Basal, cultivada en *DMEM* 10%. Imágenes de microscopía óptica (D) tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μm . *diferencia significativa con respecto a Basal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$).

3 DIFERENCIACIÓN DE *BM-MSCs* ESTIMULADAS CON L-PRP

3.1 Estudios de condrogénesis en formato tridimensional en *pellet*

El efecto de los L-PRPs sobre la diferenciación condrogénica se valoró tras 21 días de cultivo en un modelo de diferenciación en *pellet* con *BM-MSCs*, tal como se describió en el apartado 4.1.1 de Material y Métodos. Para valorar el grado de diferenciación alcanzado se emplearon técnicas moleculares (*qRT-PCR*) y tinciones histoquímicas (H-E, TM, AA-PAS, AT y SO-FG). En primer lugar, se estudió su capacidad de inducción condrogénica, es decir, la capacidad de inducir la condrogénesis por sí mismos, comparando la diferenciación producida por los L-PRP1,5-15 frente a la inducida por un MCondro con *TGF-β3* (C+), y la producida espontáneamente por el propio formato tridimensional de cultivo sin estímulos condrogénicos (C-, cultivado en *DMEM* 10%) (n=5). En segundo lugar, se estudió su capacidad para promover la condrogénesis, es decir, potenciar de manera sinérgica los efectos del MCondro al combinarlos (MCondro+L-PRP0,75-3) (n=3).

3.1.1 Inducción condrogénica en formato de *pellet*

Los resultados de los análisis de biología molecular de los *pellets* estimulados con los L-PRPs se presentan en la Fig. 17. Se analizó la expresión de *SOX9* como factor de transcripción implicado en el inicio de la condrogénesis y de *COLII* y *ACAN* como marcadores específicos de síntesis de MEC por los condrocitos. Los análisis indicaron que la expresión de los tres genes se veía incrementada en C+ con respecto a C- (Fig. 17A-C). Los L-PRPs, en cambio, no indujeron la expresión de *COLII* ni de *ACAN* (Fig. 17A, B), si bien la expresión de *SOX9* (Fig. 17C) apareció significativamente incrementada con respecto a C+ bajo el estímulo de L-PRP1,5. Este mismo L-PRP indujo también levemente la expresión de *COLII*. Al mismo tiempo, la expresión del gen de hipertrofia *COLI* se vio incrementada en C+ y fue significativamente inferior en L-PRP1,5 (Fig. 17D).

En el caso de *RUNX2*, no hubo diferencias entre los distintos estímulos empleados (Fig. 17E). Por último, no hubo influencia significativa en los genes de indiferenciación *POU5F1* y *NANOG*, aunque tendieron a aumentar con L-PRP1,5 (Fig. 17F, G). En conjunto, los análisis de biología molecular indicaron que las dosis altas de plaquetas tienden a inhibir la condrogénesis, mientras que la dosis inferior L-PRP1,5 podría estar induciendo una diferenciación más tardía y en la que no se produce hipertrofia, tal como

indican la expresión elevada de *SOX9* (condrogénesis temprana), la expresión moderada de *COLII* (condrogénesis tardía) y la baja expresión de *COLI* (hipertrofia).

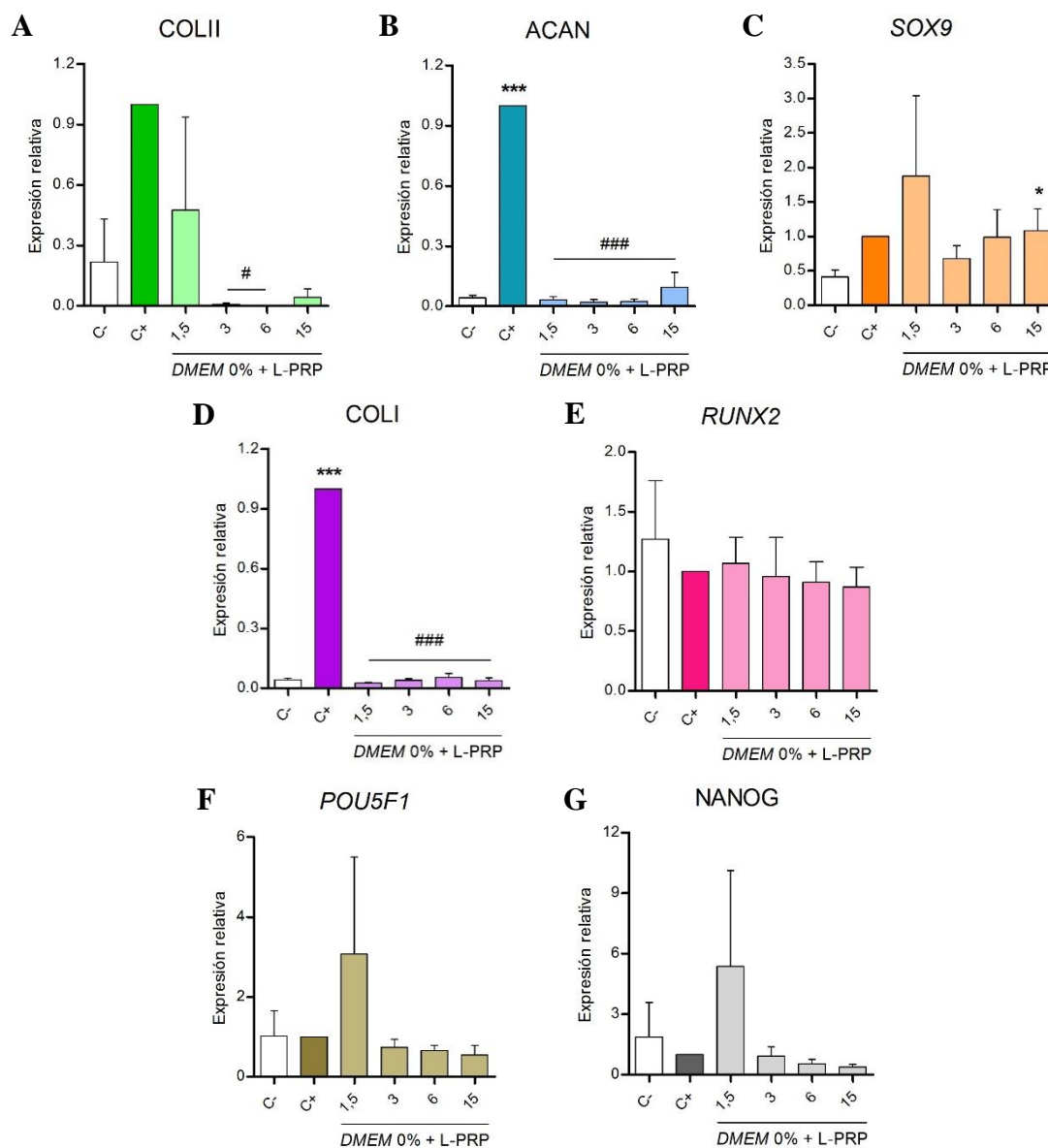


Fig. 17: Expresión génica en pellets de BM-MSCs cultivados durante 21 días en DMEM 0% suplementado con un 10% de L-PRP1,5-15, en comparación con MCondro (C+) o DMEM 10% (C-). Se analizaron los marcadores de condrogénesis *COLII* (A), *ACAN* (B) y *SOX9* (C), así como los marcadores de hipertrofia *COLI* (D) y *RUNX2* (E) y los marcadores de indiferenciación *POU5F1* (F) y *NANOG* (G). Los niveles de expresión se normalizaron frente a C+. *diferencia significativa con respecto a C- (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a C+ (# $p < 0,05$, ### $p < 0,0001$).

3.1.2 Promoción condrogénica en formato de pellet

Posteriormente, una vez identificada la ausencia de una influencia positiva del enriquecimiento en la concentración de plaquetas en la diferenciación condrogénica, el estudio de promoción comparó la diferenciación experimentada al suplementar el MCondro

con L-PRP con dosis bajas de plaquetas (L-PRP0,75-3) frente al MCondro (C+) y el control sin estímulos (C-).

Nuevamente, se vio que los L-PRPs inhibían la expresión de COLII y ACAN (Fig. 18A, B), mientras que *SOX9* (Fig. 18C) aparecía regulado positivamente. Se inhibieron también los genes de hipertrofia COLI, *RUNX2* y *COLX* (Fig. 18D-F), mientras que se mantuvieron los niveles de expresión de *POU5F1* y *NANOG* (Fig. 18G, H).

En este caso se realizaron también tinciones histoquímicas para verificar los resultados de expresión génica a nivel tisular. La tinción H-E (Fig. 19A-E) demostró la capacidad de las células para formar *pellets* de morfología redondeada en las condiciones ensayadas, si bien con L-PRP0,75 fueron más inestables y no llegaron a adquirir un formato esférico (Fig. 19C). En el C+, las células sintetizaron una densa MEC rica en COL (TM, Fig. 19G) y GAGs (AA-PAS, AT y SO-FG, Fig. 19L, Q y V); algunas adquirieron incluso la morfología redondeada de los condrocitos y aparecieron en cavidades similares a las lagunas condrocitarias del cartílago (Fig. 20C+, ↑). Diferenciaciones similares, aunque en menor grado, se encontraron con L-PRP1,5 (Fig. 19D, I, N, S y X, y Fig. 20.1,5) y L-PRP3 (Fig. 19E, J, O, T e Y, y Fig. 20.3), mientras que L-PRP0,75 (Fig. 19C, H, M, R, W y Fig. 20.0,75) mostró una matriz laxa y con poco contenido en COL o GAGs, resultando muy similar a C- (Fig. 19A, F, K, P, U y Fig. 20C-).

En definitiva, tanto los resultados de biología molecular como la histología demostraron que, en un modelo de diferenciación condrogénica en *pellet* de 21 días, los L-PRPs no indujeron ni promovieron la condrogénesis de manera significativamente superior al C+, inhibiendo los estímulos del MCondro. No obstante, los L-PRPs parecieron tener el efecto beneficioso de inhibir la hipertrofia celular.

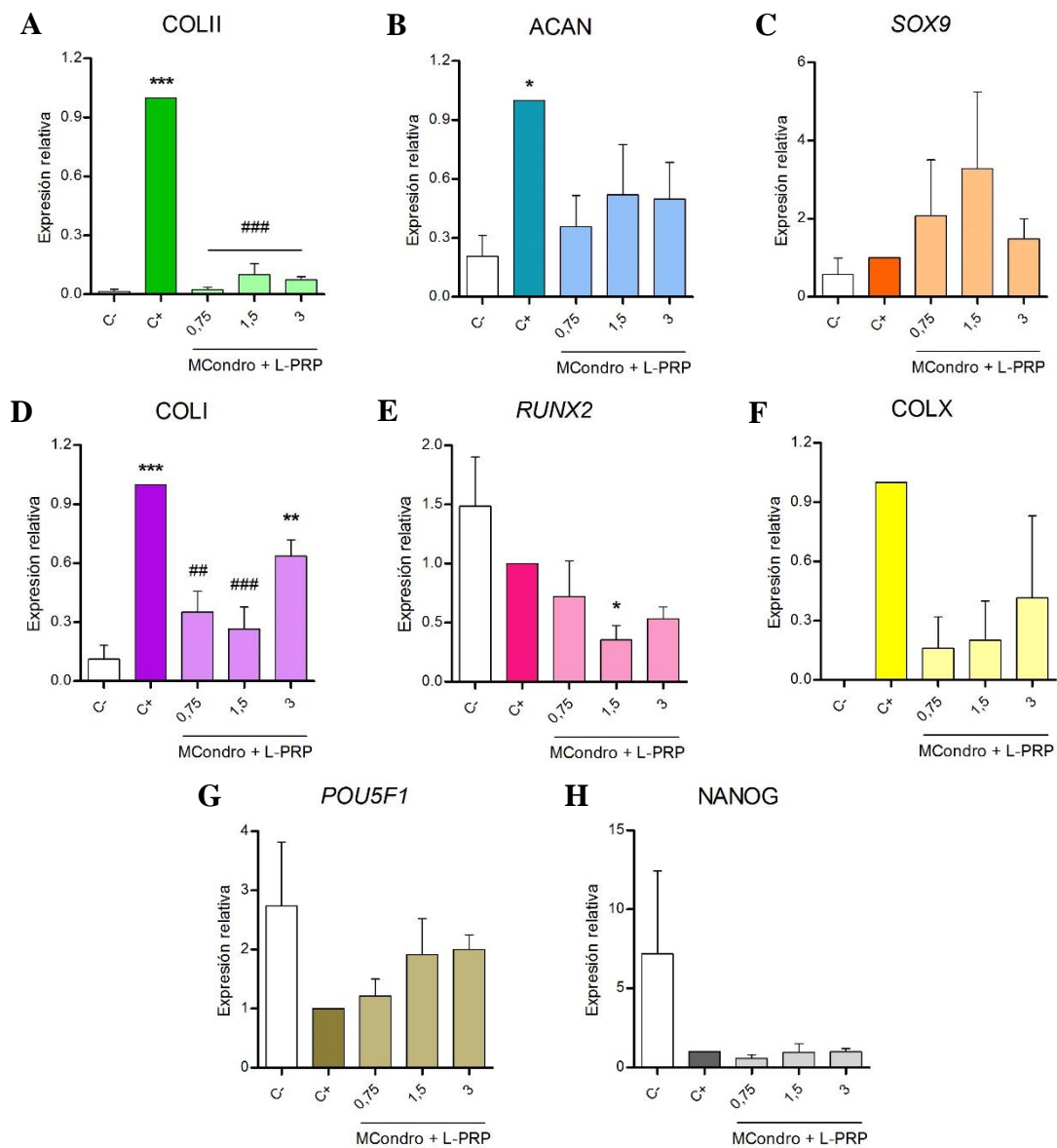


Fig. 18: Expresión génica en *pellets* de BM-MSCs cultivados durante 21 días en MCondro suplementado con un 10% de L-PRP0,75-3, en comparación con MCondro (C+) o DMEM 10% (C-). Se analizaron los marcadores de condrogénesis COLII (A), ACAN (B) y SOX9 (C), así como los marcadores de hipertrofia COLI (D), RUNX2 (E) y COLX (F) y los marcadores de indiferenciación POU5F1 (G) y NANOG (H). Los niveles de expresión se normalizaron frente a C+. *diferencia significativa con respecto a C- (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a C+ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$).**

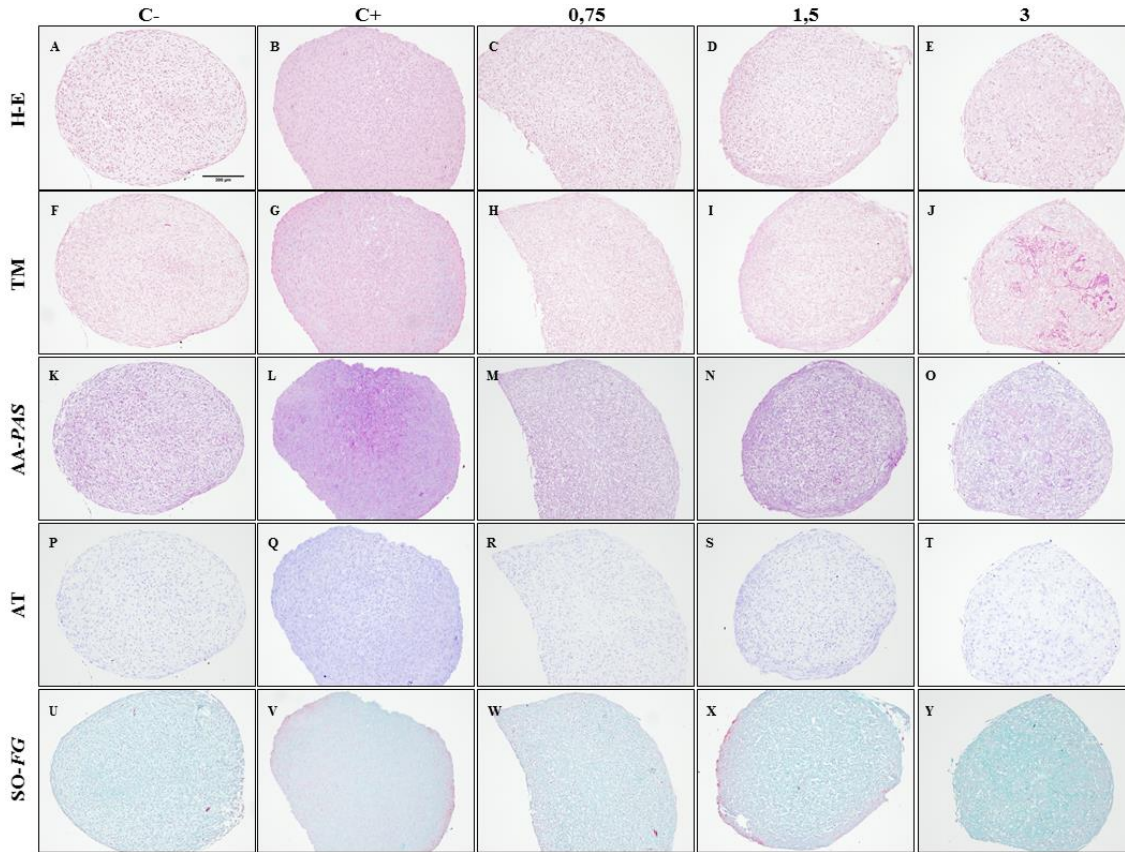


Fig. 19: Tinciones histoquímicas de los *pellets* de *BM-MSCs* cultivados durante 21 días en *DMEM* 10% (C-), MCondro (C+) o MCondro más 10% de L-PRP0,75-3. Además de la tinción general H-E (A-E), se realizaron tinciones específicas para valorar la producción de matriz cartilaginosa en función de la presencia de COL (TM, F-J) y GAGs (AA-PAS, K-O; AT, P-T; y SO-FG, U-Y). Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m.

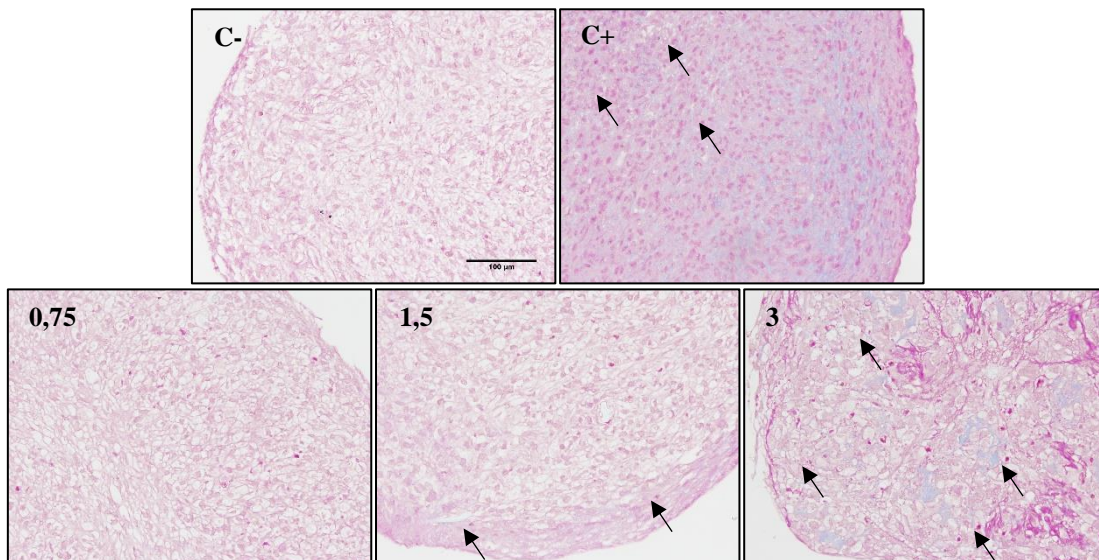


Fig. 20: Detalles de la tinción TM de los *pellets* de *BM-MSCs* cultivados durante 21 días en *DMEM* 10% (C-), MCondro (C+) o MCondro más 10% de L-PRP0,75-3. Las fibras de COL se pueden observar, teñidas de azul, en C+, MCondro+L-PRP1,5 y MCondro+L-PRP3, que también presentan células similares a condrocitos (\uparrow), pero no en C- o MCondro+L-PRP0,75. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

3.2 Estudios de osteogénesis

La osteogénesis, y el efecto del L-PRP sobre la misma, se valoró en un modelo de 14 días de cultivo en placa o *chamber-slide* con las *BM-MSCs* de n=4 donantes. Para ello se empleó la técnica de *qRT-PCR* y la tinción histoquímica rojo alizarina. De la misma forma que para la condrogénesis, se estudió en primer lugar la capacidad de inducción osteogénica, comparando la diferenciación producida por L-PRP0,75-3 con la producida en el MOsteo (C+) y el control sin estimular en *DMEM* 10% (C-). Posteriormente, se estudió su capacidad para promover la osteogénesis, es decir, potenciar los efectos del MOsteo al utilizarlos en combinación (MOsteo+L-PRP0,75-3).

3.2.1 Inducción osteogénica

Los análisis de biología molecular indicaron que, en C+, la expresión del gen *ALP* se veía incrementada con respecto a C-, mientras que la expresión de *RUNX2* se mantenía inalterada (Fig. 21). Por su parte, los L-PRPs promovieron la expresión de ambos genes en mayor medida que C+, si bien las diferencias no llegaron a ser significativas. Asimismo, no se detectaron diferencias entre las distintas dosis de plaquetas testadas.

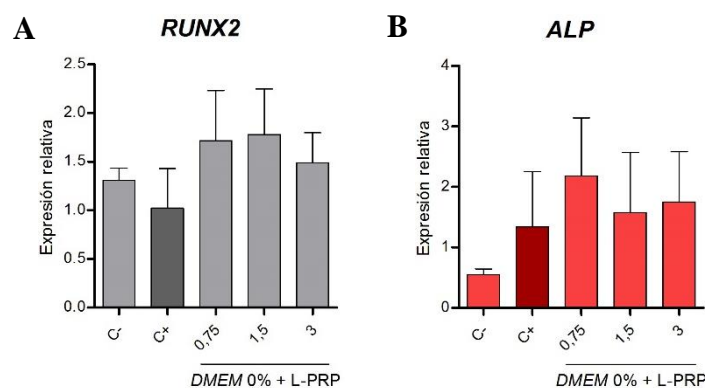


Fig. 21: Expresión génica de los marcadores de osteogénesis *RUNX2* (A) y *ALP* (B) en *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), MOsteo (C+) o *DMEM* 0% más 10% de L-PRP0,75-3. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones.

La tinción rojo alizarina (Fig. 22) evidenció una intensa deposición de precipitados cálcicos en C+ (Fig. 22C+), estando estos ausentes en C- y en L-PRP0,75 (Fig. 22C- y 0,75). Con L-PRP1,5 y L-PRP3 (Fig. 22.1,5 y 3), la coloración rojiza era incipiente y parecía aumentar con la dosis de plaquetas.

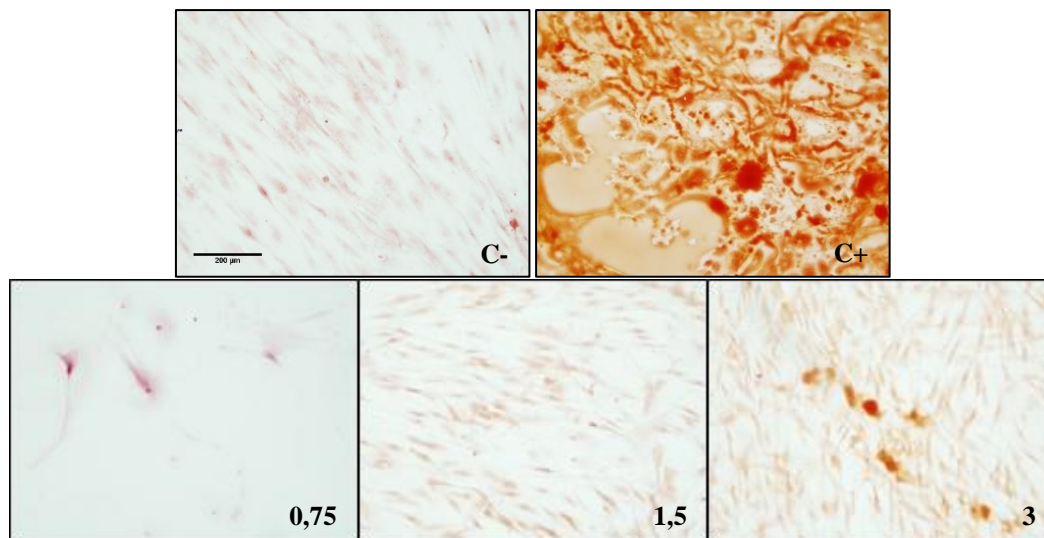


Fig. 22: Tinción rojo alizarina de las *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), *MOsteo* (C+) o *DMEM* 0% más 10% de L-PRP0,75-3. La intensidad de la coloración rojiza es proporcional a la cantidad de depósitos de fosfato cálcico. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μm .

3.2.2 Promoción osteogénica

La promoción osteogénica se estudió comparando la diferenciación experimentada por las células al suplementar el *MOsteo* con L-PRP con las mismas dosis de plaquetas que las ya empleadas en los experimentos de inducción (L-PRP0,75-3), frente al *MOsteo* (C+) y el control sin estimular (C-).

En este caso, los genes *RUNX2* y *ALP* no se vieron modulados significativamente, mostrando expresiones equivalentes a la de C+ (Fig. 23A, B). No obstante, la expresión de *RUNX2* tendió a ser ligeramente inferior en L-PRP0,75-3, mientras que *ALP* mostró una ligera tendencia a incrementarse en L-PRP1,5 y L-PRP3. Así, los análisis de *qRT-PCR* indicarían una mayor progresión de la osteogénesis bajo la influencia de los L-PRPs.

La tinción rojo alizarina (Fig. 24), por su parte, indicó una diferenciación osteogénica equivalente a C+ (Fig. 24C+) en L-PRP0,75 (Fig. 24.0,75), mientras que los depósitos cálcicos adquirieron tonalidades más intensas con L-PRP1,5 y L-PRP3 (Fig. 24.1,5 y 3). Por tanto, los L-PRPs actuaron en sinergia con el *MOsteo* para promover una diferenciación osteogénica de las *BM-MSCs* más intensa, un efecto que podría verse favorecido al incrementar la dosis de plaquetas, de acuerdo con los depósitos cálcicos detectados por histoquímica.

En conclusión, los resultados de biología molecular y la histología demostraron que, en un modelo de diferenciación osteogénica de 14 días, los L-PRPs indujeron levemente y

promovieron la osteogénesis, actuando sinérgicamente con el MOsteo. Este efecto pareció aumentar con la dosis de plaquetas.

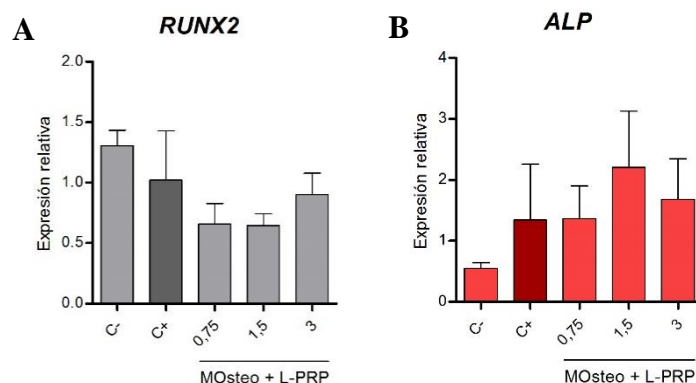


Fig. 23: Expresión génica de los marcadores de osteogénesis *RUNX2* (A) y *ALP* (B) en *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), MOsteo (C+) o MOsteo más 10% de L-PRP0,75-3. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones.

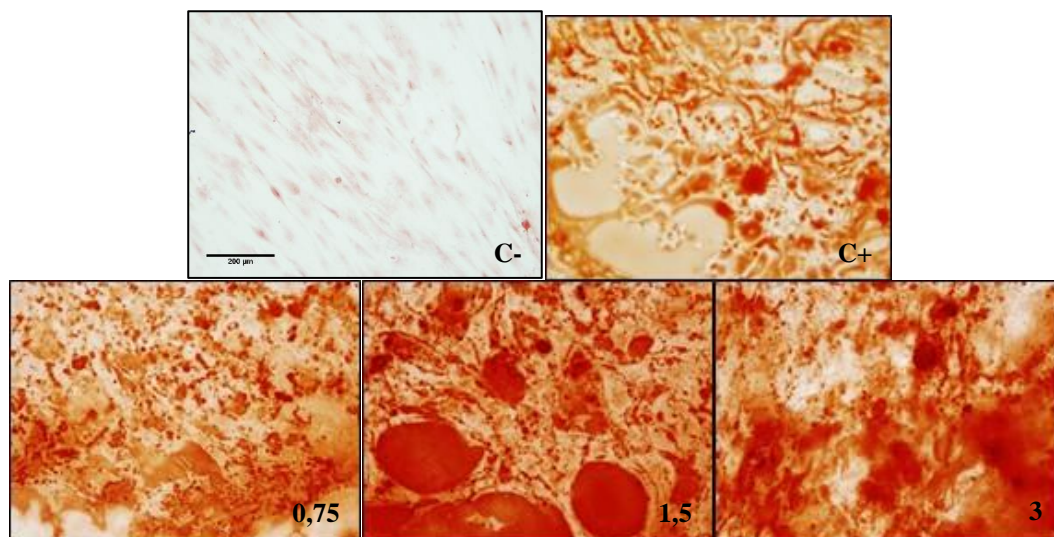


Fig. 24: Tinción rojo alizarina de las *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), MOsteo (C+) o MOsteo más 10% de L-PRP0,75-3. Se puede apreciar que la intensidad de la coloración rojiza, proporcional a la cantidad de depósitos de fosfato cálcico, parece aumentar con L-PRP-1,5 y L-PRP3, con respecto a C+. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μm .

3.3 Estudios de adipogénesis

Los efectos inductor y promotor del L-PRP sobre la adipogénesis de las *BM-MSCs* de $n=5$ donantes se valoraron tras 14 días de cultivo en placa o *chamber-slide*, mediante de *qRT-PCR* y la tinción histoquímica *Oil-Red-O*.

3.3.1 Inducción adipogénica

Los experimentos de inducción adipogénica compararon la diferenciación inducida por L-PRP0,75-3 con la experimentada por las células cultivadas en MAdipo (C+) o en DMEM 10% (C-, sin estimular).

La expresión de los genes *FABP4* y *PPAR γ* (Fig. 25A, B) aumentó significativamente en C+ con respecto a C-. Los L-PRPs, en cambio, inhibieron significativamente la expresión de dichos genes, mostrando en ambos casos niveles de expresión significativamente inferiores a C+. No se detectaron diferencias en función de la dosis plaquetaria.

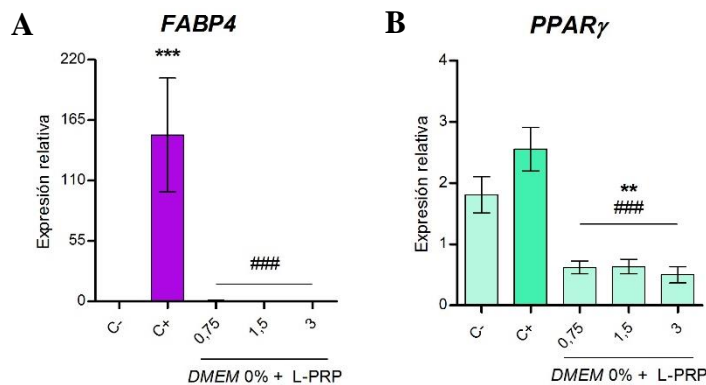


Fig. 25: Expresión génica de los marcadores de adipogénesis *FABP4* (A) y *PPAR γ* (B) en *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en DMEM 10% (C-), MAdipo (C+) o DMEM 0% más 10% de L-PRP0,75-3. *diferencia significativa con respecto a C- ($p < 0,01$, *** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a C+ (### $p < 0,0001$).**

La tinción *Oil-Red-O* (Fig. 26) demostró la presencia de numerosas gotas lipídicas, teñidas de color rojo, en C+ (Fig. 26C+). Por el contrario, en C- y L-PRP0,75-3 (Fig. 26C- y 0,75-3), las gotas lipídicas estaban prácticamente ausentes. De esta forma, la tinción histoquímica apoyaba los resultados obtenidos en los análisis de *qRT-PCR*, mostrando con L-PRP0,75-3 una leve diferenciación adipogénica que no difería de la espontánea experimentada por las *BM-MSCs* en C-, debida a la confluencia celular.

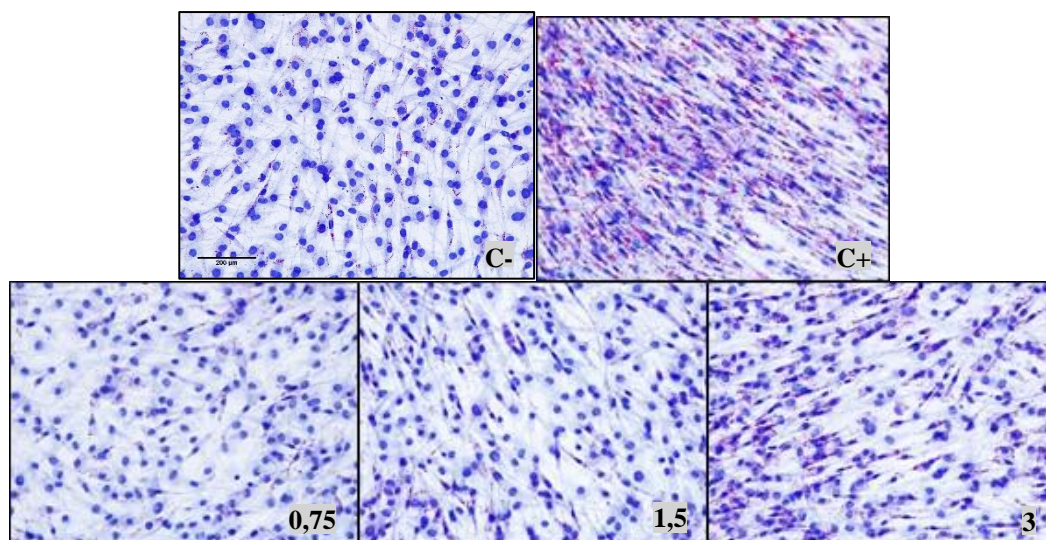


Fig. 26: Tinción *Oil-Red-O* de las *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), *MAdipo* (C+) o *DMEM* 0% más 10% de L-PRP0,75-3. Las vacuolas lipídicas aparecen como pequeñas gotas de color rojo, muy abundantes en C+ y ausentes o muy escasas con L-PRP0,75-3. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 µm.

3.3.2 Promoción adipogénica

En los experimentos de promoción adipogénica se empleó *MAdipo* suplementado con L-PRP0,75-3, *MAdipo* (C+) y *DMEM* 10% (C-). Se comparó la diferenciación adipogénica experimentada por las células al suplementar el *MAdipo* con L-PRP con las mismas dosis de plaquetas que las ya empleadas en los experimentos de inducción (L-PRP0,75-3), frente a C+ y C-.

Los análisis de *qRT-PCR* indicaron que la expresión tanto de *FABP4* como de *PPAR γ* aumentó significativamente en C+ con respecto a C- (Fig. 27A, B). La expresión de *FABP4* (Fig. 27A) con L-PRP0,75-3 fue significativamente inferior a la de C+ y, con L-PRP1,5 y L-PRP3, equivalente a la de C-. En el caso de *PPAR γ* (Fig. 27B), la expresión con L-PRP0,75-3 fue equivalente a la de C-, siendo significativamente inferior a la de C+ con L-PRP3. Así, en este caso, los L-PRPs no actuaron en sinergia con el *MAdipo*, sino que, al contrario, inhibieron su efecto diferenciador. No se detectaron diferencias en función de la dosis de plaquetas.

La tinción *Oil-Red-O* mostró la presencia de gotas lipídicas con L-PRP0,75-3 (Fig. 28.0,75-3). Si bien dichas gotas eran más numerosas que en C-, también eran más escasas que en C+. Por tanto, la tinción histoquímica mostró un efecto inhibitorio de la adipogénesis con L-PRP0,75-3, coincidiendo con los resultados obtenidos en las pruebas de biología molecular.

En resumen, tanto los resultados de biología molecular como la histología demostraron que, en un modelo de diferenciación adipogénica de 14 días, los L-PRPs no indujeron ni promovieron la adipogénesis de manera significativamente superior al C+. En cambio, los L-PRPs inhibieron los estímulos del MAdipo, con independencia de la dosis de plaquetas.

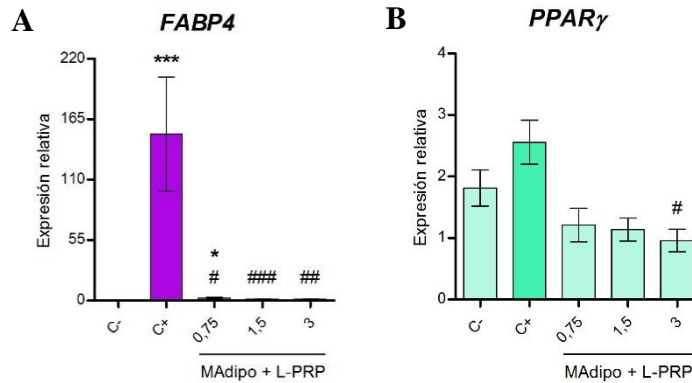


Fig. 27: Expresión génica de los marcadores de adipogénesis *FABP4* (A) y *PPARγ* (B) en *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), MAdipo (C+) o MAdipo más 10% de L-PRP0,75-3. *diferencia significativa con respecto a C- ($p < 0,05$, $***p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a C+ (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$).

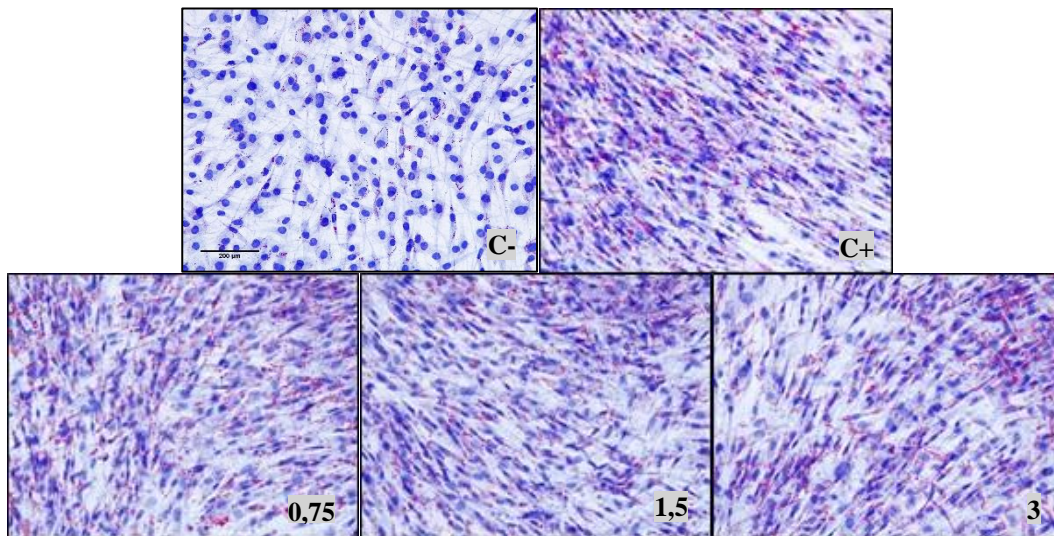


Fig. 28: Tinción *Oil-Red-O* de las *BM-MSCs* cultivadas durante 14 días en *DMEM* 10% (C-), MAdipo (C+) o MAdipo más 10% de L-PRP0,75-3. Las vacuolas lipídicas aparecen disminuidas con L-PRP0,75-3 con respecto a C+. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μm .

4 DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE MSCs INCLUIDAS EN G-PRP

Se exploró el potencial del PRP como soporte tridimensional de *BM-MSCs* de $n=4$ donantes para su aplicación en tratamientos de *TE* del cartílago, aprovechando la capacidad de coagulación de los PRPs para preparar geles tridimensionales con las *MSCs* embebidas *in situ* (ver Fig. 29A), tal como se describió en el apartado 4.1.2 de Material y Métodos.

Esta parte del estudio se realizó durante la estancia predoctoral en el *Stem Cell Lab* (Facultad de Medicina, Universidad de Heidelberg), con el grupo de la Dra. Karen Bieback.

4.1 Estabilidad de los biomateriales

La apariencia de los G-PRPs preparados se muestra en la Fig. 29. Su estabilidad fue variable y, mientras algunos se mantuvieron íntegros durante todo el periodo de estudio (Fig. 29B, C), en otros casos se desestabilizaron y se soltaron de las paredes del pocillo de cultivo (Fig. 29D). En la Fig. 30 se muestra la tinción H-E de uno de los geles en los que se produjo dicha desestabilización. Como se puede apreciar, en estos geles se encontraron regiones con importantes aglomeraciones celulares en las que se produjo una intensa remodelación de la MEC. Se pudieron identificar lo que podrían ser distintos tipos de células, entre ellos los condrocitos, más pequeños y redondeados e incluidos en pequeñas lagunas de la matriz (flecha azul ↑), los fibrocitos, de morfología alargada (flecha verde ↑), o los progenitores hematopoyéticos, con un gran núcleo redondeado y muy coloreado (flecha roja ↑).

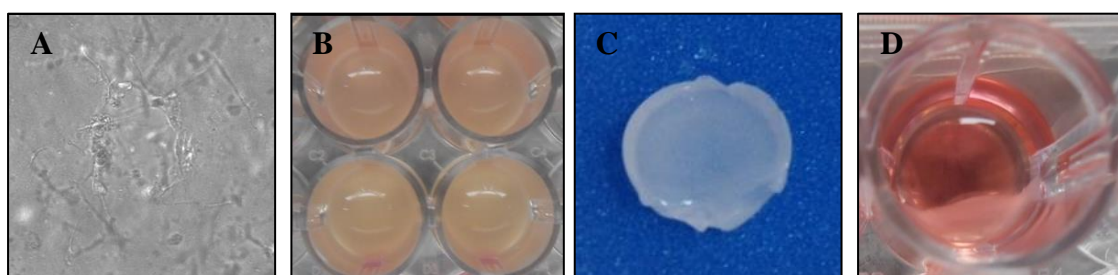


Fig. 29: Apariencia de los G-PRPs con *BM-MSCs* a tiempo final de cultivo. A muestra la disposición tridimensional de las *BM-MSCs* en distintos planos en un G-PRP. B y C muestran un gel íntegro en las etapas previas a su inclusión en parafina para el análisis histomorfológico. En D se puede ver un gel desestabilizado en el que se ha producido la lisis y retracción de la matriz. Imágenes obtenidas con un microscopio invertido *Nikon Eclipse TS100* y una cámara digital *Olympus X-42*.

Para caracterizar mejor la matriz presente en estos geles se emplearon tinciones histoquímicas e IHQs. Las tinciones histoquímicas TM (Fig. 31A) y SO-FG (Fig. 31B) confirmaron la presencia de una matriz muy remodelada, que resultó ser rica en proteoglicanos y fibras colágenas. Para eliminar la posible interferencia del colorante FG, se realizó una tinción sencilla de SO, la cual confirmó la riqueza de la matriz en

proteoglicanos (Fig. 31C). Por IHQ se demostró la presencia de numerosas fibras de COLII (Fig. 31D), especialmente en la región periférica, pero también en el interior de los geles. Además, se realizó una tinción IHQ para COLI que mostró la presencia de este tipo de COL en la zona más externa de los geles, así como en algunas células de la región interna (Fig. 31E).

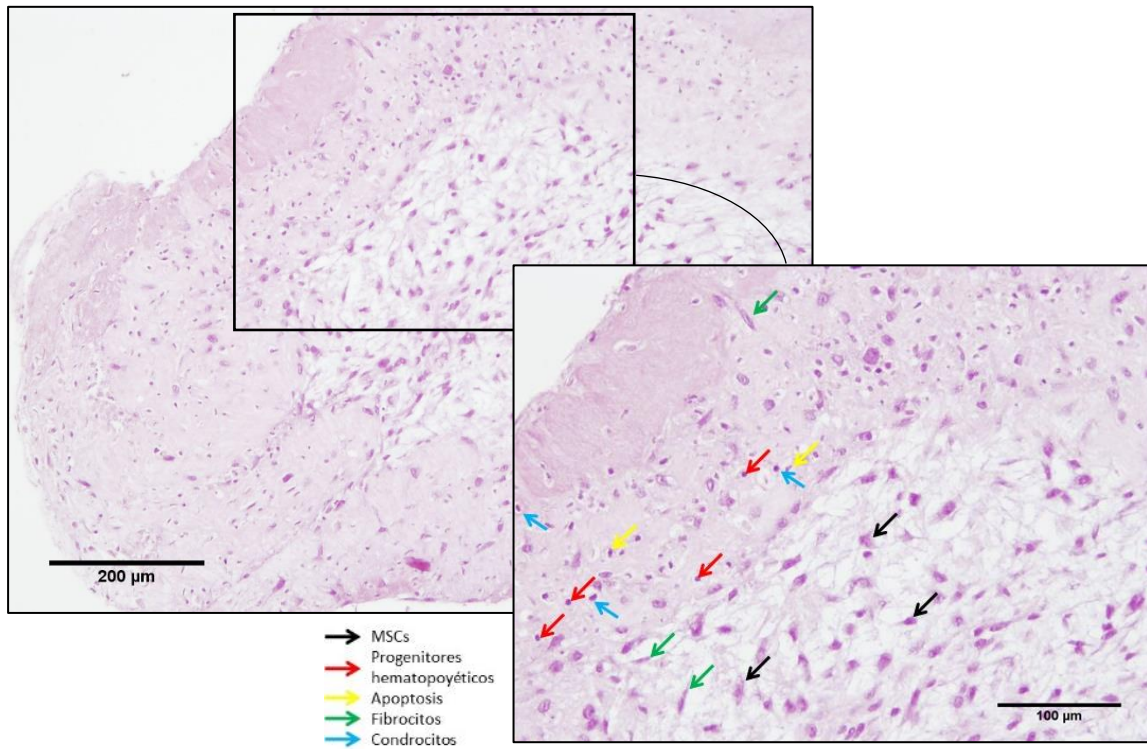


Fig. 30: Tinción H-E de un G-PRP con *BM-MSCs* desestabilizado tras 21 días de cultivo. En la región ampliada se pueden apreciar células similares a condrocitos, señaladas con flechas azules (↑), de morfología redondeada e incluidas en cavidades en la matriz tipo laguna condrocitaria. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x (la barra de escala representa 200 µm) y 20x (la barra de escala representa 100 µm).

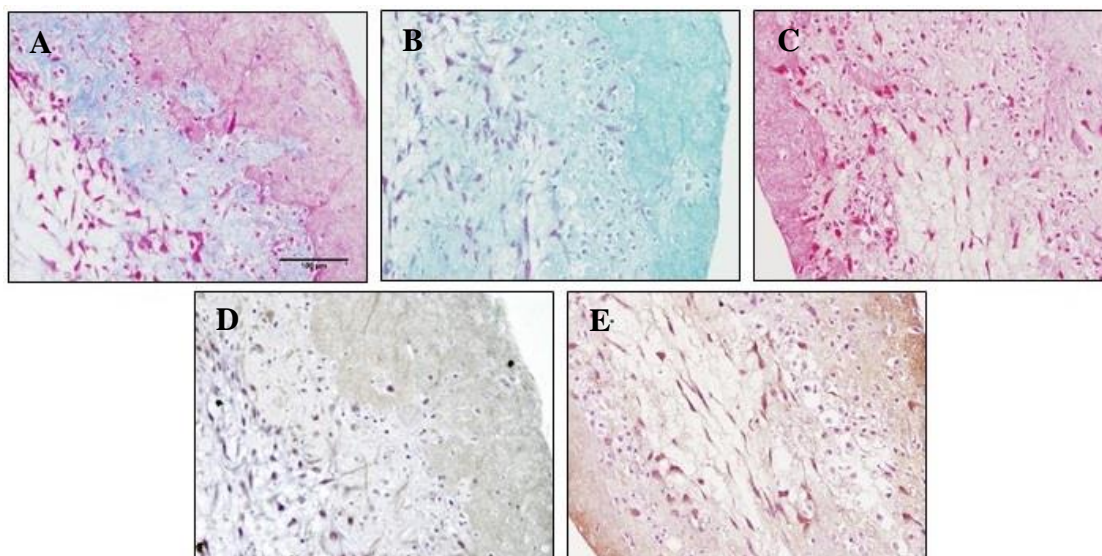


Fig. 31: Tinciones histoquímicas (A-C) e IHQs (D-E) de un G-PRP con *BM-MSCs* desestabilizado tras 21 días de cultivo. Las tinciones TM (A) y COLII (D) muestran una matriz rica en COL y, en particular, la deposición de COLII de nueva síntesis. Las tinciones SO-FG (B) y SO (C) indican la presencia de proteoglicanos y COLI (E) muestra la presencia de algunas fibras de COLI. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μm .

4.2 Viabilidad celular en los biomateriales

Se comprobó la viabilidad de las células en el interior de los G-PRPs a lo largo del experimento utilizando el test de *AlamarBlue*®. Las *BM-MSCs* se mantuvieron viables y proliferaron en los geles, tal como refleja el incremento en la reducción del reactivo *AlamarBlue*® hasta los 7 días, para después mantenerse estables (Fig. 32).

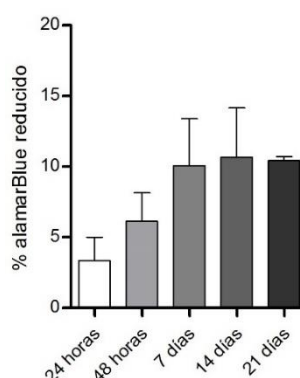


Fig. 32: Actividad celular de las *BM-MSCs* en los G-PRPs a lo largo del tiempo de cultivo.

4.3 Influencia de la concentración de plaquetas en la inducción de la condrogénesis

Se estudió el efecto de la concentración de plaquetas en el G-PRP sobre la diferenciación condrogénica de las *BM-MSCs*. Se emplearon concentraciones de 0,75; 1,5 y $3 \cdot 10^5$

plaquetas/ μ l. Para evaluar el efecto de los *GFs* contenidos en el G-PRP, se incluyó como control un biomaterial inerte de Ag con *BM-MSCs* a la misma densidad celular que en los G-PRPs y se realizó una valoración global de la expresión génica de COLII, ACAN, *SOX9* y el marcador de hipertrofia COLI (Fig. 33) y de las tinciones histoquímicas H-E, TM (Fig. 34), AA-PAS y SO (Fig. 35).

Los G-PRPs no mostraron en los resultados de expresión génica mejoras significativas de la diferenciación condrogénica frente a la Ag (Fig. 33). En general, la condrogénesis tuvo lugar en todos los geles testados, pero fue mejor en aquellos cultivados en MCondro. Además, la modificación de la concentración plaquetaria en los G-PRPs tampoco influyó significativamente en la diferenciación experimentada por las *BM-MSCs*. No obstante, sí se observó una tendencia positiva en *SOX9* (Fig. 33A) y COLII (Fig. 33B) con el incremento de la concentración de plaquetas, mientras que ACAN (Fig. 33C) y COLI (Fig. 33D) no se vieron influenciados. Por otra parte, el marcador de hipertrofia COLI apareció ligeramente incrementado en todos los G-PRPs cultivados en MCondro, indicando una posible hipertrofia.

En cambio, en las tinciones se observaron efectos diferentes. La tinción H-E (Fig. 34A-H) reveló que las *BM-MSCs* se distribuyeron uniformemente en las matrices de fibrina y, en algunos casos, formaron agrupaciones de mayor o menor extensión (Fig. 34B, H). La condensación celular tuvo lugar tanto en los geles cultivados en MCondro (Fig. 34H) como en aquellos cultivados en *DMEM* (Fig. 34B), si bien se encontraron más comúnmente y ocuparon volúmenes mayores en los primeros. Los geles en los que se encontró condensación de *MSCs* presentaron una matriz bastante remodelada y se desestabilizaron estructuralmente. En cuanto a la morfología celular, las *MSCs* de los geles cultivados en MCondro adquirieron un aspecto redondeado y formaron estructuras similares a lagunas condrocitarias en la matriz de fibrina (Fig. 34E-H, \uparrow); en cambio, la mayoría de las *MSCs* de los geles cultivados en *DMEM* mantuvieron una morfología alargada y fibroblástica, y sólo unas pocas presentaron una morfología similar a la de los condrocitos (Fig. 34A-D, \uparrow). En lo que respecta a los controles inertes (Fig. 34A, E), las *BM-MSCs* se distribuyeron homogéneamente en la matriz de Ag y presentaron morfologías redondeadas, tanto en los biomateriales cultivados en MCondro (Fig. 34E, \uparrow) como en aquellos cultivados en *DMEM* (Fig. 34A, \uparrow). Aunque las *BM-MSCs* formaron estructuras similares a lagunas condrocitarias, en ninguno de ellos se apreció una remodelación de la matriz.

Las tinciones TM (Fig. 34I-P), AA-PAS (Fig. 35A-H) y SO (Fig. 35I-P) confirmaron la remodelación de la matriz de fibrina mediante la formación de una matriz de nueva síntesis, rica en proteoglicanos y fibras colágenas. Como ya se intuía con la tinción H-E, esta remodelación fue más intensa en los geles cultivados en MCondro, en algunos de los cuales se formó una nueva matriz densa y similar a la MEC del cartílago (Fig. 34P, Fig. 35H, P). La concentración de plaquetas no tuvo una influencia clara, pero la MEC de los geles con $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl pareció tener una mejor calidad (Fig. 34P, Fig. 35H, P). En los controles de Ag no se encontró MEC cartilaginosa de nueva formación (Fig. 34I, M, Fig. 35A, E, I, M).

Por tanto, las *BM-MSCs* incluidas en G-PRPs se diferenciaron hacia el linaje condrogénico en mayor grado que las incluidas en Ag, siendo la concentración superior de plaquetas la que aportó mejores resultados globales. Los geles cultivados en MCondro expresaron más los genes de diferenciación condrogénica y formaron matrices ricas en proteoglicanos y fibras colágenas. Los procesos de condensación celular y remodelación de la matriz produjeron una desestabilización estructural de los geles.

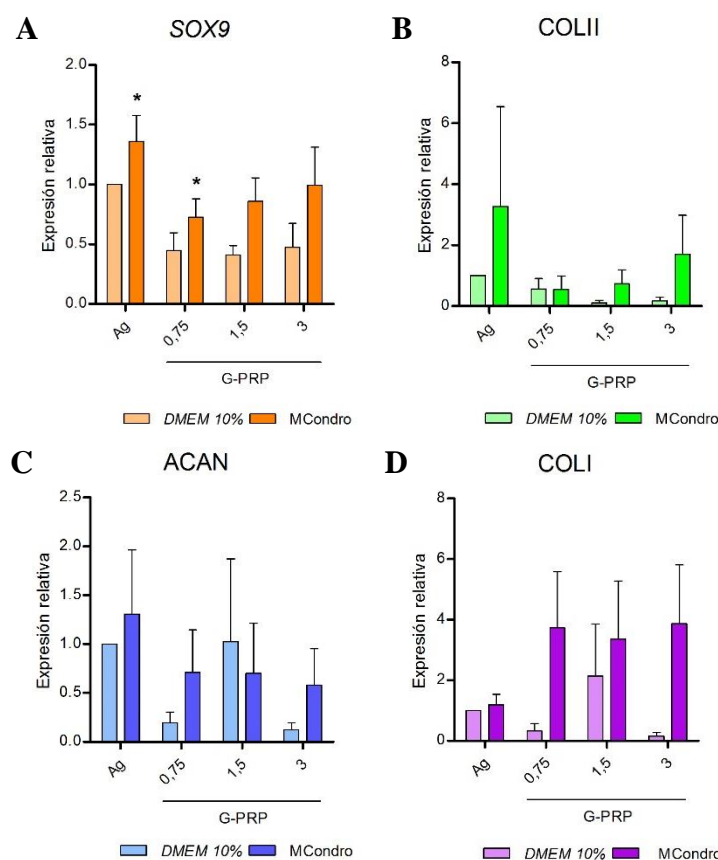


Fig. 33: Expresión génica de marcadores de condrogénesis en *BM-MSCs* incluidas en geles de Ag o de PRP con $0,75$; $1,5$ o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl y cultivadas en DMEM 10% o en MCondro durante 21 días. Resultados normalizados frente al biomaterial de Ag cultivado en DMEM 10%. *diferencia significativa entre las condiciones señaladas ($p < 0,05$).

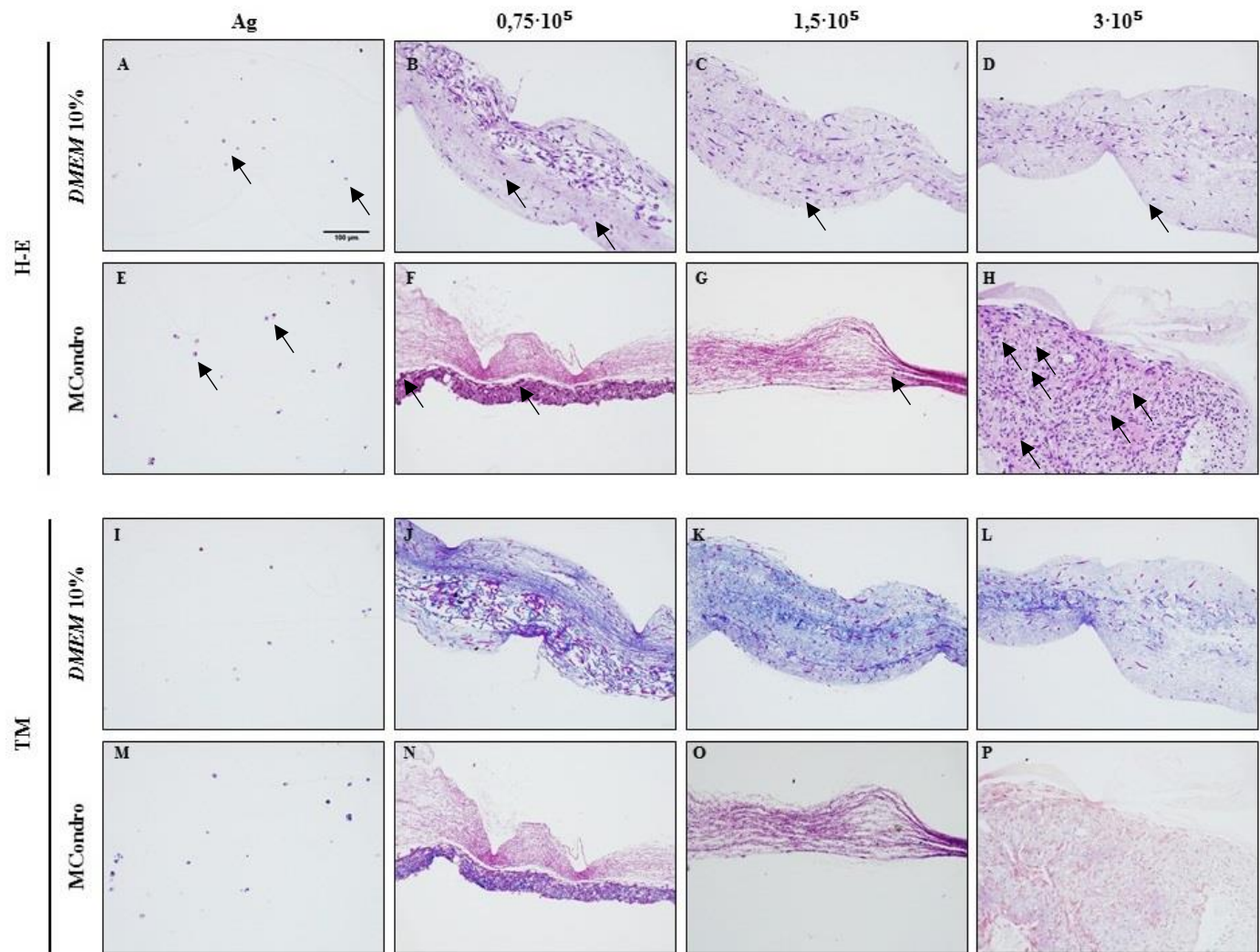


Fig. 34: Tinciones H-E (A-H) y TM (I-P) de gels de Ag o de PRP con $0,75$; $1,5$ o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l con *BM-MSCs* embebidas y cultivados en *DMEM* 10% (A-D e I-L, respectivamente) o en *MCondro* (E-H y M-P, respectivamente) durante 21 días. Imágenes tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

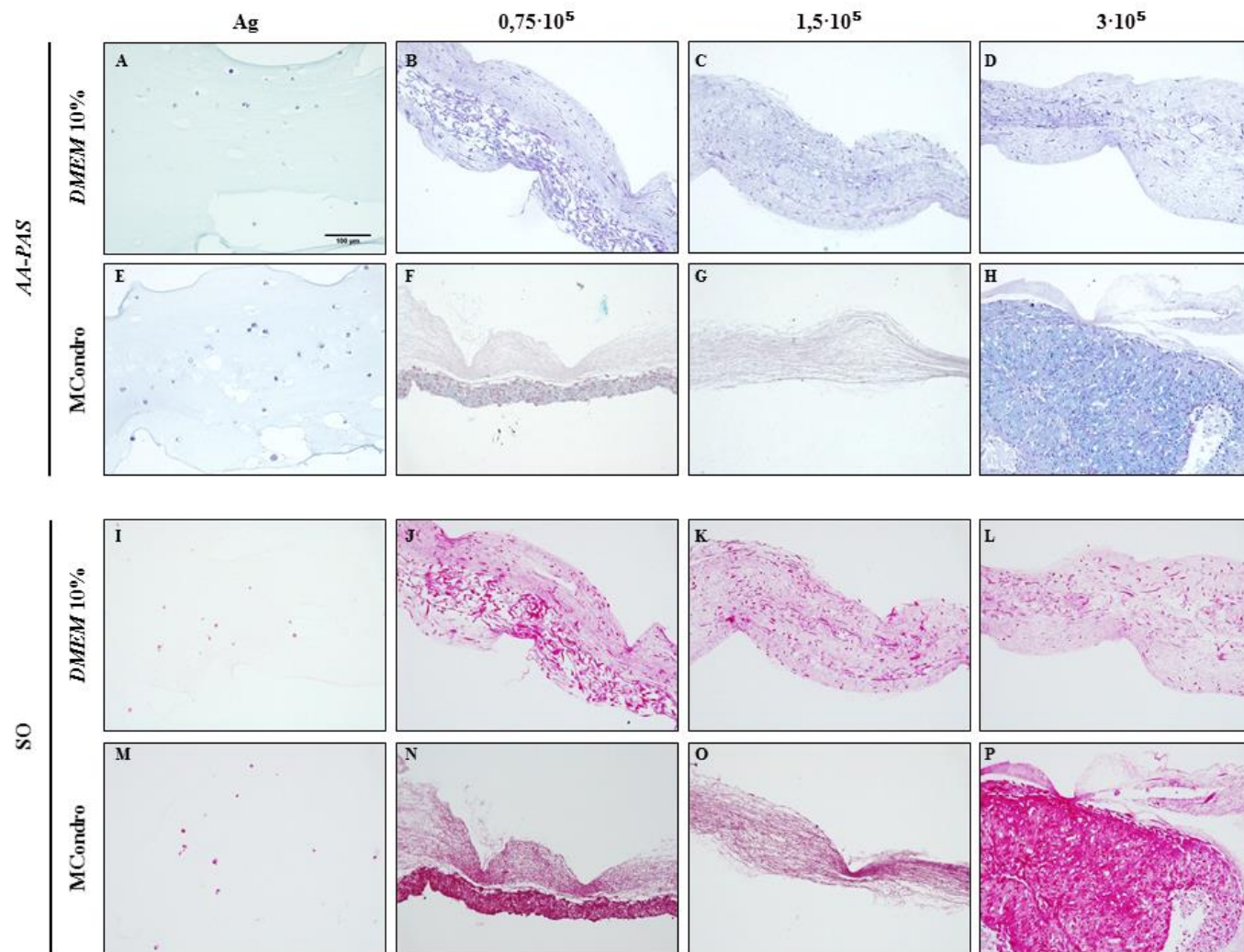


Fig. 35: Tinciones AA-PAS (A-H) y SO (I-P) en geles de Ag o PRP con $0,75$; $1,5$ o $3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l con *BM-MSCs* embebidas y cultivados en *DMEM* 10% (A-D e I-L, respectivamente) o MCondro (E-H y M-P, respectivamente) durante 21 días. Imágenes tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

5 POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DEL L-PRP EN CONDROCITOS Y CARTÍLAGO OA

Se realizaron estudios para evaluar el potencial del PRP como agente antiinflamatorio, anticatabólico y/o antioxidante para tratar la OA. Para ello, tal como se describió en el apartado 5 de Material y Métodos, se utilizaron condrocitos y cartílago OA en un modelo de inflamación *in vitro*, utilizando IL-1 β (5 ng/ml) como estímulo proinflamatorio y ocho condiciones de co-estimulación (10% (v/v)) con L-PRP0-15. Además, se incluyó un control sin IL-1 β cultivado en DMEM 10% (Basal).

5.1 Efectos del L-PRP sobre la expresión génica de mediadores proinflamatorios en condrocitos OA

Se estudiaron los efectos de los distintos L-PRPs sobre la expresión génica de los principales mediadores implicados en la progresión de la enfermedad, incluyendo aquellos que contribuyen a la inflamación crónica (IL-6, TNF α , IL-8, IL-1 β y las enzimas de síntesis de PGE $_2$, COX-2 y PTGES), la destrucción del cartílago (MMP-13) y el aumento de las especies reactivas de nitrógeno (NOS2). También se evaluó la influencia en los niveles de IL-1Ra. Se analizaron por separado condrocitos de rodilla y de cadera (n \geq 3).

Efecto sobre la expresión de IL-6

La estimulación de los condrocitos OA de rodilla (OAr) y OA de cadera (OAc) con IL-1 β supuso un incremento significativo en la expresión de IL-6 con respecto a la condición Basal sin estimular. En todos los casos, los L-PRPs redujeron de forma significativa la expresión génica de esta citoquina en ambos tipos articulares. En promedio, la expresión de IL-6 se vio inhibida en proporciones similares en ambos tipos articulares, siendo de un 64,5 \pm 3,6% en condrocitos OAr (Fig. 36A), y de un 66,8 \pm 4,7% en condrocitos OAc (Fig. 36B). Sin embargo, los condrocitos OAr y OAc mostraron tendencias ligeramente diferentes al ser co-estimulados con los distintos L-PRPs. En los condrocitos OAr, el aumento en la dosis plaquetaria resultó en una mayor inhibición de la expresión de IL-6, siendo máxima al ser co-estimulado con L-PRP6 (79,2 \pm 2,9%) y mínima con L-PRP0 (51,2 \pm 19,2%). Solamente con L-PRP3 y L-PRP6 se alcanzaron valores de expresión no significativamente diferentes del Basal. En cambio, los condrocitos OAc mostraron una tendencia opuesta, siendo las dosis plaquetarias inferiores las que produjeron un mayor efecto antiinflamatorio; en este caso, la co-estimulación con L-PRP0 resultó en una

inhibición máxima del $80,4\pm 1,8\%$, mientras que el efecto mínimo se encontró con L-PRP6 ($49,6\pm 13,0\%$). No obstante, en ninguno de los dos casos se encontraron diferencias significativas entre las distintas dosis de plaquetas testadas.

Por lo tanto, los condrocitos procedentes de articulaciones *OAr* y *OAc* mostraron tendencias opuestas en la co-estimulación con IL-1 β más L-PRP0-15. Los L-PRP0-0,75, correspondientes a las cuatro dosis inferiores de plaquetas testadas, fueron más efectivos en condrocitos *OAc*, mientras que L-PRP1,5-15, correspondientes a las cuatro dosis plaquetarias superiores, mostraron un mayor efecto antiinflamatorio al ser aplicados a condrocitos *OAr*.

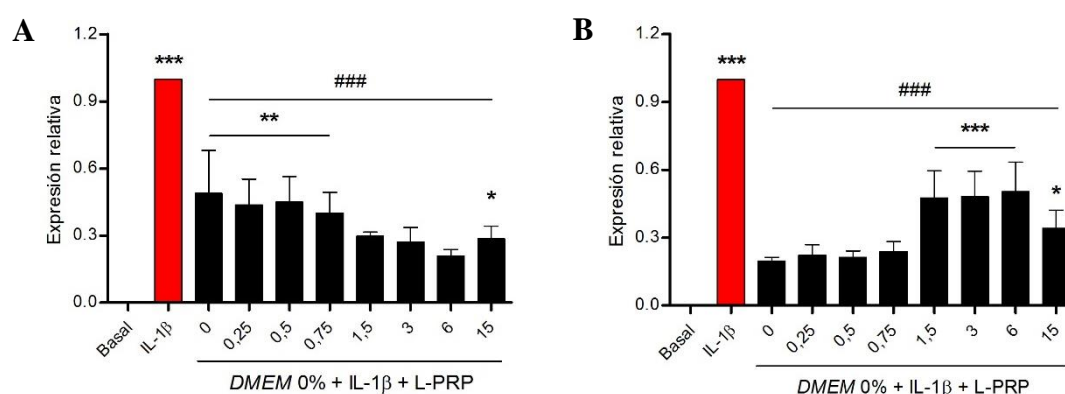


Fig. 36: Expresión génica del marcador IL-6 en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,0001), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (### p <0,0001).

Efecto sobre la expresión de IL-8

El estímulo de IL-1 β provocó un incremento significativo de la expresión de IL-8 con respecto a la condición Basal no estimulada, tanto en condrocitos *OAr* como en condrocitos *OAc* (Fig. 37). La adición de L-PRP0-15 produjo efectos diferenciales en función del tipo articular. En condrocitos *OAr* (Fig. 37A), todos los L-PRPs mostraron un efecto antiinflamatorio moderado, con un promedio de $39,6\pm 1,6\%$, teniendo L-PRP3 un efecto inhibitor máximo ($45,0\pm 12,4\%$) y L-PRP0,25 un efecto inhibitor mínimo ($34,7\pm 16,9\%$), aunque las diferencias no fueron significativas respecto al valor de IL-1 β . En cambio, en condrocitos *OAc* (Fig. 37B), aunque las concentraciones inferiores (L-PRP0-0,75) también inhibieron moderadamente la expresión de IL-8 ($53,3\pm 3,0\%$ de media, valor máximo $61,6\pm 6,6\%$ (L-PRP0)), se encontró una drástica inversión de efecto antiinflamatorio a efecto proinflamatorio al aumentar la dosis plaquetaria. Así, las dosis superiores (L-

PRP1,5-15) promovieron la expresión de IL-8 de manera significativa en un promedio de $161,3 \pm 8,0\%$ (respecto al valor de la condición IL-1 β), siendo L-PRP3 el lisado con un efecto proinflamatorio más acusado ($176,7 \pm 41,3\%$).

Resumiendo, los condrocitos procedentes de articulaciones *OAr* y *OAc* mostraron tendencias desiguales en la co-estimulación con IL-1 β más L-PRP0-15. En los condrocitos *OAr*, todos los L-PRPs mostraron indistintamente un efecto inhibitor moderado. En los condrocitos *OAc*, las concentraciones plaquetarias inferiores (L-PRP0-0,75) mostraron también un efecto antiinflamatorio moderado y sin diferencias entre dosis, mientras que el aumento de dicha dosis (L-PRP1,5-15) produjo un destacado efecto proinflamatorio.

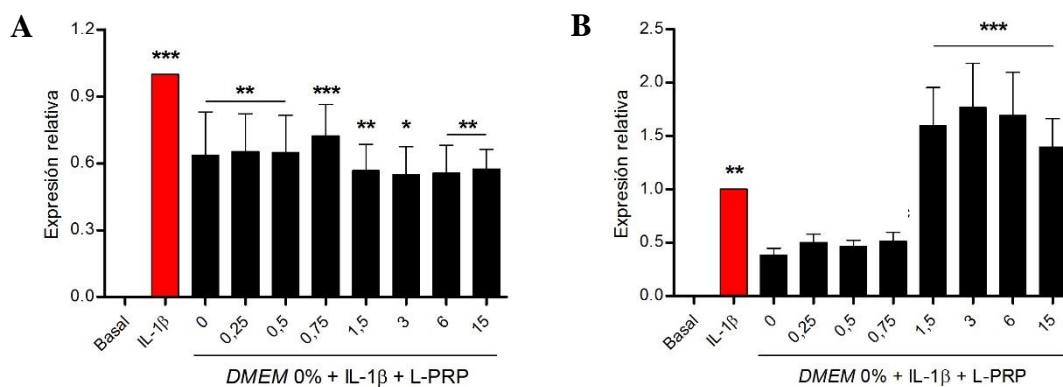


Fig. 37: Expresión génica del marcador IL-8 en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,0001$).**

Efecto sobre la expresión de TNF α

Tomando como referencia la condición Basal sin estimular, la expresión de TNF α se vio incrementada significativamente tras la estimulación de los condrocitos *OAr* y *OAc* con IL-1 β (Fig. 38). La co-estimulación con L-PRP0-15 redujo apreciablemente la expresión de este marcador proinflamatorio en ambos casos y, de nuevo, con respuestas particulares para cada tipo articular. En condrocitos *OAr*, los L-PRPs produjeron una inhibición media del $86,4 \pm 2,8\%$ (Fig. 38A). El efecto antiinflamatorio máximo fue con L-PRP3 ($92,2 \pm 4,9\%$) y el mínimo con L-PRP0 ($69,5 \pm 18,2\%$) pero no se detectaron diferencias significativas entre las distintas dosis. Para los condrocitos *OAc* (Fig. 38B), se observó una tendencia diferente, siendo L-PRP0,5 la dosis más efectiva ($94,4 \pm 1,4\%$). L-PRP0-0,75 aportaron reducciones mayores y L-PRP1,5 fue la dosis que menos efecto antiinflamatorio mostró ($69,4 \pm 14,2\%$).

De esta manera, en los condrocitos *OAc* se detectó una tendencia dosis-dependiente positiva, aumentando la expresión de *TNF α* con el incremento de la dosis de plaquetas. En definitiva, respecto a la expresión del marcador *TNF α* , la co-estimulación con los L-PRPs mostró una tendencia característica para cada tipo articular en lo referente a la influencia de la dosis plaquetaria, siendo las dosis inferiores más efectivas en condrocitos *OAc*, y no habiendo diferencias entre dosis en condrocitos *OAr*.

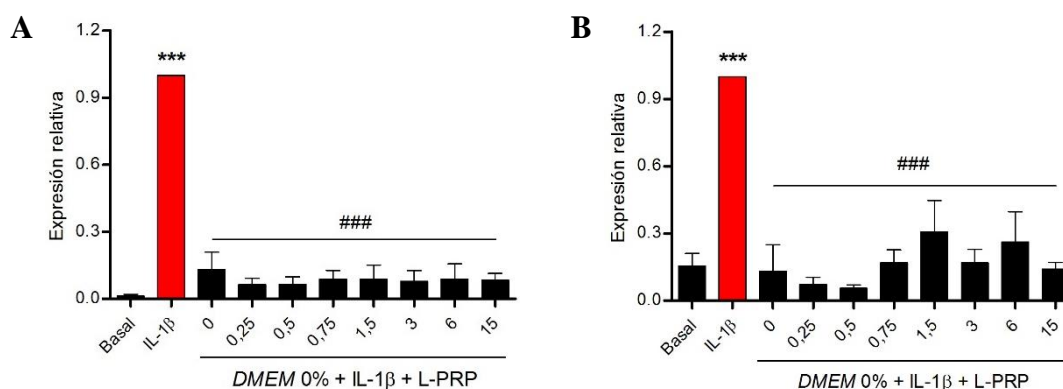


Fig. 38: Expresión génica del marcador *TNF α* en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (### $p < 0,0001$).

Efecto sobre la expresión de IL-1 β

En el caso del marcador IL-1 β , la expresión génica aumentó significativamente con respecto a la condición Basal tras la estimulación de los condrocitos *OAr* y *OAc* con IL-1 β , tal y como se esperaba (Fig. 39). La co-estimulación con L-PRP0-15 mostró resultados diferenciados en función del tipo articular. En los condrocitos *OAr*, la co-estimulación con L-PRP0-15 no alteró significativamente la expresión de este marcador en ningún caso, mostrando tan solo una leve tendencia hacia la inhibición dependiente de dosis (Fig. 39A). Por otra parte, en los condrocitos *OAc*, la co-estimulación con L-PRP0-0,5 resultó en una reducción media del $91,4 \pm 1,3\%$; L-PRP0,75 no modificó la expresión y L-PRP1,5-15 promovieron la expresión de IL-1 β un $496,9 \pm 48,5\%$ (Fig. 39B).

Por consiguiente, la co-estimulación de condrocitos *OAr* con IL-1 β más L-PRP0-15 no moduló la expresión de IL-1 β en ningún caso, mientras que la co-estimulación de condrocitos *OAc* evidenció un efecto antiinflamatorio de las dosis inferiores (L-PRP0-0,5) y un efecto proinflamatorio de las dosis superiores (L-PRP1,5-15).

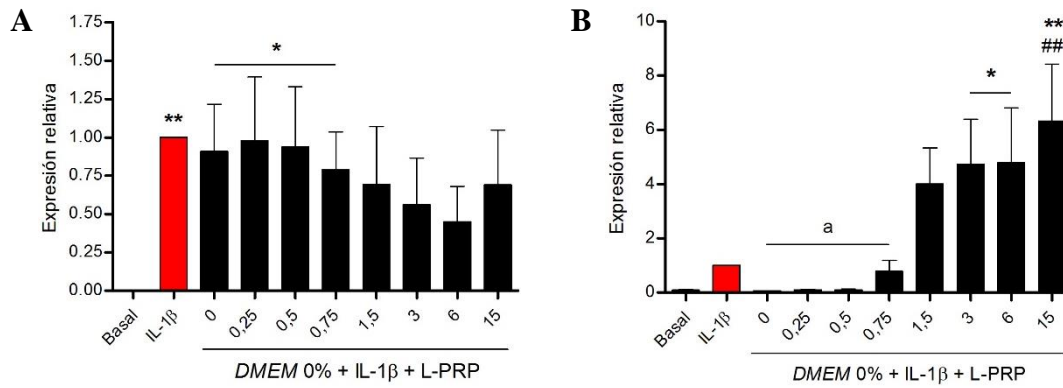


Fig. 39: Expresión génica del marcador IL-1β en condrocitos OAr (A) y OAc (B) co-estimulados con IL-1β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1β. *diferencia significativa con respecto a Basal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), #diferencia significativa con respecto a IL-1β (### $p < 0,01$), ^adiferencia significativa con respecto a L-PRP15 (^a $p < 0,05$).

Efecto sobre la expresión de IL-1Ra

También se estudió mediante *qRT-PCR* la expresión de IL-1Ra inducida por IL-1β en los condrocitos, en este caso de rodilla, en las condiciones ensayadas (Fig. 40).

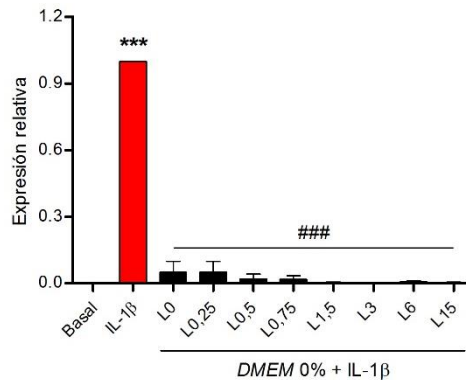


Fig. 40: Expresión génica del marcador IL-1Ra en condrocitos OAr co-estimulados con IL-1β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1β. *diferencia significativa con respecto a Basal (***) $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1β (### $p < 0,0001$).

Como se puede ver, la IL-1β indujo significativamente la expresión de IL-1Ra con respecto a la condición Basal sin estimular. La co-estimulación con los lisados L-PRP0-15 disminuyó significativamente su expresión en todos los casos, con independencia de la concentración de plaquetas.

Efecto sobre la expresión de las enzimas de síntesis de PGE₂: COX-2 y PTGES

En el caso de la PGE₂, los análisis de biología molecular se centraron en dos de las principales enzimas implicadas en su ruta de síntesis: COX-2, la enzima inducible que cataliza la primera reacción de la ruta de síntesis de prostanoïdes a partir del ácido araquidónico en condiciones inflamatorias, y PTGES, la enzima que cataliza la síntesis de PGE₂ a partir de la prostaglandina H₂ producida por COX-2.

La expresión de COX-2 y PTGES en condrocitos *OAr* y *OAc* estimulados con IL-1 β aumentó significativamente con respecto a la condición Basal (Fig. 41 y Fig. 42). En los condrocitos *OAr*, la co-estimulación con L-PRP0-15 redujo significativamente la expresión de ambas enzimas, con independencia de la dosis plaquetaria. En promedio, la expresión de COX-2 se vio reducida en un 85,8 \pm 0,5% (Fig. 41A), mientras que la expresión de PTGES disminuyó de forma más moderada (56,8 \pm 2,9%) (Fig. 42A). En ninguno de los dos marcadores se pudo identificar una influencia clara de la concentración de plaquetas. Por otra parte, la expresión de COX-2 también se vio reducida significativamente tras la co-estimulación de los condrocitos *OAc* con L-PRP0-15 (Fig. 41B), mostrando una inhibición media del 86,8 \pm 5,3%. El efecto antiinflamatorio fue máximo con L-PRP15 (99,5 \pm 0,2%) y mínimo con L-PRP3 (57,7 \pm 8,5%), y no se pudo identificar ninguna tendencia en función de la dosis plaquetaria. En el caso de PTGES, se detectó una tendencia dosis-dependiente positiva (Fig. 42B): los lisados L-PRP0-1,5 redujeron significativamente su expresión con respecto a IL-1 β , pero el efecto inhibitor se perdió con L-PRP3-15. La inhibición fue máxima con L-PRP0 (77,7 \pm 0,3%) y mínima con L-PRP6 (24,9 \pm 12,7%).

En definitiva, la expresión génica de las enzimas COX-2 y PTGES fue inhibida significativamente en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15, si bien los lisados L-PRP3-15 no resultaron antiinflamatorios en el caso de los condrocitos *OAc*.

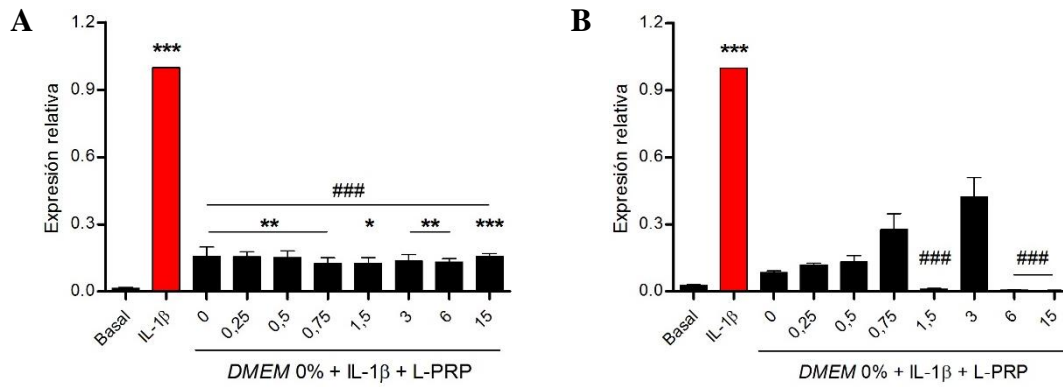


Fig. 41: Expresión génica del marcador COX-2 en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (* p <0,05, ** p <0,01, * p <0,0001), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (### p <0,0001).**

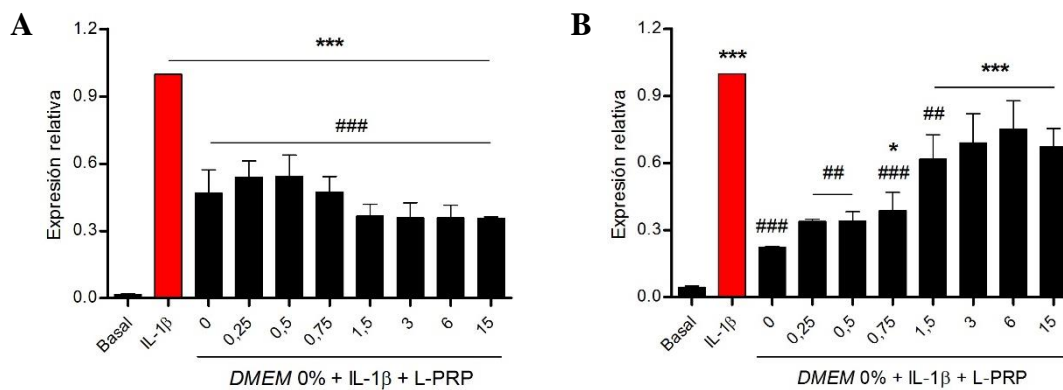


Fig. 42: Expresión génica del marcador PTGES en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (p <0,0001), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (## p <0,01, ### p <0,0001).**

Efecto sobre la expresión de MMP-13

La estimulación de condrocitos *OAr* y *OAc* con IL-1 β resultó en un incremento significativo en la expresión de *MMP-13* con respecto a la condición Basal sin estimular. La co-estimulación con los lisados L-PRP0-15 inhibió de manera significativa la expresión de este marcador en ambos tipos articulares, con independencia de la dosis plaquetaria. En condrocitos *OAr* se observó una reducción media del $95,7\pm 0,2\%$ (Fig. 43A), y en condrocitos *OAc* fue del $90,7\pm 2,8\%$ (Fig. 43B). En los condrocitos *OAr* no se detectó ninguna tendencia apreciable en función de la dosis plaquetaria. Por su parte, en los condrocitos *OAc* sí se detectó una tendencia dosis-dependiente positiva, aumentando la expresión de *MMP-13* con el incremento de la concentración plaquetaria; L-PRP0 produjo

una inhibición máxima ($97,9\pm0,8\%$), mientras que a partir de L-PRP3 se fue perdiendo en cierta medida el efecto antiinflamatorio y L-PRP15 mostró la inhibición más débil ($74,4\pm6,0\%$).

Por tanto, la expresión del marcador catabólico *MMP-13* se redujo significativamente tanto en condrocitos *OAr* como en condrocitos *OAc* co-estimulados con IL-1 β y los distintos L-PRPs. En condrocitos *OAr* no se pudo identificar ninguna tendencia a nivel de expresión génica y todos los L-PRPs mostraron un efecto anticatabólico equivalente. En los condrocitos *OAc*, los resultados mostraron una ligera tendencia dosis-dependiente positiva, aunque todos los L-PRPs aportaron inhibiciones significativas con respecto a la condición con solo IL-1 β .

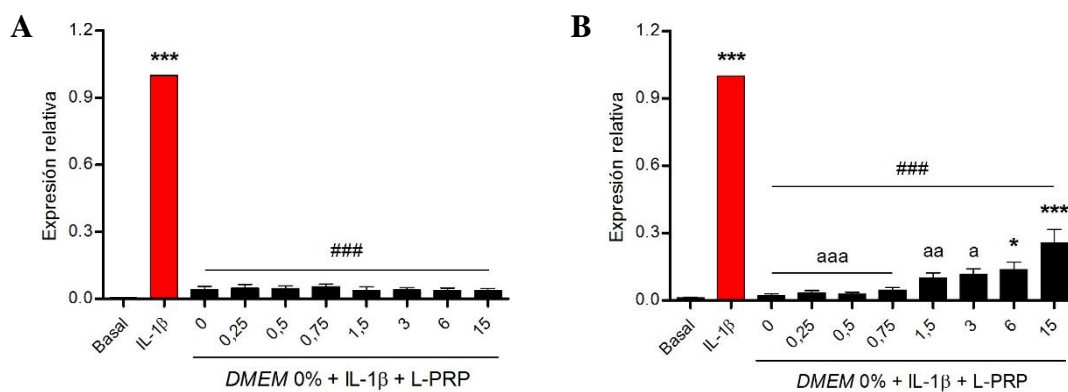


Fig. 43: Expresión génica del marcador *MMP-13* en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal ($*p<0,05$, $***p<0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β ($###p<0,0001$), ^adiferencia significativa con respecto a L-PRP15 ($^ap<0,05$, $^{aa}p<0,01$, $^{aaa}p<0,0001$).

Efecto sobre la expresión de NOS2

En condrocitos *OAr* y *OAc* estimulados con IL-1 β , la expresión de *NOS2* aumentó significativamente con respecto a la condición Basal no estimulada, tal y como era de esperar (Fig. 44). La co-estimulación con L-PRP0-15 redujo drásticamente y significativamente la expresión de este marcador en ambos tipos articulares, con independencia de la concentración de plaquetas, alcanzando prácticamente los niveles basales. La reducción media fue del $99,1\pm0,2\%$ en condrocitos *OAr* y del $99,0\pm0,1\%$ en condrocitos *OAc*.

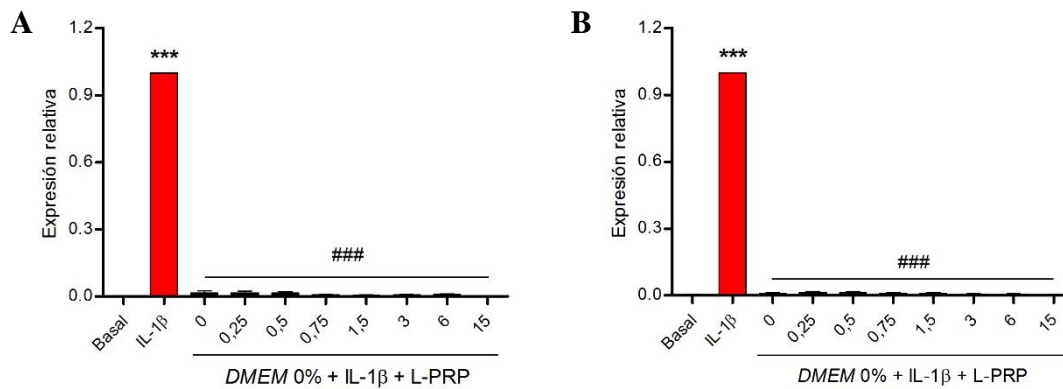


Fig. 44: Expresión génica del marcador *NOS2* en condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con **IL-1 β** (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Resultados normalizados frente a la condición estimulada con solo IL-1 β . *diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (### $p < 0,0001$).

5.2 Efectos del L-PRP sobre la secreción de mediadores proinflamatorios en condrocitos OA

A la vista de los resultados encontrados sobre la influencia de la co-estimulación con los L-PRPs en la expresión génica, se estudió su correspondencia con la abundancia proteica de dichos mediadores en el medio de cultivo celular. Se analizaron por separado condrocitos de rodilla y de cadera ($n \geq 3$). Dado que la mayoría de los mediadores estudiados están presentes en el plasma sanguíneo, en todos los casos se incluyeron, como controles de matriz, todos los medios utilizados para estimular las células. Dichos medios se incubaron en ausencia de células en todas las réplicas experimentales y las cuantificaciones resultantes, en caso de que los mediadores fuesen detectables, se emplearon para corregir las cuantificaciones correspondientes a la secreción celular.

Efecto sobre la secreción de la citoquina IL-6

Se cuantificó la producción de IL-6 en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1 β y los distintos L-PRPs (L-PRP0-15) (Fig. 45). Para ello se empleó un kit comercial de *ELISA*. La producción Basal de IL-6 fue mínima: $0,24 \pm 0,11$ ng/ml en condrocitos *OAr* (Fig. 45A) y $2,03 \pm 0,96$ ng/ml en condrocitos *OAc* (Fig. 45B). La estimulación con IL-1 β , tal y como se esperaba, indujo la síntesis de esta citoquina en los condrocitos de ambos tipos articulares, alcanzando los $288,9 \pm 75,3$ ng/ml en condrocitos *OAr* y los $171,6 \pm 25,6$ ng/ml en condrocitos *OAc*.

En los condrocitos *OAr*, los L-PRPs con dosis bajas de plaquetas (L-PRP0-0,5) inhibieron moderadamente los efectos de IL-1 β , reduciendo la concentración de esta citoquina a

valores entre $108,6 \pm 22,3$ ng/ml (L-PRP0) y $190,4 \pm 40,7$ ng/ml (L-PRP0,5). En condrocitos *OAc* también se observó un descenso moderado, reduciéndose la concentración de IL-6 a entre $130,2 \pm 72,1$ ng/ml (L-PRP0) y $139,4 \pm 91,9$ ng/ml (L-PRP0,5), si bien la variabilidad inter-donante detectada fue elevada. En cambio, los L-PRPs con concentraciones plaquetarias superiores mostraron efectos diferentes y presentaron la misma tendencia en ambos tipos articulares: o bien no tuvieron efecto inhibitorio apreciable (L-PRP0,75 en condrocitos *OAr* ($211,8 \pm 25,2$ ng/ml) y L-PRP1,5 en condrocitos *OAc* ($314,9 \pm 58,7$ ng/ml), por ejemplo), o bien actuaron en sinergia con IL-1 β para inducir una respuesta inflamatoria exacerbada (L-PRP6-15 en condrocitos *OAr* ($652,4 \pm 77,8$ - $752,3 \pm 80,7$ ng/ml) y L-PRP3-15 en condrocitos *OAc* ($425,8 \pm 53,5$ - $662,0 \pm 102,1$ ng/ml)). Es decir, la producción de IL-6 en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15 mostró una tendencia dosis-dependiente positiva, disminuyendo el efecto inhibitorio y aumentando la síntesis con el aumento de la concentración plaquetaria.

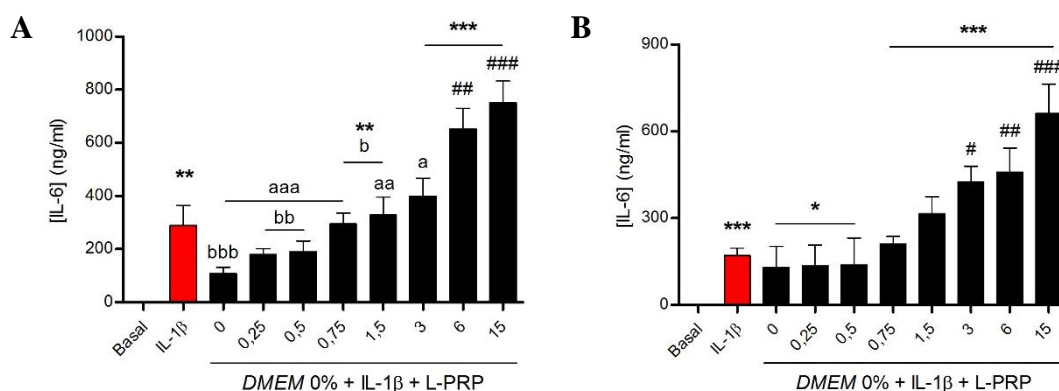


Fig. 45: Cuantificación de la citoquina IL-6 secretada por condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. *diferencia significativa con respecto a Basal (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$), ^adiferencia significativa con respecto a L-PRP15 (^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,01$, ^{aaa} $p < 0,0001$), ^bdiferencia significativa con respecto a L-PRP6 (^b $p < 0,05$, ^{bb} $p < 0,01$, ^{bbb} $p < 0,0001$).

Efecto sobre la secreción de la citoquina IL-8

La producción de IL-8 se cuantificó mediante un kit comercial de *ELISA* específico en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15. La producción Basal de IL-8 fue de $0,09 \pm 0,04$ ng/ml y la estimulación con IL-1 β indujo significativamente su síntesis hasta los $2,5 \pm 0,1$ ng/ml (Fig. 46). Al igual que se observó para la expresión génica de este marcador, la co-estimulación con los lisados L-PRP0-15 no tuvo ningún efecto.

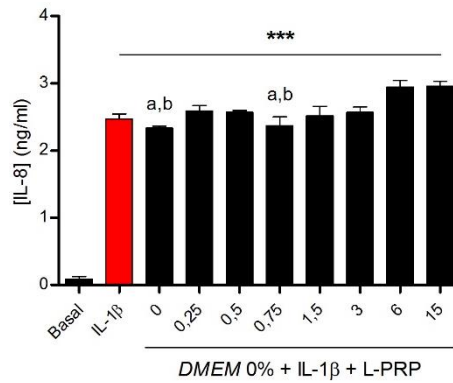


Fig. 46: Cuantificación de la citoquina IL-8 secretada por condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1β (5ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1β y la condición Basal sin estimular. *diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), ^adiferencia significativa con respecto a L-PRP15 ($p < 0,05$), ^bdiferencia significativa con respecto a L-PRP6 ($p < 0,05$).

Efecto sobre la secreción de la citoquina TNFα

Se empleó un kit comercial de ELISA específico para cuantificar la producción de TNFα en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1β y L-PRP0-15. No se detectó producción Basal de TNFα en las condiciones ensayadas y la estimulación con IL-1β indujo pronunciadamente su síntesis, alcanzando los 461,0±49,5 ng/ml (Fig. 47).

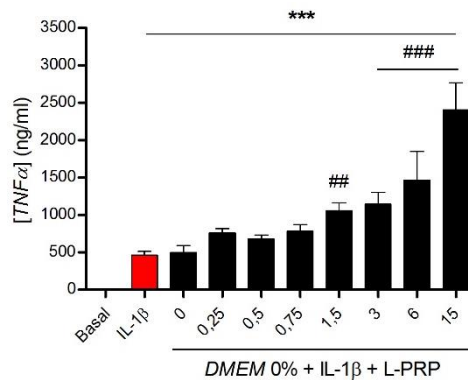


Fig. 47: Cuantificación de la citoquina TNFα secretada por condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1β y la condición Basal sin estimular. *diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1β (## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$).

La co-estimulación con L-PRP0-0,75 no moduló significativamente la síntesis de TNFα (respecto a la condición con IL-1β), si bien pudo apreciarse una suave tendencia de modulación positiva con L-PRP0,25-0,75. Sin embargo, L-PRP1,5-15 aumentaron de manera pronunciada y significativa la síntesis de esta citoquina, que alcanzó los 2.404,0±362,1 ng/ml en la condición co-estimulada con L-PRP15.

En definitiva, la producción de $TNF\alpha$ en condrocitos OAr co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15 mostró una tendencia dosis-dependiente positiva, aumentando la síntesis con el aumento de la concentración plaquetaria. Este resultado está claramente en contraposición con la respuesta detectada a nivel de expresión génica, en la que todas las dosis plaquetarias redujeron significativamente la expresión de $TNF\alpha$ y no se apreció ninguna tendencia dependiente de la dosis.

Efecto sobre la secreción de PGE_2

Se empleó un kit comercial de *ELISA* competitivo para cuantificar la síntesis del mediador fosfolipídico PGE_2 en condrocitos OAr y OAc co-estimulados con IL-1 β y los distintos L-PRPs (L-PRP0-15) (Fig. 48). La producción Basal de PGE_2 fue de $0,02\pm 0,01$ ng/ml en condrocitos OAr (Fig. 48A), y de $2,8\pm 1,8$ ng/ml en condrocitos OAc (Fig. 48B).

La estimulación con IL-1 β aumentó la síntesis de PGE_2 a $6,6\pm 2,1$ ng/ml en condrocitos OAr y, en condiciones de co-estimulación, ninguno de los lisados L-PRP0-15 disminuyó su producción. L-PRP0-0,5 no tuvieron efectos significativos, mientras que L-PRP0,75-15 produjeron un efecto sinérgico con IL-1 β y aumentaron significativamente la producción de PGE_2 . Así, la producción de PGE_2 osciló entre $12,5\pm 2,5$ ng/ml (L-PRP0) y $156,3\pm 28,4$ ng/ml (L-PRP15).

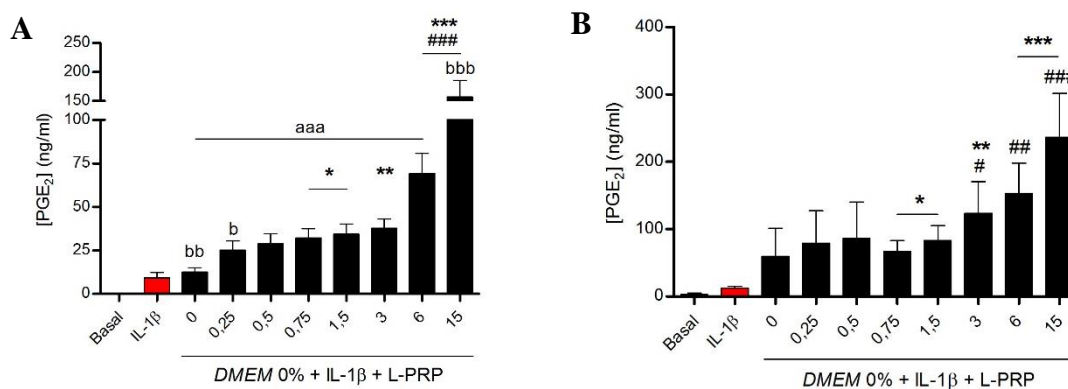


Fig. 48: Cuantificación de la PGE_2 secretada por condrocitos OAr (A) y OAc (B) co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. *diferencia significativa con respecto a Basal (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,0001), #diferencia significativa con respecto a IL-1 β (# p <0,05, ## p <0,01, ### p <0,0001), ^adiferencia significativa con respecto a L-PRP15 (aaa p <0,0001), ^bdiferencia significativa con respecto a L-PRP6 (^b p <0,05, ^{bb} p <0,01, ^{bbb} p <0,0001).

En condrocitos OAc se observó una tendencia muy parecida: la estimulación con IL-1 β aumentó la síntesis de PGE_2 a $12,1\pm 3,0$ ng/ml y, en condiciones de co-estimulación, los valores oscilaron entre $59,3\pm 41,8$ ng/ml (L-PRP0) y $236,5\pm 65,0$ ng/ml (L-PRP15).

En definitiva, la producción de PGE₂ en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15 mostró una tendencia dosis-dependiente positiva en ambos tipos articulares, aumentando la síntesis con el aumento de la concentración plaquetaria. Las tendencias encontradas en los análisis de expresión génica de las enzimas COX-2 y PTGES se contraponen a estas cuantificaciones de PGE₂ obtenidas mediante *ELISA*, ya que ambas disminuyeron significativamente en la co-estimulación con L-PRP0-15.

Efecto sobre la secreción de MMP-13

La producción de *MMP-13* se cuantificó en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15 (Fig. 49). Para ello se empleó un kit comercial de *ELISA* para *MMP-13* total, es decir, para todas las formas de *MMP-13* que se pueden encontrar presentes de forma natural en el ser humano: la pro-enzima inactiva, la *MMP-13* madura activa, y la *MMP-13* capturada por el inhibidor *TIMP-1*. La producción Basal de *MMP-13* en condrocitos *OAr* (Fig. 49A) y en condrocitos *OAc* (Fig. 49B) fue de 3,0 \pm 1,2 ng/ml y de 11,5 \pm 6,7 ng/ml, respectivamente. En los condrocitos de ambos tipos articulares, la estimulación con IL-1 β provocó un marcado y significativo incremento en la producción de *MMP-13*, que alcanzó los 31,2 \pm 6,4 ng/ml en condrocitos *OAr* y los 52,3 \pm 21,9 ng/ml en condrocitos *OAc*. La síntesis de *MMP-13* fue modulada negativamente al co-estimular las células con L-PRP0-15 en ambos casos.

La alta variabilidad de la respuesta en los condrocitos *OAc* (por ejemplo, 16,4 \pm 12,5 ng/ml (L-PRP0) y 33,8 \pm 28,3 ng/ml (L-PRP0,25) como valores extremos) no permitió diferenciar una influencia clara de la dosis plaquetaria. Sin embargo, ésta es evidente en los condrocitos *OAr*, en los que el aumento de la concentración de plaquetas va reduciendo paulatinamente el efecto anticatabólico. Así, en los condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β más L-PRP0-15, la producción de *MMP-13* osciló entre los 4,6 \pm 0,6 ng/ml (L-PRP0) y los 22,2 \pm 4,9 ng/ml (L-PRP15), aunque solo perdió la significación respecto a la condición con solo IL-1 β para los L-PRPs de concentraciones más altas, L-PRP6 y L-PRP15.

Por lo tanto, la producción de *MMP-13* en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15 mostró una inhibición del efecto catabólico de la IL-1 β con todas las dosis plaquetarias testadas, excepto L-PRP6 y L-PRP15, y con una tendencia dosis-dependiente positiva, mientras que en condrocitos *OAc* la alta variabilidad no permitió detectar diferencias significativas.

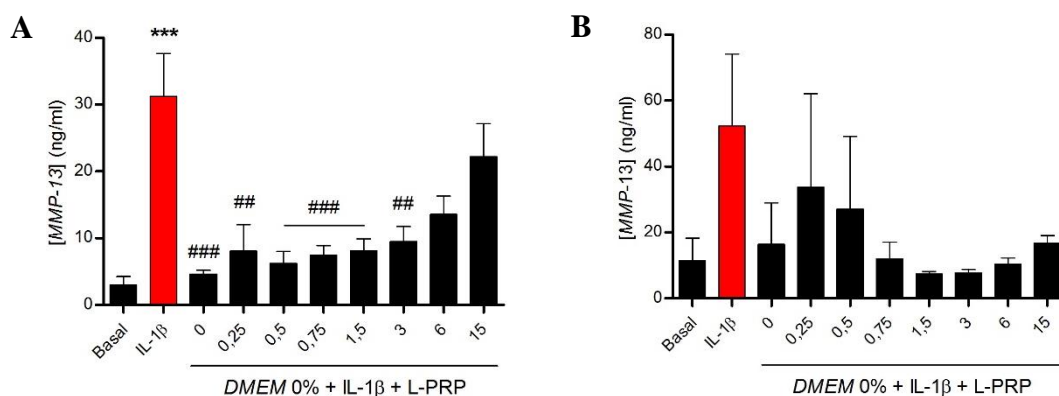


Fig. 49: Cuantificación de la *MMP-13* secretada por condrocitos *OAr* (A) y *OAc* (B) co-estimulados con *IL-1β* (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo *IL-1β* y la condición Basal sin estimular. *diferencia significativa con respecto a Basal (***) $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a *IL-1β* (## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$).

5.3 Efectos del L-PRP sobre la expresión proteica de enzimas involucradas en el proceso inflamatorio en condrocitos *OA*

Efecto sobre la expresión de NOS2

La modulación del mediador proinflamatorio *NOS2* en la co-estimulación de los condrocitos *OAr* y *OAc* con *IL-1β* y los lisados L-PRP0-15 se comprobó mediante diferentes técnicas de análisis proteico. No fue posible realizar la cuantificación del *NO* producido por la enzima con el reactivo de Griess, ya que los L-PRPs interfirieron con las mediciones. En primer lugar, se empleó la técnica de *WB* para cuantificar la cantidad de enzima producida por los condrocitos. En las Fig. 50 y Fig. 51 se muestra un ejemplo representativo de una imagen de *WB* (A) y la cuantificación por densitometría (B) para condrocitos *OAr* (Fig. 50, $n=4$) y *OAc* (Fig. 51, $n=3$), respectivamente. Tanto en condrocitos *OAr* como en condrocitos *OAc*, la estimulación con *IL-1β* aumentó significativamente la cantidad de *NOS2*. En ambos tipos articulares, la co-estimulación con L-PRP0-15 inhibió significativamente la expresión de esta enzima, alcanzando prácticamente los niveles basales, con independencia de la dosis de plaquetas. En condrocitos *OAr*, la inhibición media fue del $76,3 \pm 2,3\%$, mientras que en condrocitos *OAc* fue del $83,8 \pm 2,4\%$. En ninguno de los dos casos se detectaron diferencias significativas entre las distintas dosis de plaquetas testadas.

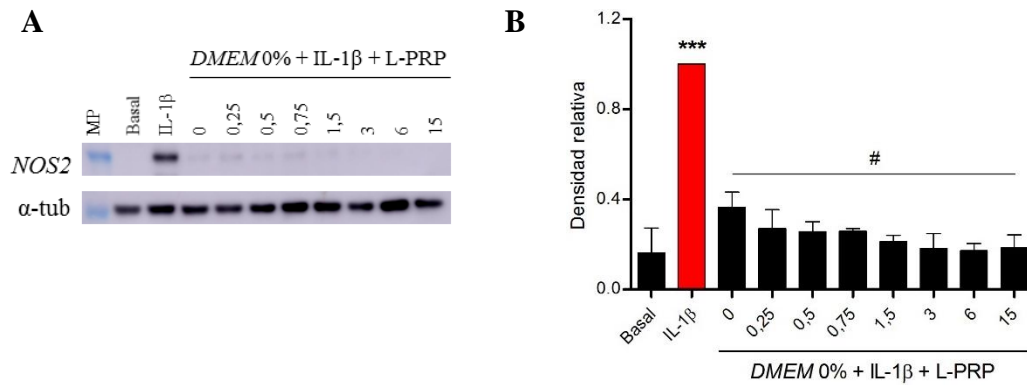


Fig. 50: Cuantificación de la *NOS2* intracelular sintetizada por condrocitos *OAr* co-estimulados con **IL-1β** (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo **IL-1β** y la condición Basal sin estimular. (A) Imagen representativa de una membrana de WB, MP: marcador de peso molecular; (B) densitometría. ***diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1β ($p < 0,05$).

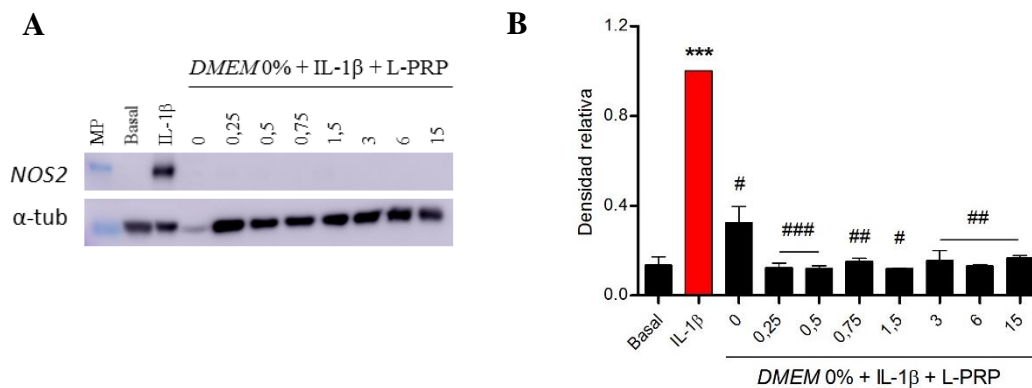


Fig. 51: Cuantificación de la *NOS2* intracelular sintetizada por condrocitos *OAc* co-estimulados con **IL-1β** (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo **IL-1β** y la condición Basal sin estimular. (A) Imagen representativa de una membrana de WB, (B) densitometría. ***diferencia significativa con respecto a Basal (** $p < 0,0001$), #diferencia significativa con respecto a IL-1β ($p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$).

Es decir, en condrocitos *OAr* y *OAc* co-estimulados con IL-1β más L-PRP0-15, la expresión proteica de *NOS2* fue inhibida significativamente en todos los casos y no se detectó ninguna tendencia clara asociada a la dosis plaquetaria. Tampoco se observaron diferencias en los efectos sobre condrocitos *OAr* u *OAc*.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en las pruebas de expresión génica y se confirmaron también mediante estudios de ICQ, como se puede observar en las Fig. 52 y Fig. 53 para condrocitos *OAr* y *OAc*, respectivamente.

Tal y como se esperaba, la estimulación de ambos tipos celulares con IL-1β resultó en un mayor número de células positivas para *NOS2*, además de una mayor intensidad de la señal (en color marrón) en comparación con el control Basal sin estimular. Esta positividad se redujo en gran medida en las condiciones de co-estimulación con L-PRP0-15, tanto en

condrocitos *OAr* (Fig. 52C-J) como en condrocitos *OAc* (Fig. 53C-J), con independencia de la concentración de plaquetas.

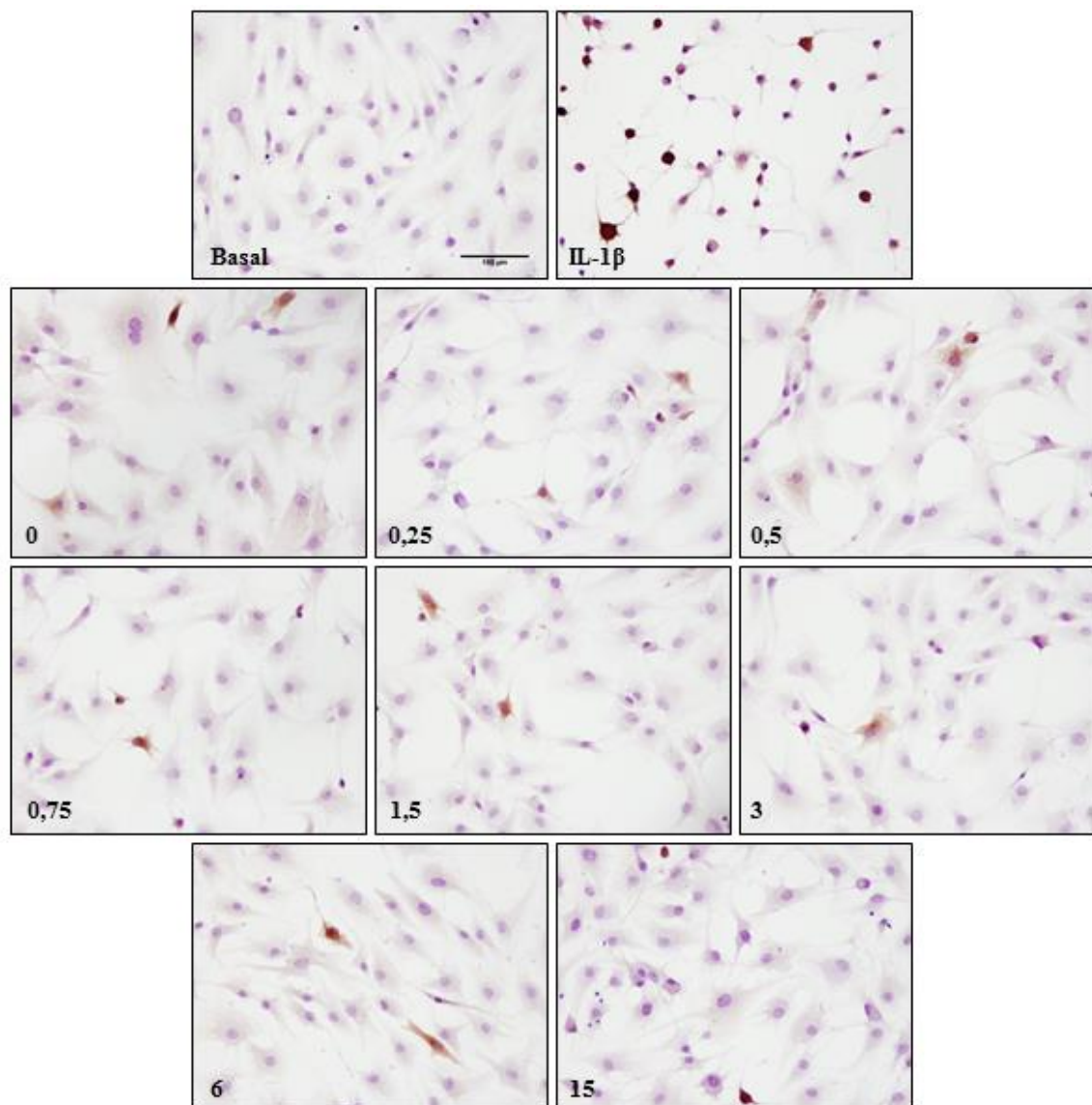


Fig. 52: Tinción ICQ de NOS2 intracelular en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

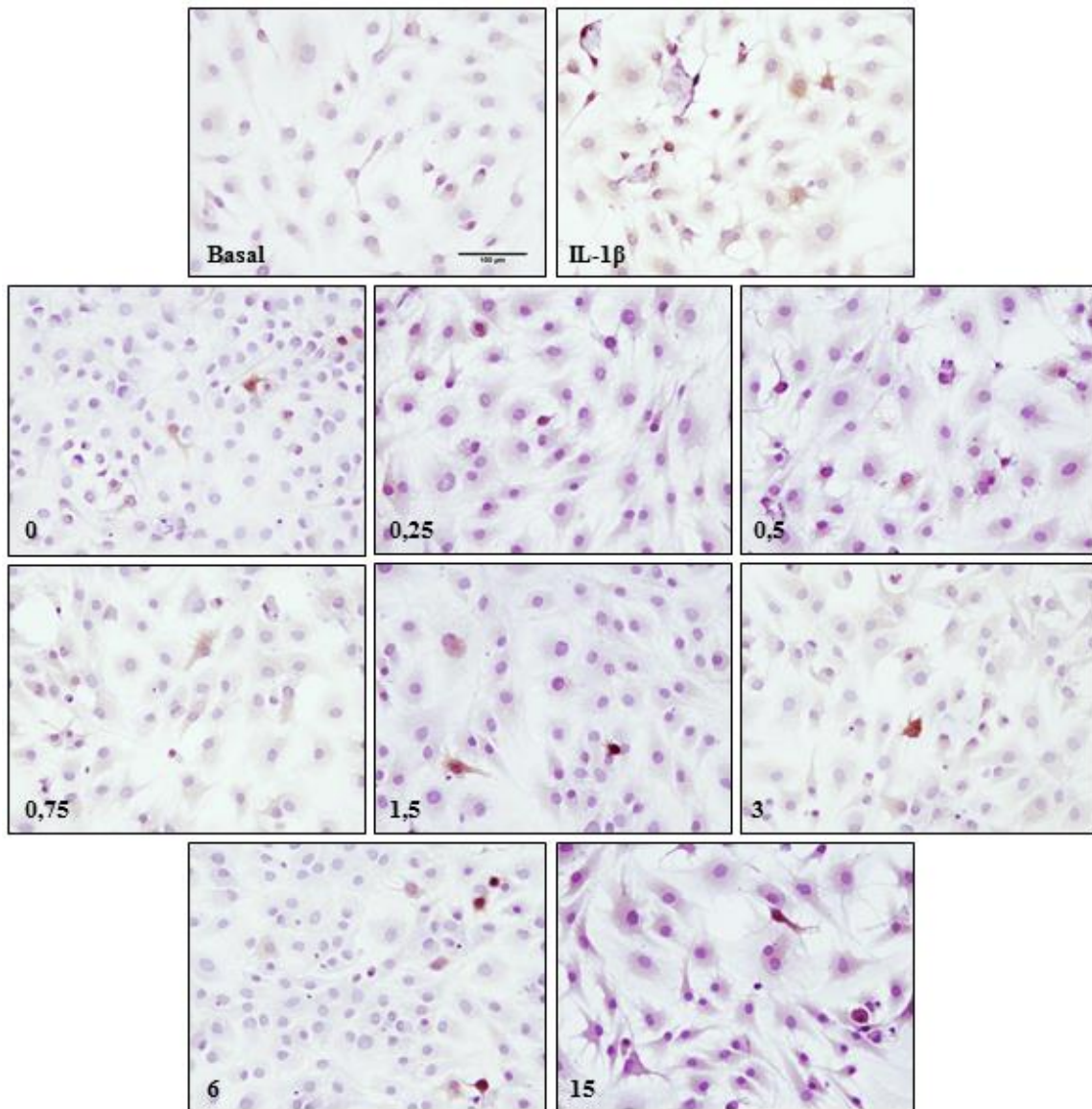


Fig. 53: Tinción ICQ de *NOS2* intracelular en condrocitos *OAc* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

Efecto sobre la expresión de COX-2

La técnica de *WB* se empleó también para comprobar la modulación a nivel proteico del marcador COX-2 en condrocitos co-estimulados con IL-1 β y L-PRP0-15. Como se puede observar en las Fig. 54 y Fig. 55 para condrocitos *OAr* (n=4) y *OAc* (n=3), respectivamente, la positividad observada en las membranas (Fig. 54A y Fig. 55A, para *OAr* y *OAc*, respectivamente) y cuantificada por densitometría (Fig. 54B y Fig. 55B, para *OAr* y *OAc*, respectivamente) confirmó el incremento en la cantidad de COX-2 en ambos tipos celulares al estimularlos con IL-1 β , en comparación con la condición Basal sin estimular.

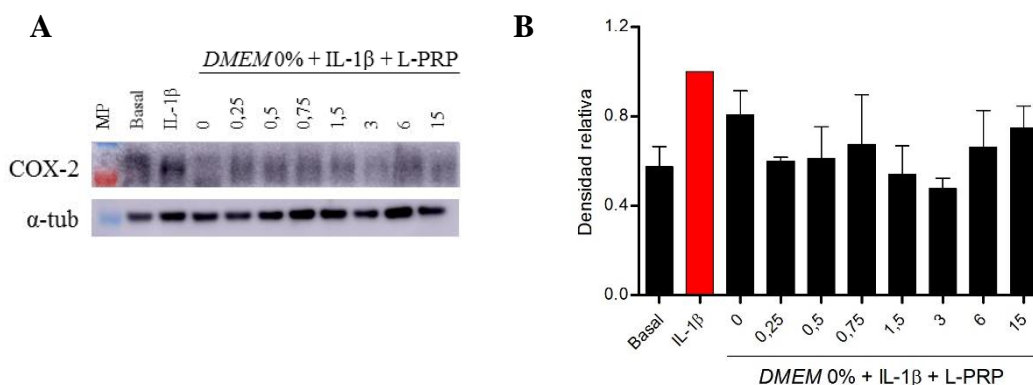


Fig. 54: Cuantificación de la COX-2 intracelular sintetizada por condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. (A) Imagen representativa de una membrana de WB, (B) densitometría. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones ensayadas.

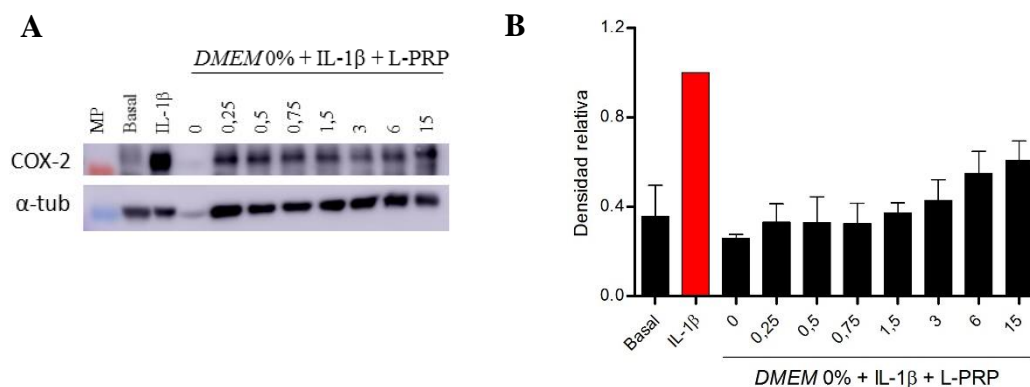


Fig. 55: Cuantificación de la COX-2 intracelular sintetizada por condrocitos *OAc* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. (A) Imagen representativa de una membrana de WB, (B) densitometría. No se detectaron diferencias significativas entre las distintas condiciones ensayadas.

La co-estimulación con L-PRP0-15 inhibió en mayor o menor medida la expresión proteica de la enzima en ambos tipos articulares, si bien la elevada variabilidad entre donantes impidió observar diferencias significativas. En el caso de los condrocitos *OAr* (Fig. 54), la reducción fue modesta y la media fue de un $36,1 \pm 3,8\%$, siendo mínima con L-PRP0 ($19,5 \pm 10,8\%$) y máxima con L-PRP3 ($52,5 \pm 4,7\%$). La inhibición fue más evidente en los condrocitos *OAc* (Fig. 55) y se pudo identificar una leve tendencia dosis-dependiente positiva, con un incremento paulatino de la positividad al aumentar la dosis plaquetaria, aunque tampoco resultó en diferencias estadísticamente significativas.

Por lo tanto, la co-estimulación con IL-1 β y L-PRP0-15 en condrocitos *OAr* y *OAc* inhibió la expresión proteica de COX-2, confirmando los resultados obtenidos mediante *qRT-PCR*. Estos resultados también se comprobaron mediante estudios de ICQ (Fig. 56 y Fig. 57).

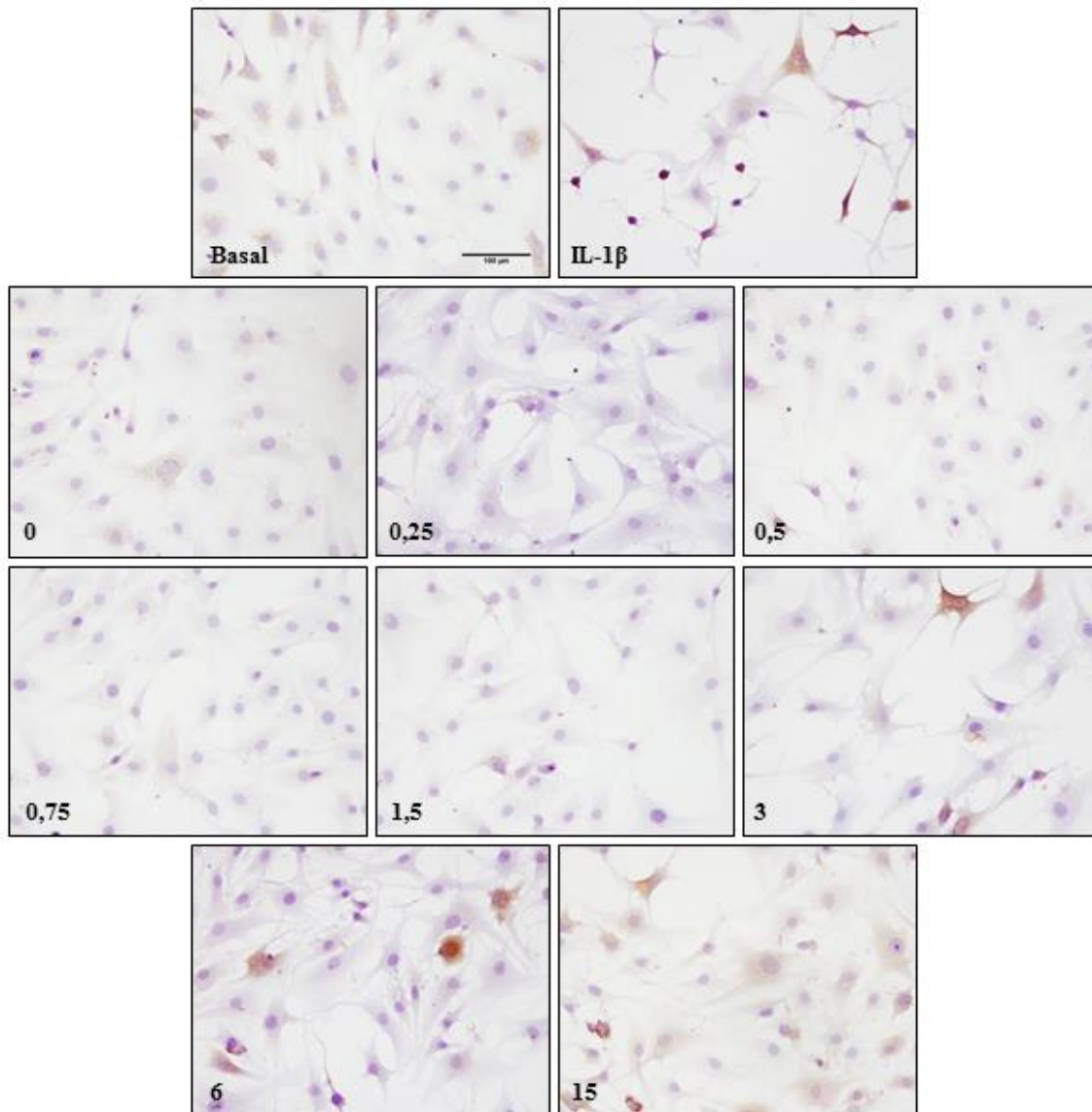


Fig. 56: Tinción ICQ de COX-2 intracelular en condrocitos *OAr* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en DMEM 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

Como era de esperar, en comparación con la condición Basal, la estimulación con IL-1 β resultó en un mayor número de condrocitos *OAr* y *OAc* positivos para COX-2, que además presentaron una mayor intensidad (color marrón). Las condiciones co-estimuladas con los L-PRPs presentaron una positividad reducida en gran medida en ambos tipos articulares. No obstante, el efecto antiinflamatorio fue inferior con los lisados L-PRP3-15 en condrocitos *OAr* (Fig. 56H-J), y los lisados L-PRP6-15 en condrocitos *OAc* (Fig. 57I-J). Así, las tinciones ICQs apoyaron tanto las pruebas de *qRT-PCR* como las cuantificaciones de COX-2 por *WB*.

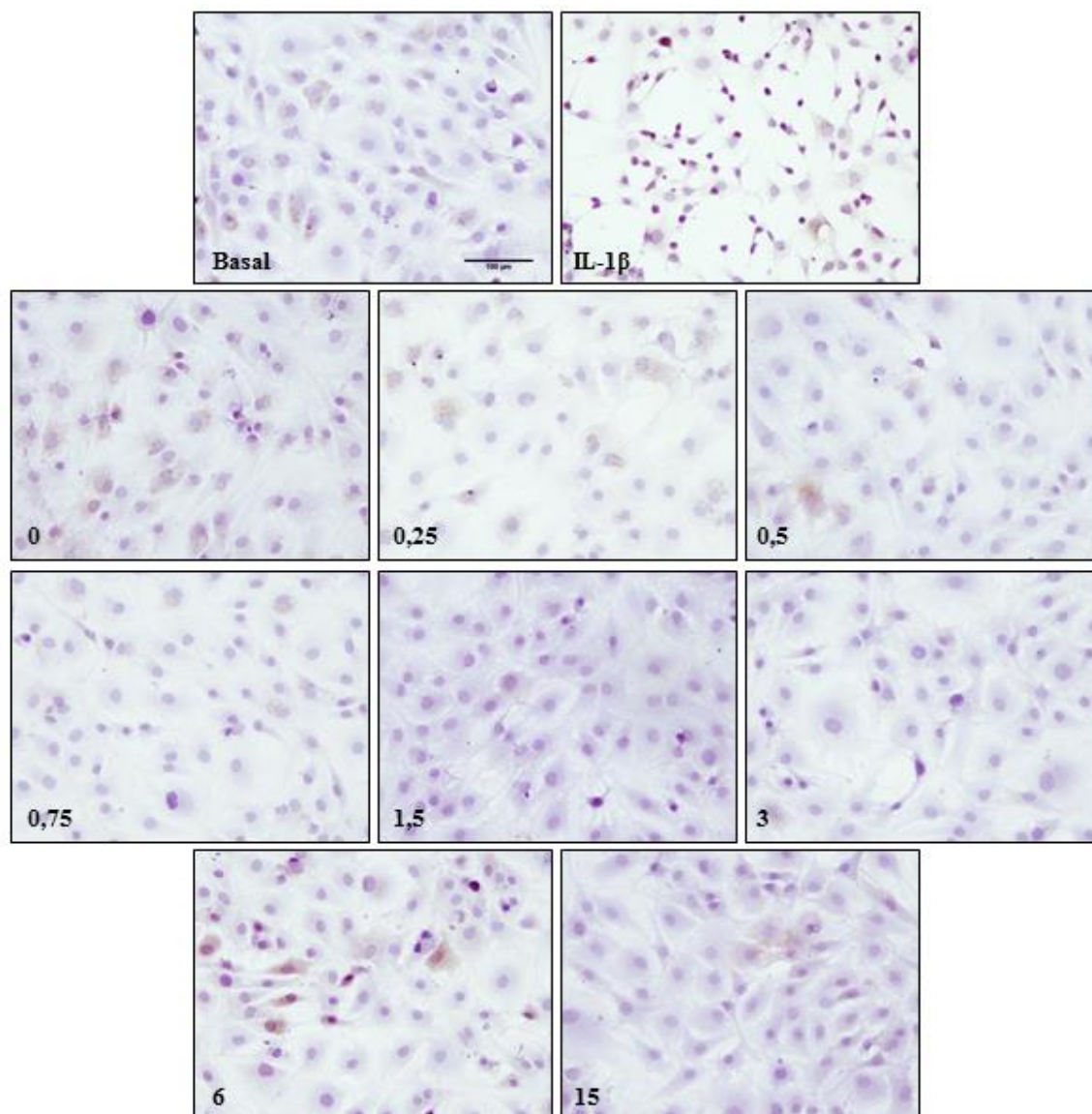


Fig. 57: Tinción ICQ de COX-2 intracelular en condrocitos *OAc* co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

Efecto sobre la expresión de MMP-13

En el caso del marcador *MMP-13*, la cuantificación proteica mediante *ELISA* y el análisis de *qRT-PCR* se confirmaron mediante un estudio de ICQ (Fig. 58 y Fig. 59). Como era esperable, en comparación con la condición Basal sin estimular, la estimulación con IL-1 β produjo un mayor número de células *OAr* y *OAc* positivas, en las que, además, la positividad fue mayor (color marrón). La co-estimulación con L-PRP0-15 redujo en gran medida la señal positiva, con aparente independencia de la dosis plaquetaria para ambos tipos articulares.

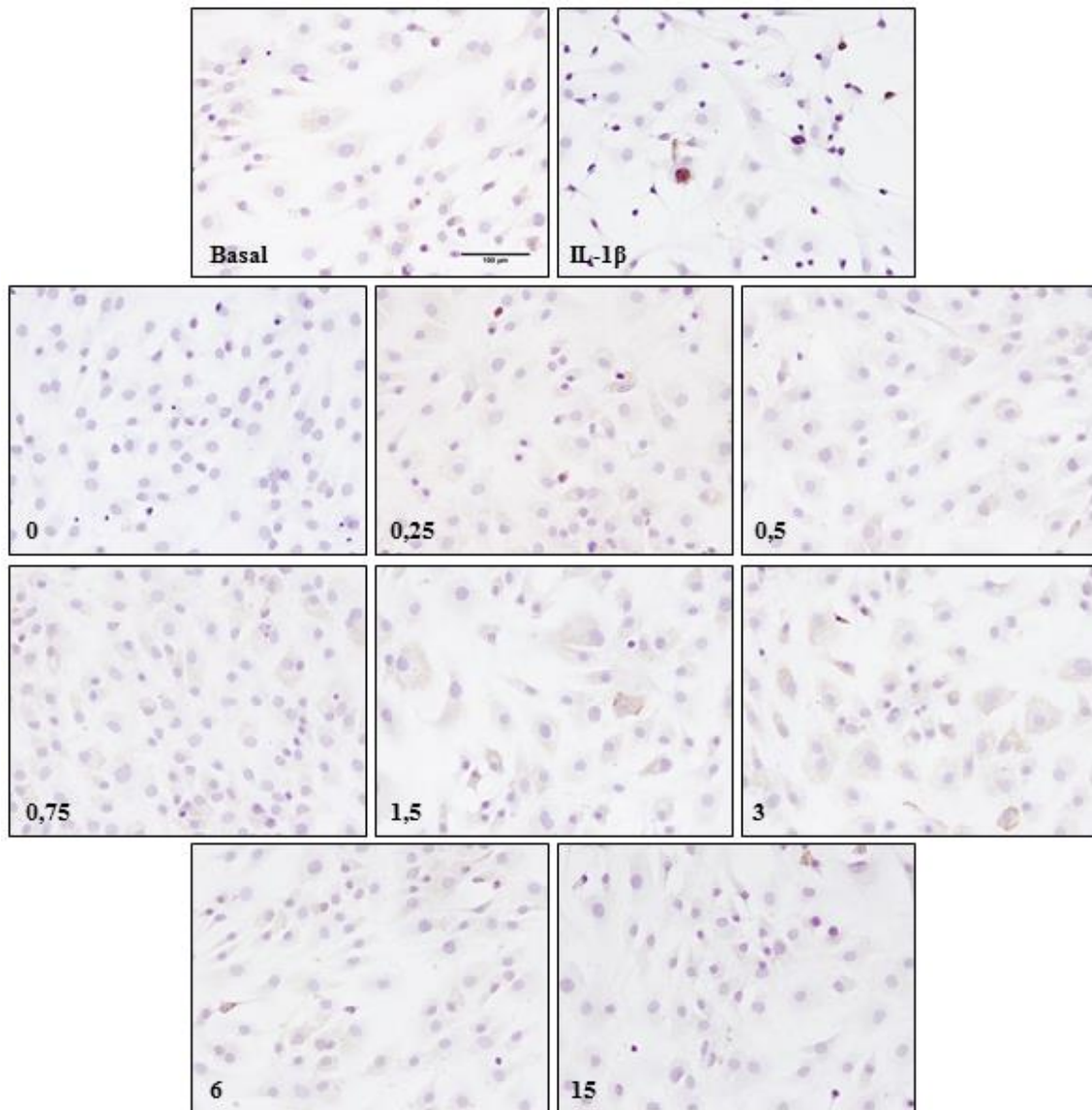


Fig. 58: Tinción ICQ de *MMP-13* intracelular en condrocitos *OAr* co-estimulados con *IL-1β* (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo *IL-1β* y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μm.

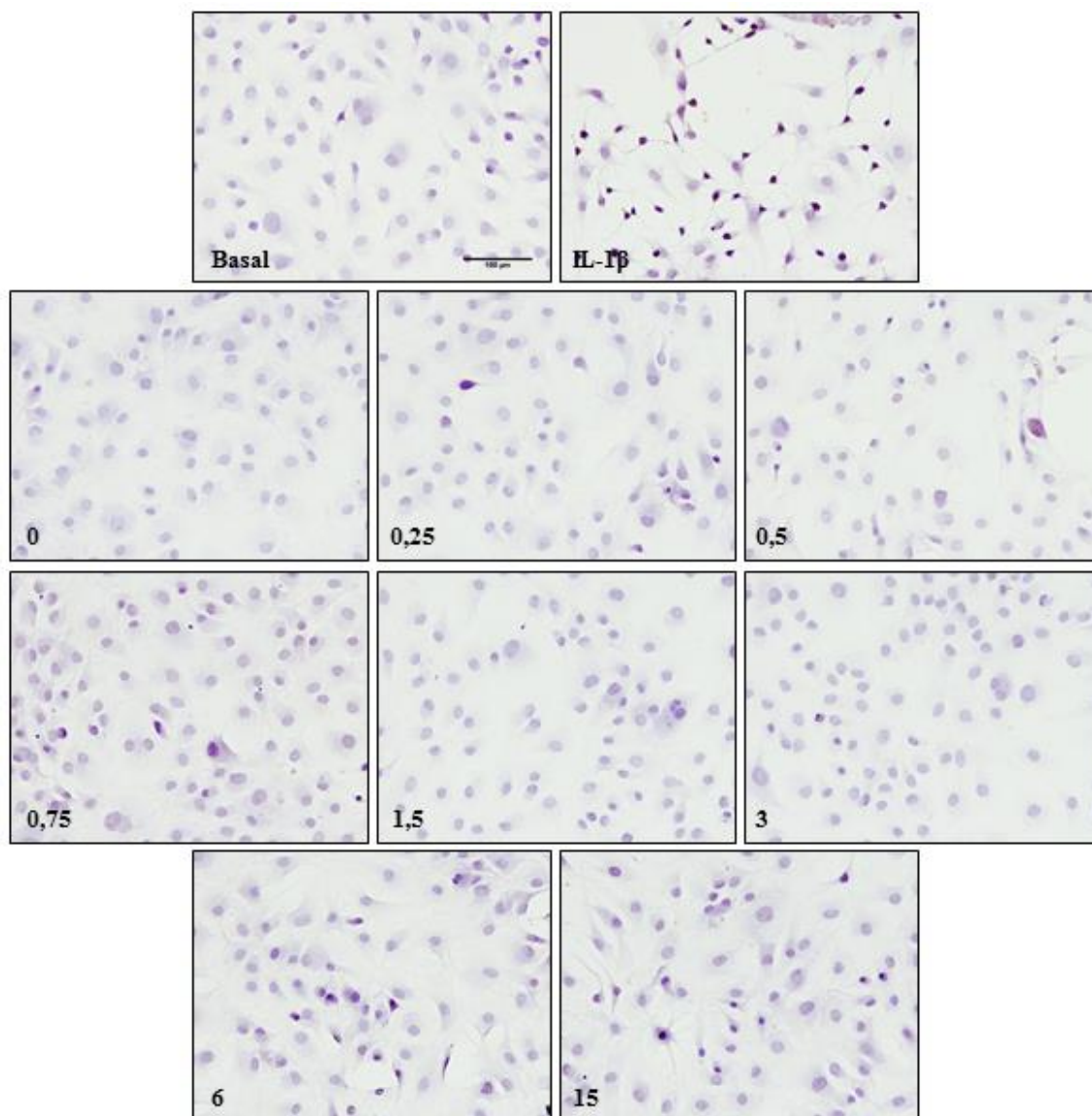


Fig. 59: Tinción ICQ de *MMP-13* intracelular en condrocitos *OAc* co-estimulados con $IL-1\beta$ (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0-15 en *DMEM* 0% durante 48 h, frente a la estimulación con solo $IL-1\beta$ y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 20x. La barra de escala representa 100 μ m.

5.4 Efectos del L-PRP sobre la degradación inflamatoria de la matriz en explantes de cartílago *OA*

El efecto de los L-PRPs sobre la degradación de la MEC en explantes de cartílago *OA* en condiciones inflamatorias se estudió mediante un modelo de 21 días de cultivo en placa. Para recrear las condiciones inflamatorias que se encuentran en una articulación *OA*, los explantes de $n=5$ donantes se estimularon con 5 ng/ml de $IL-1\beta$. A tiempo final, la integridad de la MEC en los explantes se valoró con las tinciones histoquímicas SO y AT y las tinciones IHQ para *MMP-3* y *MMP-13*, las dos principales enzimas responsables de

la degradación de la MEC del cartílago en la OA. Se comparó la degradación producida por la IL-1 β con la degradación de los explantes estimulados con IL-1 β más los distintos lisados (L-PRP0,75 y L-PRP15) y el control sin estimular en *DMEM* 10% (Basal).

La tinción SO (Fig. 60), específica para GAGs, mostró una pérdida moderada de GAGs en los explantes estimulados con IL-1 β , aunque con diferencias entre los distintos donantes. La región interterritorial, inmediatamente circundante a los condrocitos, se tiñó con mayor intensidad que el resto de la matriz en la condición Basal, desapareciendo estas tonalidades intensas en los explantes estimulados con IL-1 β . La co-estimulación de los explantes con L-PRP0,75 y L-PRP15 los protegió parcialmente de la pérdida de GAGs ocasionada por la IL-1 β y, si bien en ningún caso se alcanzaron tonalidades equivalentes a la de la condición Basal, en el tejido co-estimulado con L-PRP0,75 sí se recuperó la tinción interterritorial.

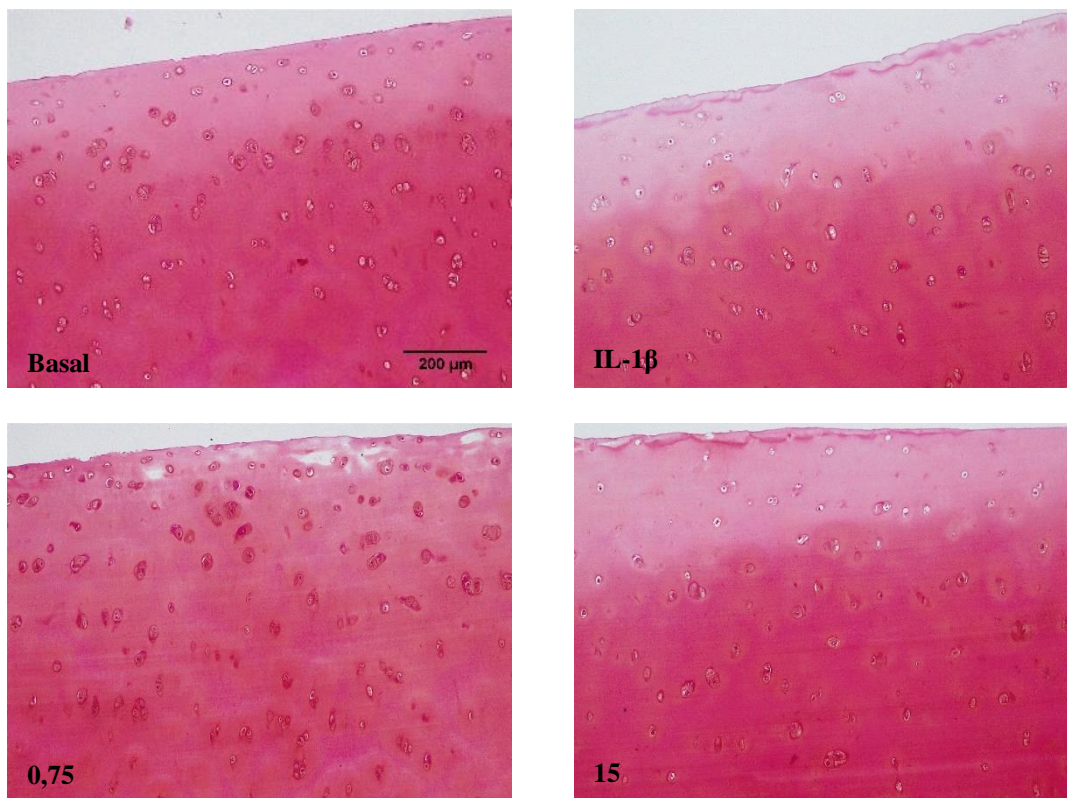


Fig. 60: Tinción SO en explantes de cartílago OA co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m.

La tinción AT (Fig. 61), dirigida a componentes metacromáticos como los proteoglicanos, principalmente AH, también mostró diferencias entre las distintas condiciones ensayadas. Se detectó una pérdida superficial de proteoglicanos, evidenciada por la decoloración de violeta a blanquecino, en los explantes estimulados con IL-1 β . Este efecto se bloqueó

parcialmente en los explantes co-estimulados con L-PRP0,75, mientras que L-PRP15 no pareció mostrar efectos protectores.

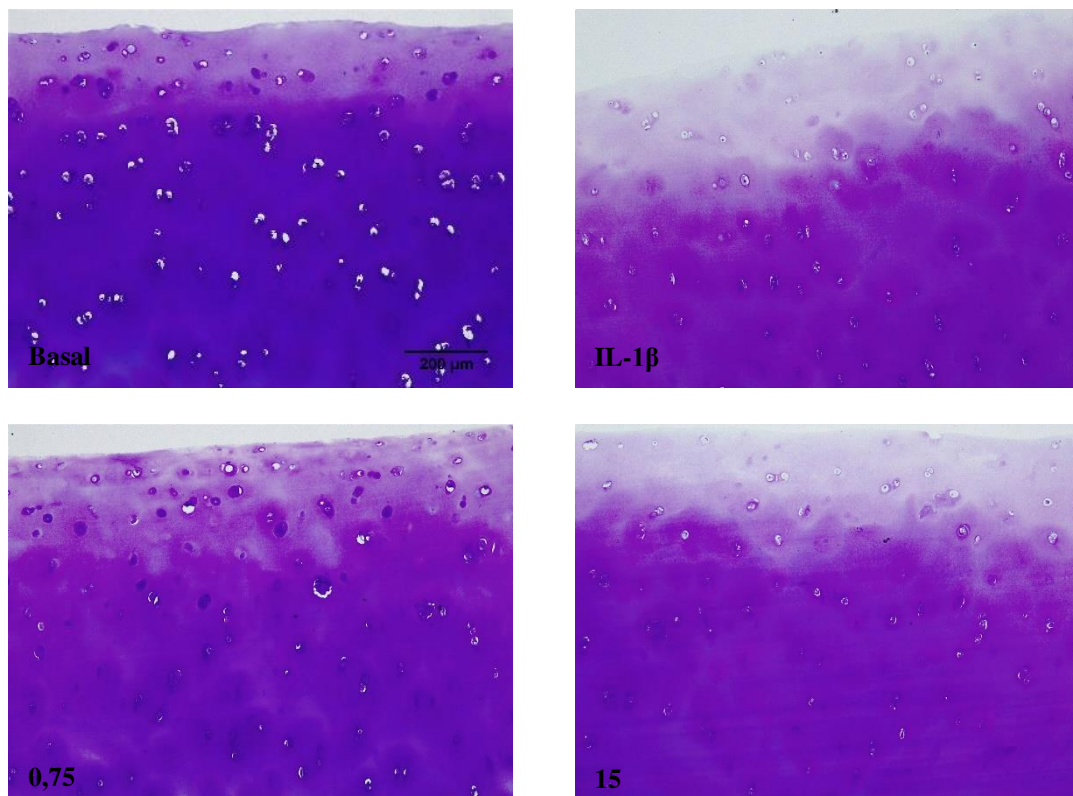


Fig. 61: Tinción AT en explantes de cartílago OA co-estimulados con IL-1 β (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en DMEM 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo IL-1 β y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m.

La tinción IHQ para *MMP-3* (Fig. 62) mostró un marcado incremento en la positividad en la condición estimulada con IL-1 β . La co-estimulación con L-PRP0,75 y L-PRP15 redujo apreciablemente la intensidad de la señal, que se aproximó a los niveles detectados en Basal, especialmente en el caso de L-PRP0,75. Un efecto similar se observó en la tinción IHQ para *MMP-13* (Fig. 63), en la que también se puede ver cómo la positividad se incrementa al estimular el cartílago con IL-1 β y la señal se reduce bajo la influencia de L-PRP0,75 y L-PRP15, igualando la condición Basal.

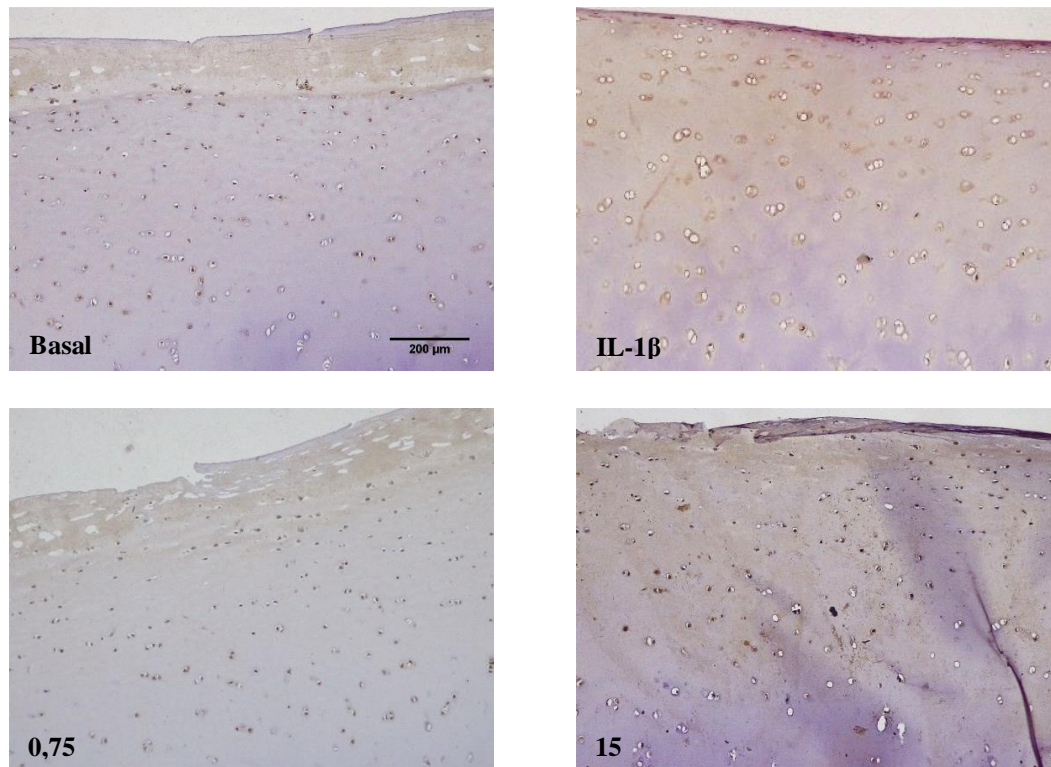


Fig. 62: Tinción IHQ para *MMP-3* en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con *IL-1β* (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo *IL-1β* y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m.

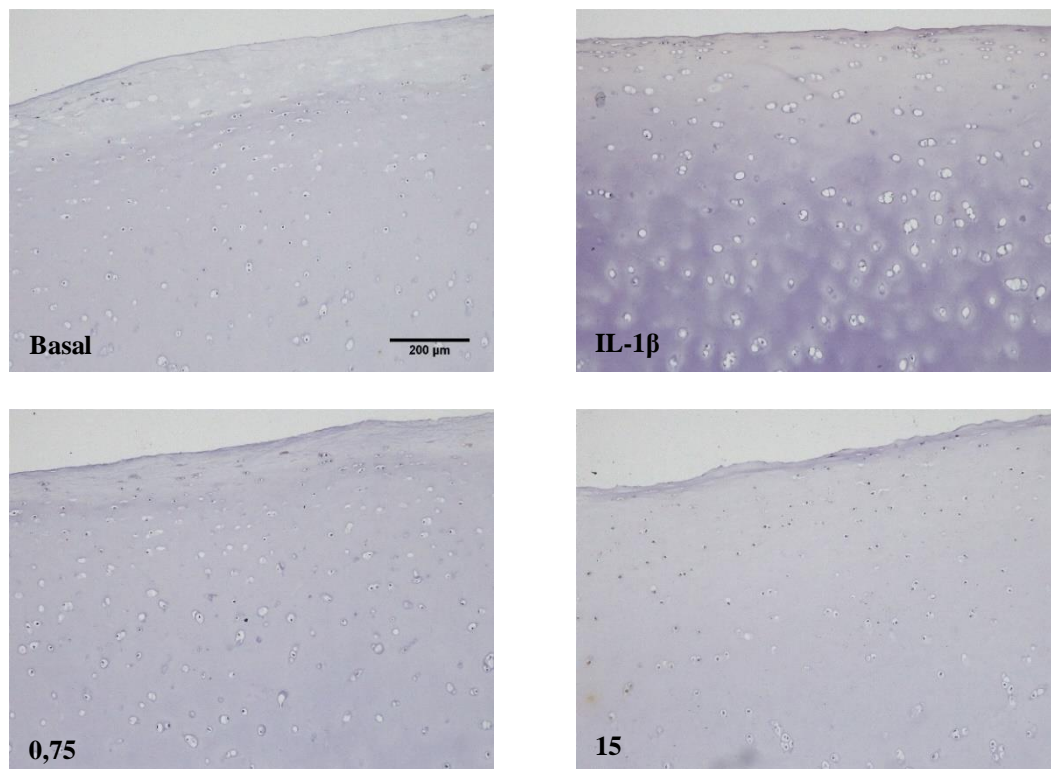


Fig. 63: Tinción IHQ para *MMP-13* en explantes de cartílago *OA* co-estimulados con *IL-1β* (5 ng/ml) más un 10% de L-PRP0,75 o L-PRP15 en *DMEM* 0% durante 21 días, frente a la estimulación con solo *IL-1β* y la condición Basal sin estimular. Imágenes de microscopía óptica tomadas a 10x. La barra de escala representa 200 μ m.

DISCUSIÓN

1. ESTANDARIZACIÓN DEL PRP EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS

En la actualidad, existen numerosas metodologías de preparación de PRPs, tanto a nivel de laboratorio, como comercial. En todos ellos, el principal parámetro de caracterización del PRP resultante es el *PEF*. No obstante, si consideramos que el recuento basal de plaquetas de una persona sana oscila entre $1,5 \cdot 10^5$ y $4,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl , y que estos trombocitos contienen las moléculas y *GFs* que se postulan como potenciales responsables de los efectos terapéuticos del PRP, el *PEF* no es el parámetro de estandarización más apropiado, ya que equivale a la aplicación de dosis terapéuticas de plaquetas altamente heterogéneas entre pacientes. Existen, además, multitud de trabajos que evalúan la eficacia de estos productos en diversas aplicaciones y de manera reiterada se concluye que la falta de estandarización de los productos empleados es el principal factor que impide comparar estudios y establecer de manera concluyente su eficacia. A mayores, en la literatura tampoco hay consenso sobre cuál sería la mejor forma de estandarizar el tratamiento (Levy *et al.*, 2018; Chahla *et al.*, 2017).

En esta tesis se ha intentado dar respuesta a esta demanda desarrollando un sistema de estandarización en el que el derivado de PRP resultante no depende de la concentración basal del paciente. Para ello, hemos propuesto un cambio de enfoque que implica considerar el PRP como un fármaco convencional, para así establecer una composición, dosificación e indicaciones con eficacia clínica demostrada, al margen del contaje basal de plaquetas de los pacientes. El parámetro de estandarización seleccionado ha sido la concentración absoluta de plaquetas y hemos trabajado con el concepto de curvas de dosis, equiparables a las que se emplean en los estudios preliminares de cualquier fármaco convencional para probar sus efectos. Para comprobar la validez de esta aproximación, hemos evaluado el efecto de este parámetro sobre tres indicaciones específicas relacionadas con la fisiopatología de la *OA*:

1. Terapia intraarticular con propiedades condrogénicas.
2. Soporte tridimensional bioactivo para la regeneración de lesiones del cartílago.
3. Terapia intraarticular antiinflamatoria.

Para las aplicaciones 1 y 3, los PRPs con distintas concentraciones de plaquetas se coagularon y se utilizó el lisado obtenido tras la retracción del coágulo formado (L-PRP). Por el contrario, para su aplicación como soporte de *TE*, el PRP estandarizado se activó una vez combinado con las *MSCs*.

Para realizar la estandarización se puso a punto un protocolo en el que, de manera resumida, se aisló PPP y un *pellet* de plaquetas por separado para, posteriormente, combinarlos y preparar PRPs con concentraciones de plaquetas absolutas conocidas.

En el caso de las dos primeras aplicaciones, las dosis utilizadas fueron 0,75; 1,5; 3, 6 y $15 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l. En el caso de la terapia antiinflamatoria, la curva de dosis incluyó, en el extremo inferior, el lisado de PPP (0 plaquetas/ μ l), considerando la posibilidad de que los factores plasmáticos, y no los plaquetarios, fueran los responsables de los efectos observados. Y en el extremo superior de la curva, la dosis superior de plaquetas fue de $15 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, equivalente a un *PEF* de unas 5 veces la concentración media de plaquetas en la sangre periférica. De esta forma, nuestro PRP estandarizado cubre el rango de concentraciones de sistemas comerciales como *ACP (Arthrex)*, *Cascade (MTF Biologics)*, o *GPS II y III (Biomet)* (ver Tabla 3), a la vez que incluye dosis sub-fisiológicas, menos comunes en este tipo de estudios.

Por otra parte, en vistas a su aplicación como terapia antiinflamatoria en la *OA*, se decidió trabajar con PRP sin leucocitos con el fin de evitar los potenciales efectos proinflamatorios de sus proteasas e hidrolasas ácidas (Anitua *et al.*, 2008). Aunque hay estudios que apuntan a que la inclusión de leucocitos en los preparados de PRP no supone un perjuicio para la eficacia del tratamiento en el sistema musculoesquelético, tanto a nivel experimental (Giusti *et al.*, 2018; Van Buul *et al.*, 2011) como en ensayos clínicos (Yerlikaya *et al.*, 2017; Mariani *et al.*, 2016; Riboh *et al.*, 2016), otros señalan que genera un ambiente adverso y promueve la síntesis de mediadores inflamatorios (Rubio-Azpeitia *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016b; Cross *et al.*, 2015; Braun *et al.*, 2014). Como ya se ha señalado, la gran heterogeneidad en los protocolos de preparación del PRP impide hacer una comparación directa entre los distintos estudios, por lo que hemos optado por la opción más conservadora. Además, la inclusión de leucocitos tampoco sería adecuada para los estudios de *TE*, ya que se ha demostrado que los leucocitos liberan elastasas que alteran la estabilidad de la matriz de fibrina (Anitua *et al.*, 2015; Andía *et al.*, 2012).

En la práctica totalidad de las extracciones de sangre realizadas para la preparación de PRP, los donantes fueron mujeres; sin embargo, la literatura confirma que el sexo del donante no afecta a la concentración de plaquetas ni de *GFs* (Markopoulou *et al.*, 2009). Al definir nuestro protocolo de preparación de los L-PRPs, optamos por la activación con calcio, principalmente, para evitar la presencia de restos celulares que podrían contener antígenos de superficie inmunológicamente activos, algo frecuente cuando se realiza una activación

mediante ciclos de congelación-descongelación (Renn *et al.*, 2015; von Hundelshausen *et al.*, 2007). Además, el uso de calcio permite imitar el proceso fisiológico de coagulación y resulta en una liberación sostenida de *GFs*, siendo interesante para la aplicación del PRP en *TE* (Anitua *et al.*, 2008).

La selección de una concentración de 10% (v/v) de L-PRP en el medio de cultivo se basó en que es la concentración estándar de SBF en experimentos *in vitro* con los tipos celulares utilizados en esta tesis y, además, es la que se usa preferentemente en la literatura en experimentos *in vitro* con derivados de PRP. Por otra parte, en la práctica, el aumento de la concentración de plaquetas de partida en cada lisado es esencialmente equivalente a un aumento de volumen de lisado de concentración única en el medio de cultivo.

Existe alguna otra propuesta de estandarización novedosa. Por ejemplo, se ha utilizado el *TGF-β1* como factor principal del lisado de PRP para su dosificación (Wu *et al.*, 2011). Los autores cuantifican su concentración en el lisado, hacen una curva de dosificación y evalúan qué concentración da lugar a mejor regeneración y efectos antiinflamatorios. Recientemente, también se ha propuesto la estandarización del PRP en función de su contenido total de proteínas (Kieb *et al.*, 2017). Tras la liofilización del lisado obtenido a partir de concentrados de plaquetas de varios donantes, la mayor o menor dilución de este producto en polvo permitiría aplicar concentraciones ajustadas de *GFs* concretos. Este trabajo también introduce la concepción del PRP como un producto alógeno de fácil producción y aplicación a gran escala, lo que debería ser investigado en más profundidad. Sin embargo, en nuestros PRPs estandarizados, la cuantificación de proteínas totales ha demostrado ser homogénea para todos los preparados, conteniendo todos ellos una media de $41,74 \pm 0,36$ mg/ml de proteína, por lo que la concentración de proteína podría no ser una buena variable de estandarización.

2. EFECTO DEL PRP ESTANDARIZADO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA VIABILIDAD CELULAR

Es bien conocido que el PRP contiene *GFs*, tales como *IGF-I*, *PDGF*, *HGF*, *VEGF*, *EGF* o *bFGF*, con efecto mitógeno sobre diversos tejidos y tipos celulares. Por ello, la posibilidad de emplear el PRP y otros hemoderivados humanos como suplementos de cultivo de origen humano, frente a los sueros de origen animal, se estudia desde hace décadas.

En este estudio, los condrocitos mostraron una respuesta proliferativa positiva al ser estimulados con L-PRPs con concentraciones crecientes de plaquetas, encontrándose cantidades progresivamente mayores de células y proteínas. La actividad celular apareció solo ligeramente incrementada con respecto al cultivo en *FBS*, manteniéndose por tanto la viabilidad. La respuesta de las *BM-MSCs* a la estimulación con los lisados mostró patrones similares a los de los condrocitos en las tres variables analizadas, pero más pronunciados.

Otros estudios han aportado también evidencias del efecto mitógeno del PRP en células de tejidos articulares. Por ejemplo, la proliferación de las células de menisco aumentó significativamente con suero y con PRP (*Thrombocyte Concentrate N-W*, composición no especificada) (Freyman *et al.*, 2016), al igual que la de los condrocitos estimulados con un lisado comercial de plaquetas (*Stemulate*TM, *Cook Regentec*, composición no especificada) (Sykes *et al.*, 2018), con lisado de PRP ($9,2-37,6 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (do Amaral *et al.*, 2015), o con lisados de plaquetas obtenidos a partir de PRP ($14,6 \pm 2,9 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l), pero, en cambio, no con suero o con lisados de PPP ($0,3 \pm 0,1 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (Spreafico *et al.*, 2009). También las *MSCs* proliferaron más con este tipo de suplementos: por ejemplo, se describió este efecto en *AT-MSCs* estimuladas con medio condicionado con membranas de plasma ricas en fibrina (composición no especificada) (Souza *et al.*, 2017), con suero AB y lisado de PRP obtenido a partir de sangre AB ($20-30 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (Kocaoemer *et al.*, 2007) y con otros lisados de PRP de composición no especificada (Tavakolinejad *et al.*, 2014b). Borghese *et al.* (2016) encontraron también una efectividad mayor de un lisado de PRP deplecionado en leucocitos (composición no especificada) para expandir *AT-MSCs* y *BM-MSCs*. En este último tipo celular, se ha descrito un aumento en la tasa de proliferación al emplear lisado de PRP ($9,2-37,6 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (do Amaral *et al.*, 2015), lisado de plaquetas obtenidas por aféresis (composición no especificada) (Ben Azouna *et al.*, 2012) y PRP sin activar (*PEF 7x*) (Mishra *et al.*, 2009). En los casos en los que sí se especifica la composición del PRP,

algunas de las dosis de plaquetas ensayadas estarían incluidas en nuestro rango de estudio, corroborando en parte, por lo tanto, nuestros resultados.

No obstante, en otros tipos celulares también se pueden encontrar ejemplos del efecto contrario. En osteoblastos dentales, el medio condicionado con PRP (kit *GLO PRP*) no ejerció efectos mitógenos (Kobayashi *et al.*, 2017), mientras que el crecimiento de los queratinocitos resultó inhibido bajo el influjo de los *GFs* de un lisado de plaquetas (composición no especificada) (Bayer *et al.*, 2018) y del PRP ($4,8 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl ; $0,3 \cdot 10^3$ leucocitos/ μl) (Stessuk *et al.*, 2016). Dhillon *et al.* (2015) también describieron un efecto inhibitorio al estimular células de ligamento anterior cruzado con PPP y PRP (composiciones no especificadas).

Por otro lado, en la bibliografía no se encuentran referencias en las que se estudie el efecto de la dosis de plaquetas sobre la proliferación celular. Solo un estudio hace referencia al número de plaquetas en relación con la proliferación de fibroblastos de piel, membrana sinovial y tendón, describiendo una tendencia dosis-dependiente positiva similar a la descrita en nuestro estudio al estimular todos los tipos celulares con lisados de PPP ($0,16 \pm 0,01 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl), PRP2x ($4,0 \pm 0,4 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) y PRP4x ($7,7 \pm 1,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) (Anitua *et al.*, 2009).

Por el contrario, en los ensayos que hacen alusión a la influencia de la “dosis” sobre la respuesta proliferativa, se entiende la dosis como porcentajes crecientes del suplemento de PRP en el medio de cultivo, aunque no siempre se especifica la composición del PRP. Estudios con condrocitos mostraron una proliferación dependiente de dosis al estimularlos con un 1%, 5% o 10% de lisados de plaquetas obtenidos a partir de PRP ($14,6 \pm 2,9 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) (Spreafico *et al.*, 2009), y también con un 1%, 2,5%, 5% y 10% de lisado de PRP ($9,2$ - $37,6 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) (do Amaral *et al.*, 2015). Lo mismo se puede aplicar a las *AT-MSCs* y *BM-MSCs* estimuladas con un 2,5%, 5%, 10% y 20% de lisado de PRP deplecionado en leucocitos (composición no especificada) (Borghese *et al.*, 2016), con un 1%, 2,5%, 5% y 10% de lisado de PRP ($9,2$ - $37,6 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl) (do Amaral *et al.*, 2015), o con un 10% y 15% de lisado de PRP (composición no especificada) (Tavakolinejad *et al.*, 2014b). Por el contrario, otros autores describen una respuesta dosis-dependiente negativa en *AT-MSCs*, fibroblastos y queratinocitos bajo el estímulo de un 10%, 25%, 50% y 100% de PRP ($4,8 \cdot 10^5$ plaquetas/ μl ; $0,3 \cdot 10^3$ leucocitos/ μl) (Stessuk *et al.*, 2016), así como en *MSCs* de tendón de conejo estimuladas con un 2%, 5% y 10% de lisados de PRP rico en leucocitos (*PEF* 3x, leucocitos 4x) (Zhang *et al.*, 2016b). En ambos estudios, los porcentajes más bajos de suplementación son los que inducen una mayor respuesta

proliferativa y, en este último caso, la tendencia dosis-dependiente negativa detectada se asoció a un incremento en la producción de mediadores inflamatorios, posiblemente debido a la presencia de leucocitos en el PRP, ya que no se encuentra el mismo efecto con las mismas concentraciones de lisados de PRP puro sin leucocitos (*PEF 3x*).

3. INDICACIÓN 1: TRATAMIENTO INTRAARTICULAR PARA FAVORECER LA CONDROGÉNESIS

Dado que nuestro interés prioritario es la reparación de los daños en el cartílago articular asociados a la OA, nuestro objetivo en esta parte se dirigió en primer lugar a la diferenciación al linaje condrogénico. Para ello, se llevaron a cabo estudios *in vitro* para determinar la capacidad de los L-PRPs estandarizados para inducir (por sí mismos) o promover (en acción sinérgica con un medio de diferenciación comercial), la diferenciación condrogénica, primero en un modelo clásico de *pellet* y, adicionalmente, utilizando el PRP como soporte bioactivo para *MSCs* y, así mismo, evaluar la influencia de la dosis plaquetaria.

En nuestras condiciones, ninguno de los lisados ensayados indujo, ni tampoco promovió la condrogénesis en formato *pellet*. En general, no se observó ninguna tendencia clara asociada a la dosis plaquetaria y en todos los casos se inhibió la condrogénesis, encontrándose expresiones disminuidas de los marcadores COLII y ACAN. Observando las tinciones histoquímicas, la matriz de los *pellets* cultivados con MCondro más los lisados es más laxa y contiene menos proteoglicanos y fibras colágenas, si bien la estabilidad se mantiene.

La capacidad del PRP para mejorar la condrogénesis de las *MSCs* es objeto de intensa investigación en la actualidad y se pueden encontrar estudios con *pellets*, micromasas¹ y biomateriales, con resultados diversos y poco concluyentes. Empleando el formato en micromasa y un tiempo de cultivo de 21 días, se encontró un efecto inductor de la condrogénesis en *AT-MSCs* estimuladas con medio condicionado con membranas de plasma ricas en fibrina (Souza *et al.*, 2017) y con un 5% o 15% de lisado de PRP (Pakfar *et al.*, 2017). También se han descrito efectos similares en *MSCs* de cordón umbilical estimuladas con un 5% de lisado de plaquetas preparado a partir de PRP (Hassan *et al.*, 2018). En ninguno de estos tres casos se especificó la composición; no obstante, los métodos de obtención del PRP de Souza *et al.* y Hassan *et al.* son completamente diferentes al nuestro, siendo solo equiparable el de Pakfar *et al.*, que es, además, el único estudio en el que se incluye un control positivo de diferenciación en MCondro. En este sentido, hay que señalar que el método de obtención del PRP probablemente determine que éste tenga un carácter más pro- o anti-condrogénico. Los gránulos alfa de las plaquetas contienen

¹ Las micromasas difieren de los *pellets* en el método de preparación, que no se basa en una centrifugación, sino en la formación de microgotas con una solución concentrada de *MSCs*.

cantidades importantes de los *GFs* *TGF-β*, *bFGF* e *IGF*, que desempeñan un papel muy relevante en la inducción y mantenimiento del fenotipo condrogénico (Zhu *et al.*, 2013; Danisovic *et al.*, 2012). Pero el PRP contiene también una gran proporción de *GFs* con actividades diversas, como *VEGF* y *PDGF*, dos de los factores angiogénicos más potentes, que pueden competir con la diferenciación condrogénica (Chung *et al.*, 2015; Kon *et al.*, 2010). El balance entre los distintos *GFs* determinará el carácter pro- o anti-condrogénico del PRP y este equilibrio estará afectado, sin duda, por el método de obtención.

En línea con nuestros resultados, en condrocitos cultivados en *pellet* se describió una disminución del contenido en GAGs y COL total ante el estímulo de un 10% de lisado comercial de plaquetas (*Stemulate*TM, Cook Regentec) (Sykes *et al.*, 2018), también observada en células de menisco cultivadas en *pellet* con un 5% de PRP (*Thrombocyte Concentrate N-W*) (Freymann *et al.*, 2016). Cuando el PRP se utiliza como suplemento de cultivo para la diferenciación condrogénica en biomateriales, algunos estudios sugieren que la condrogénesis solo se produce en una ventana terapéutica determinada (do Amaral *et al.*, 2015) o en combinación con otros *GFs* como *TGF-β3* (Elder y Thomason, 2014), y otros encuentran inhibiciones de la diferenciación similares a la descrita en nuestro trabajo, tanto en *BM-MSCs* como en *AT-MSCs* encapsuladas en alginato o alginato:PRP 1:3 y cultivadas en MCondro con un 5% de PRP (*PEF 2,5x*) (Liou *et al.*, 2018). Entre todos estos estudios, solamente do Amaral *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la suplementación con distintas dosis de PRP y encontraron que solo la suplementación con un 2,5% de PRP mejoraba la condrogénesis de las *BM-MSCs*, mientras que las dosis altas inhibían la diferenciación.

Dado que, a la vista de los resultados anteriores, el producto desarrollado no conduce a una condrogénesis satisfactoria en este formato, nos planteamos si, alternativamente, se podría estar favoreciendo la diferenciación a otro linaje mesodérmico, en particular el osteogénico o el adipogénico.

En los estudios de osteogénesis, todos los L-PRPs resultaron en una ligera inducción y promoción. No se detectaron diferencias significativas dependientes de la dosis de plaquetas en la expresión de los marcadores *RUNX2* y *ALP*, tanto en condiciones de osteoinducción como de osteopromoción. La tinción rojo alizarina, en cambio, mostró una inducción osteogénica retardada con respecto al MOsteo y una pequeña influencia positiva dependiente de la dosis de plaquetas; también puso de manifiesto una acción sinérgica con el MOsteo en los cultivos de osteopromoción.

En este sentido, el efecto positivo del PRP en la diferenciación osteogénica ha sido descrito por múltiples autores. Por ejemplo, en *AT-MSCs* estimuladas con un 10% o 15% de PRP (composición no especificada), se encontró una mejora dosis-dependiente de la mineralización, aunque no se llegó a igualar la estimulación con solo *MOsteo* (Tavakolinejad *et al.*, 2014b). También se encontró mayor promoción osteogénica en *MSCs* de pulpa dental y de ligamento periodontal al estimularlas con PRP (*PEF* 4-8x) (Otero *et al.*, 2017). Diversos estudios preclínicos de reparación de defectos óseos han mostrado también resultados muy satisfactorios: en varios estudios con modelos de conejo se ha encontrado un mayor volumen de hueso de nueva formación al utilizar soportes de fosfatos cálcicos, con o sin *BM-MSCs*, y diversos PRPs ($0,02-10,56 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (Hasan *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2016).

Por otro lado, no se observó inducción o promoción adipogénica con ninguno de los lisados. De igual manera que para la condrogénesis, se identificó un efecto represor, con independencia de la dosis de plaquetas. Estos resultados concuerdan con otros descritos previamente con *AT-MSCs* y *MSCs* de membrana sinovial (Liao *et al.*, 2015; Amable *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). En el primer estudio se obtuvieron lisados de PRP a partir de concentrados comerciales de plaquetas ($>10 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) y se testaron suplementos del 5%, 10%, 15% y 20%, siendo los resultados independientes de la dosis (Liao *et al.*, 2015). Estos resultados pueden deberse a que, entre las numerosas moléculas bioactivas que se encuentran en el PRP, hay también varias que ejercen efectos anti-adipogénicos que se encuentran en proporciones elevadas, como los *GFs* *TGF- β 1*, *EGF* y *PDGF* (Liao *et al.*, 2015), además de componentes bioquímicos de la sangre como el hidroxicolesterol. Este último ha demostrado inhibir los marcadores *PPAR γ* , *FABP4* y lipoproteína lipasa en preadipocitos y *BM-MSCs*, en las que también promueve la expresión de marcadores osteogénicos como *ALP* y osteocalcina (Moseti *et al.*, 2016).

4. INDICACIÓN 2: SOPORTE CON MSCs PARA APLICACIONES DE INGENIERÍA TISULAR DEL CARTÍLAGO

Como segunda indicación, en esta tesis se ha indagado el potencial del PRP como soporte de MSCs en terapias de TE dirigidas a la regeneración de cartílago hialino. En lo concerniente a la OA, esta aproximación permitiría, además de un tratamiento regenerativo de los daños ocasionados por la patología, un tratamiento preventivo de su desarrollo mediante la reparación de los defectos condrales debidos a traumatismos que, con el tiempo, acabarían dando lugar a la enfermedad degenerativa.

En nuestros experimentos utilizamos la aproximación de resuspender las MSCs directamente en PRP y activarlo a continuación, incorporando así las células en la matriz de fibrina del G-PRP. Como se mencionó anteriormente, estos experimentos se realizaron durante una estancia en el *Stem Cell Lab* (Facultad de Medicina de la Universidad de Heidelberg, Alemania) y, teniendo en cuenta la duración de la estancia y la disponibilidad de células en este laboratorio, se decidió utilizar una concentración celular de $6 \cdot 10^6$ MSCs/ml y mantener el cultivo durante 21 días para evaluar la progresión de la condrogénesis.

Como primera medida, se verificó que las células embebidas eran viables durante los 21 días que duraron los experimentos.

Aunque la mayoría de los G-PRPs conservaron su estabilidad, también se observaron casos de pérdida de integridad. Esta inestabilidad estructural se produjo de manera aleatoria y no se pudo asociar a ningún parámetro concreto. Algunos autores han encontrado una degradación completa de biomateriales de fibrina en un plazo de unas dos semanas (Chien *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, ninguno de los G-PRPs llegó a degradarse por completo y los análisis histomorfológicos mostraron regiones en las que se produjo una elevada condensación celular y una intensa remodelación de la matriz de fibrina. Por lo tanto, la inestabilidad de los G-PRPs podría atribuirse, en nuestro caso, no solo a la fibrinólisis, sino a un desequilibrio entre la degradación de la matriz de fibrina, la tasa de síntesis de nuevas moléculas de matriz de cartílago y la migración celular.

Posteriormente, se valoró la influencia de la dosis plaquetaria en el potencial condrogénico del G-PRP sobre las BM-MSCs, frente a la condrogénesis experimentada por estas células en un biomaterial inerte de Ag, un material muy empleado como soporte en los estudios de TE de cartílago (Zhao *et al.*, 2013). En general, la condrogénesis en G-PRP fue equivalente a la de los soportes de Ag a nivel de expresión génica, aunque a nivel histológico la

estructura parecía ser mejor. En todos los casos se expresaron los marcadores de condrogénesis *SOX9*, *ACAN* y *COLII* y se pudieron detectar células similares a condrocitos.

En la bibliografía se pueden encontrar estudios contradictorios acerca de la idoneidad del PRP como soporte para la *TE* del cartílago, indicando unos que las matrices de PRP son adecuadas para inducir la condrogénesis (Ho *et al.*, 2010), y otros que este tipo de soportes tiene un efecto inhibitorio de esta diferenciación (Ma *et al.*, 2012). Como ya se ha indicado previamente, el PRP contiene *GFs* tanto pro- como anti-condrogénicos y es probable que el balance entre ellos, afectado por el método de preparación, determine que la diferenciación vaya en uno u otro sentido. También hay que tener en cuenta que los soportes de PRP se desarrollaron inicialmente para la regeneración ósea (Yamada *et al.*, 2004) y, posteriormente, empezó a estudiarse la posibilidad de aplicarlos a la regeneración del cartílago (Wu *et al.*, 2007).

En los últimos años se han empezado a barajar otras posibilidades para mejorar la condrogénesis, como el uso de biomateriales compuestos, en los que el PRP se combina con otro material de mayor consistencia como el AH (Liu *et al.*, 2017) o el COL (Zhang *et al.*, 2016c), o el uso del PRP como suplemento condrogénico de diferenciación empleando otros materiales como soporte (Beigi *et al.*, 2018; Krüger *et al.*, 2014). En este sentido, en lo referente al efecto de la concentración de plaquetas, nuestros resultados sugieren que la más elevada ($3 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) daría lugar a una mejor inducción condrogénica.

En definitiva, los derivados de PRP desarrollados en este trabajo no parecen apoyar el uso del PRP como soporte celular en sí mismo para la regeneración del tejido cartilaginoso, aunque sí cabría considerar la posibilidad de usarlo como suplemento adyuvante para otros soportes tridimensionales.

5. INDICACIÓN 3: TERAPIA INTRAARTICULAR ANTIINFLAMATORIA

El PRP se emplea a nivel clínico desde hace varias décadas para tratar lesiones y patologías muy diversas (Marx *et al.*, 1998; Whitman *et al.*, 1997). Su uso está muy extendido en el ámbito de las lesiones y patologías asociadas al sistema musculoesquelético (Sengul *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017; Namazi y Mehbudi, 2016; Reurink *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente todavía hay un gran debate acerca de su eficacia. Por ejemplo, en el caso de la resolución de lesiones musculares y de ligamentos, una reciente revisión de la biblioteca Cochrane concluyó que en la actualidad no hay suficiente evidencia sobre la eficacia clínica del PRP que apoye su uso para tratar estas lesiones (Moraes *et al.*, 2014).

En el caso de la OA, existen diversos estudios clínicos que concluyen que el PRP ofrece mejoras significativas respecto a otros tratamientos intraarticulares, en particular en las escalas de dolor y funcionalidad, aunque también hay otros en los que el tratamiento no aportó mejoras significativas (Tabla 23). Pero los estudios sistemáticos y metaanálisis existentes concluyen de manera generalizada que el nivel de evidencia es, de momento, bajo para afirmar que el PRP y sus derivados sean clínicamente eficaces para mejorar la sintomatología de la OA (Shen *et al.*, 2017; Meheux *et al.*, 2016; Laudy *et al.*, 2015; Anitua *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014). Y de nuevo, la conclusión alcanzada por todos ellos es recurrente: hay una necesidad acuciante de estandarizar la composición del agente terapéutico, así como la dosificación y frecuencia de aplicación durante el tratamiento.

En este sentido, en la tercera indicación relacionada con el proceso patológico de la OA se investigó el potencial de los derivados de PRP como tratamiento intraarticular antiinflamatorio. El objetivo fue testar el efecto de la dosificación de plaquetas al preparar los L-PRPs sobre diversos mediadores inflamatorios y catabólicos que caracterizan la OA.

Tabla 23: Ejemplos de ensayos clínicos que valoran la eficacia del PRP como tratamiento intraarticular.

Estudio	PRP	Características	Control(es)	Parámetros	Resultados principales
Vaquerizo <i>et al.</i> (2013) <i>RCT</i>	<i>PRGF-Endoret</i>	<i>LP-PRP</i> CS/CaCl ₂	AH (<i>Durolane</i>)	<i>WOMAC</i> , índice de Lequesne y efectos adversos a 24 y 48 semanas	Tasa de respuesta significativamente mayor para todos los parámetros, incluyendo dolor, rigidez y funcionalidad física a 24 y 48 semanas en el grupo <i>PRGF-Endoret</i>
Patel <i>et al.</i> (2013) <i>RCT</i>	Customizado	<i>LP-PRP</i> CS/CaCl ₂	PRP Salino	<i>WOMAC</i> , <i>VAS</i> , satisfacción y efectos adversos antes y a 6 semanas, 3 y 6 meses	Mejoras significativas en todos los parámetros en los dos grupos tratados con PRP hasta el final de seguimiento (6 meses).
Filardo <i>et al.</i> (2012) <i>RCT</i>	Customizado	<i>LR-PRP</i> CD/NI	AH (<i>Hyalubrix</i>)	<i>IKDC</i> , <i>EQ-VAS</i> , escala de Tegner y <i>KOOS</i> antes y a 2, 6 y 12 meses	Mejora clínica significativa con inyecciones de PRP hasta un año después del tratamiento.
Cerza <i>et al.</i> (2012) <i>RCT</i>	<i>ACP</i>	<i>LP-PRP</i> CS/No	AH (<i>Hyalgan</i>)	<i>WOMAC</i> antes y a 4, 12 y 24 semanas	Resultado clínico significativamente mejor con <i>ACP</i> , con <i>WOMAC</i> bajo de forma sostenida.
Sánchez <i>et al.</i> (2012) <i>RCT</i>	<i>PRGF-Endoret</i>	<i>LP-PRP</i> CS/CaCl ₂	AH (<i>Euflexxa</i>)	<i>WOMAC</i> , índice de Lequesne y efectos adversos a 6 meses	Tasa de respuesta (50% de disminución del dolor de rodilla desde el inicio hasta la semana 24) significativamente mayor en el grupo <i>PRGF-Endoret</i> que en el de AH.
Kon <i>et al.</i> (2011) Estudio prospectivo comparativo	Customizado	<i>LR-PRP</i> CD/CaCl ₂	AH (<i>HMK</i>) AH (<i>LMK</i>)	<i>WOMAC</i> , <i>VAS</i> y total a 1, 3, 6 y 12 meses	Resultados clínicos efectivos a 1 mes en todos los grupos, manteniéndose en PRP y AH a los 6 meses. PRP fue significativamente superior a los 12 meses.
Duymus <i>et al.</i> (2017) <i>RCT</i>	<i>Ycellbio Kit</i>	<i>LR-PRP</i> CS/No	AH (<i>Ostenil Plus</i>) Gas ozono	<i>IKDC</i> , <i>KOOS</i> , <i>EQ-VAS</i> , escala de Tegner, <i>ROM</i> , satisfacción y efectos adversos a 2, 6 y 12 meses	<i>IKDC</i> significativamente mejor a los 12 meses con respecto al inicio para PRP y AH. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

RCT: randomized clinical trial (ensayo clínico aleatorizado), *LR*: leukocyte-rich (rico en leucocitos), *LP*: leukocyte-poor (pobre en leucocitos), *HMW*: high molecular weight (alto peso molecular), *LMW*: low molecular weight (bajo peso molecular), *WOMAC*: Western Ontario & McMaster Universities Osteoarthritis Index (índice de OA de las universidades de Western Ontario y McMaster), *VAS*: visual analog scale (escala visual analógica), *IKDC*: International Knee Documentation Committee (comité internacional de documentación de la rodilla), *EQ*: escala de valoración de calidad de vida Euro-Qol, *KOOS*: Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (puntuación de resultados de daño en la rodilla y OA), *ROM*: range of motion (rango de movimiento).

Para ello, se realizaron estudios *in vitro* en los que se estimularon condrocitos (o explantes de cartílago) *OA* de rodilla o de cadera con la citoquina IL-1 β , para simular el proceso inflamatorio crónico que sucede en la articulación *in vivo*, y se co-estimularon con un 10% (v/v) de los L-PRPs en el medio de cultivo.

Tal como se mencionó en la introducción, la IL-1 β es la citoquina proinflamatoria que caracteriza el estado patológico de la articulación *OA*. Es capaz de estimular la síntesis de otras citoquinas (*TNF α* , IL-6, IL-8), PGE₂, compuestos oxidantes (*NO* y otras *ROS*) y mediadores catabólicos (*MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-13*, *ADAMTS-4*), además de bloquear la síntesis de componentes estructurales clave de la MEC (COLII, ACAN) (Wojdasiewicz *et al.*, 2014; Goldring *et al.*, 2011; Weinberg *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2005) e inducir la muerte de los condrocitos por apoptosis (Charlier *et al.*, 2016; Blanco *et al.*, 1995). Adicionalmente, IL-1 β es capaz de auto-regular positivamente su propia ruta de síntesis, en un bucle de retroalimentación positiva (Wojdasiewicz *et al.*, 2014).

Respecto a los mediadores evaluados, el factor *TNF α* tiene funciones redundantes a la IL-1 β y actúa sinérgicamente para amplificar la respuesta inflamatoria. Estas dos citoquinas, producidas por los condrocitos, las células mononucleadas, los osteoblastos y el tejido sinovial, inducen la producción de otros factores proinflamatorios y catabólicos, como la IL-6, y quimioquinas como IL-8. IL-6 es también un factor proinflamatorio clave en la *OA*. Aumenta el número de células inflamatorias en el tejido sinovial, provoca una amplificación de los efectos de la IL-1 β para activar la síntesis de *MMPs* e inhibe la producción de proteoglicanos (Fernandes *et al.*, 2002). Por su parte, IL-8 parece mediar los efectos catabólicos de *TNF α* (Facchini *et al.*, 2005) y estimula la hipertrofia de los condrocitos (Cecil *et al.*, 2005).

En nuestro modelo, como se esperaba, la estimulación con 5 ng/ml de IL-1 β resultó en el incremento de todos los marcadores de inflamación, estrés oxidativo y catabolismo seleccionados para hacer los estudios. En concreto, se vio un claro efecto proinflamatorio en la expresión y/o síntesis proteica de las citoquinas IL-6, IL-8 y *TNF α* , así como la propia IL-1 β , la enzima *MMP-13*, la PGE₂ y sus enzimas de síntesis, COX-2 y PTGES, y la enzima *NOS2*. La Fig. 64 incluye los resultados obtenidos en este apartado de forma esquemática para facilitar la lectura de la discusión.

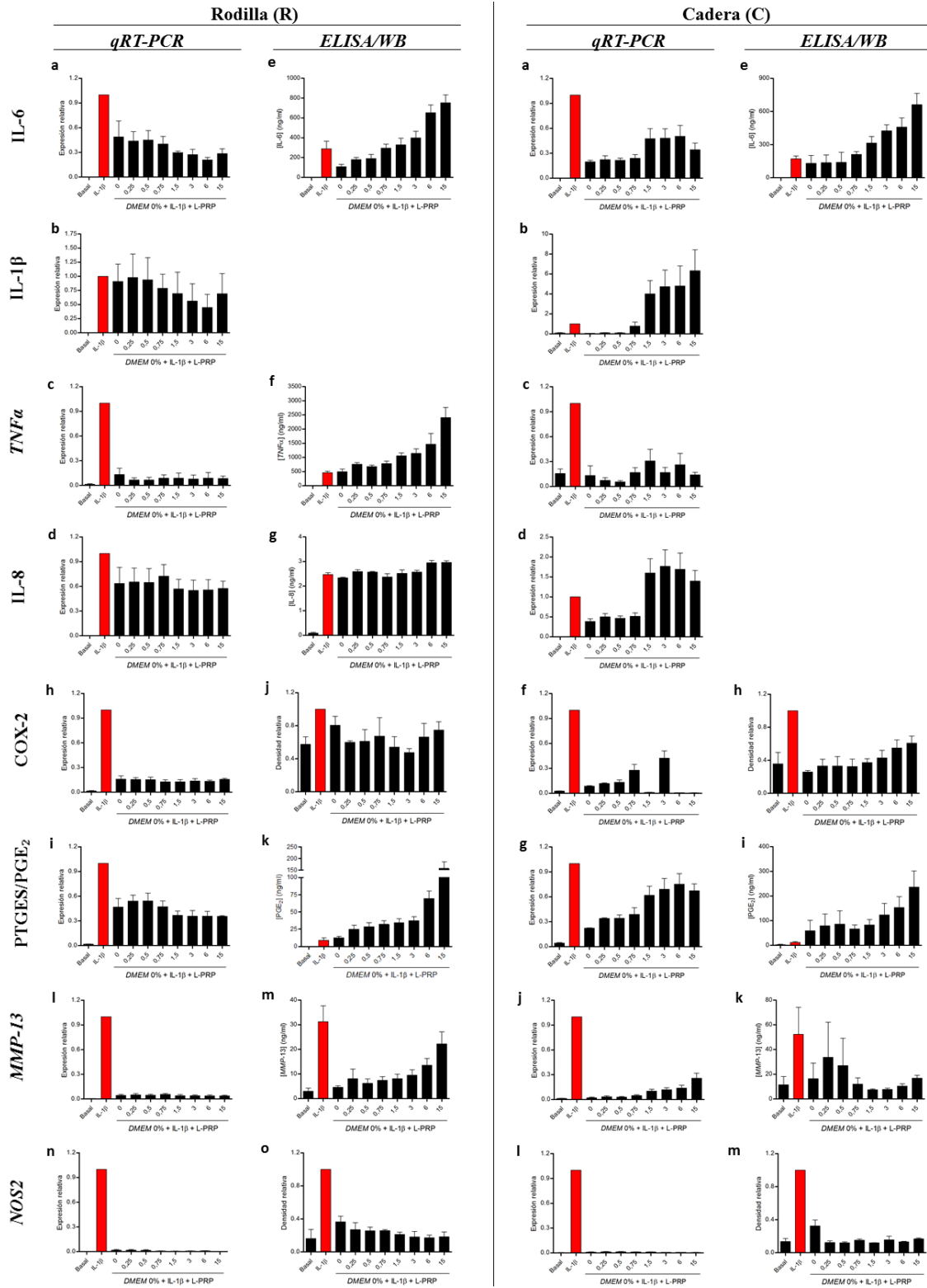


Fig. 64: Expresión génica y secreción/expresión proteica de los marcadores inflamatorios incluidos en el estudio. Se muestran, para condrocitos *OAr* (Rodilla, izquierda) y *OAc* (Cadera, derecha), los análisis de *qRT-PCR* para IL-6 (Ra, Ca), IL-1 β (Rb, Cb), *TNF α* (Rc, Cc), IL-8 (Rd, Cd), COX-2 (Rh, Cf), PTGES (Ri, Ci), *MMP-13* (Rl, Cl) y *NOS2* (Rn, Cl), la cuantificación mediante *ELISA* de IL-6 (Re, Ce), *TNF α* (Rf), IL-8 (Rg), PGE₂ (Rk, Ci) y *MMP-13* (Rm, Ck), y la cuantificación mediante *WB* de COX-2 (Rj, Ch) y *NOS2* (Ro, Cm).

Respecto a las citoquinas proinflamatorias, analizando en primer lugar los experimentos realizados en condrocitos *OA* de rodilla, se observó que los análisis de expresión génica mostraron un efecto inhibitorio en todos los marcadores analizados (excepto IL-1 β), siendo dosis-dependiente para IL-6 (Fig. 64Ra), e independiente para *TNF α* (Fig. 64Rc) e IL-8 (Fig. 64Rd). Mientras que, por el contrario, los análisis de síntesis proteica mostraron bien que las dosis inferiores fueron beneficiosas en el caso de IL-6 (Fig. 64Re), bien un efecto proinflamatorio dependiente de dosis (a partir de L-PRP0,75) para *TNF α* (Fig. 64Rf), o bien no provocaron ningún efecto en el caso de IL-8 (Fig. 64Rg).

Por otra parte, en condrocitos *OA* de cadera, los análisis de expresión génica mostraron, claramente, un efecto antiinflamatorio para L-PRP0-0,75 (Fig. 64Ca-d), mientras que L-PRP1,5-15 indujeron un efecto proinflamatorio en IL-1 β (Fig. 64Cb) e IL-8 (Fig. 64Cd), lo que también vino apoyado por los análisis de síntesis de IL-6 (Fig. 64Ce).

Diversos autores han estudiado los efectos de diferentes preparaciones de PRP sobre la producción de estos marcadores en distintos modelos de inflamación, describiendo efectos antiinflamatorios similares a los encontrados en nuestro estudio. Por ejemplo, la administración intraarticular de PRP (sin activar y conteniendo hasta $10 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) resultó en una reducción de la presencia de las proteínas IL-6, IL-1 y *TNF α* en el cartílago y la membrana sinovial en un modelo de artritis inflamatoria en cerdo (Lippross *et al.*, 2011). Por otra parte, en células de tendón estimuladas *in vitro* con IL-1 β y con 10% de lisado de PRP (*PEF* $2,3 \pm 0,7$, sin leucocitos), se observó una disminución en la expresión y síntesis de IL-6 e IL-8 (Andía *et al.*, 2015). También se describió un efecto antiinflamatorio del PRP en una línea inmortalizada de sinoviocitos estimulados con *TNF α* ; el producto utilizado, *PRGF*, se preparó a partir de PRP con un *PEF* de 8-10. La producción de *TNF α* , IL-1 β e IL-6 se redujo, encontrándose en este tipo celular una mayor efectividad con la dosis inferior de suplementación (5% vs. 10%) en el medio de cultivo (Tohidnezhad *et al.*, 2017). Moussa *et al.* (2017), por su parte, identificaron una reducción progresiva de la expresión génica de IL-6 al estimular condrocitos *OA* de rodilla con un 5%, 10% y 20% de PRP (composición no especificada).

Por el contrario, en sinoviocitos de rata con artritis reumatoide *in vitro*, el tratamiento con PRP (composición sin especificar) indujo la expresión génica de IL-6 e IL-8 respecto a la condición sin tratamiento y la tratada con dexametasona, aunque sí redujo la expresión de IL-1 β , *TNF α* e IL-17a (Tong *et al.*, 2017). También se ha descrito que la estimulación con un 25% de lisado de PRP ($12,3 \pm 0,6 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, $1,4 \pm 0,3 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l) o PPP

($0,09 \pm 0,03 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, $0,05 \pm 0,02 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l) tras 48 h de estimulación con IL-1 β aumentaba la producción de IL-6 en sinoviocitos equinos respecto a los valores con solo IL-1 β (Gilbertie *et al.*, 2018).

Se observan, por lo tanto, resultados contradictorios entre los diferentes estudios que hacen que resulte complicado compararlos entre sí y con nuestros resultados. Existen diferencias tanto en los modelos de inflamación utilizados, como con respecto al tipo de artritis, de células y, de manera relevante, de PRP utilizado. Únicamente hemos encontrado un estudio en el que se utilizaron condrocitos humanos OA de rodilla en los que se estudian estos parámetros, y la mayoría de los estudios utilizaron sinoviocitos procedentes de modelos de inflamación aguda. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Moussa *et al.*, cuyo modelo *in vitro* es el que más se parece al nuestro, pero únicamente proporcionan datos de expresión génica de IL-6, por lo que no conocemos los efectos de su PRP en la abundancia de la citoquina. En el trabajo de Gilbertie y colaboradores también observan un aumento en la producción de IL-6 al estimular condrocitos OA con medio condicionado procedente de sinoviocitos estimulados con IL-1 β y un 25% de lisado de PRP o PPP. En cualquier caso, al considerar estos mediadores de manera global, nuestros resultados muestran que, tanto en condrocitos de rodilla como de cadera, los L-PRPs más efectivos son los procedentes de PRP con concentraciones bajas de plaquetas, y en todo caso, inferiores a $0,75 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l.

En lo referente a los niveles de PGE₂ y su ruta de síntesis, los resultados de los análisis de expresión génica, *ELISA*, *WB* e *ICQ* también fueron ligeramente diferentes en condrocitos de rodilla y de cadera. Tras la co-estimulación con IL-1 β y L-PRP0-15, en el caso de la rodilla, todos los lisados inhibieron la expresión de las enzimas COX-2 (Fig. 64Rh) y PTGES (Fig. 64Ri), con independencia de la dosis de plaquetas. En el caso de COX-2, también se observó este efecto en las preparaciones de las ICQs, aunque el análisis por *WB* no mostró diferencias significativas (Fig. 64Rj). Para los condrocitos de cadera, las concentraciones inferiores fueron más efectivas (Fig. 64Cf-h). Sin embargo, la cuantificación de PGE₂ mediante *ELISA* mostró que la producción y secreción de PGE₂ no se moduló a la baja con ninguno de los lisados, ni en condrocitos de rodilla (Fig. 64Rk) ni de cadera (Fig. 64Ci). Por el contrario, se produjo una respuesta proinflamatoria dependiente de dosis, en línea con los resultados ya discutidos en los análisis de citoquinas. Las prostaglandinas pueden contribuir a la patogénesis de la OA de manera diferente a su capacidad de promover la vasodilatación y dolor característicos en los tejidos

vascularizados, pero, aunque el cartílago es avascular, conviene recordar que en la OA intervienen todos los tejidos de la articulación, incluyendo la membrana sinovial y el hueso subcondral. En el cartílago, la PGE₂ tiene importantes efectos catabólicos y anti-anabólicos, aumentando la expresión de *MMP-13* y *ADAMTS-4* activadas por IL-1 β , e inhibiendo la síntesis de proteoglicanos (Attur *et al.*, 2008).

Diversos estudios han evaluado la modulación de la ruta de síntesis de PGE₂ en presencia de derivados de PRP y en diferentes modelos de inflamación *in vitro*, y han descrito resultados que corroboran los hallados en nuestro estudio. Por ejemplo, se apreció una inhibición en la expresión génica de COX-2 y PTGES en la línea inmortalizada de condrocitos articulares normales humanos Ibpva55 estimulados con un lisado procedente de PRP ($\sim 18 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, sin co-estímulo proinflamatorio) (Bendinelli *et al.*, 2010). De nuevo, el estudio de Moussa *et al.* (2017) en condrocitos primarios de rodilla también mostró un efecto inhibitor dosis-dependiente en la expresión de COX-2. Y en condrocitos OA de rodilla encapsulados en esferas de alginato y en presencia de IL-1 β (10 ng/ml), la suplementación del medio con 1% o 10% de lisado de PRP (PEF de 6-7,8, activado con CaCl₂) resultó en una inhibición en la expresión de PTGES (van Buul *et al.*, 2011). Sin embargo, los ejemplos anteriores únicamente evaluaron la expresión génica de estas enzimas, por lo que no conocemos si estos tratamientos, además de reducir la expresión de COX-2 y PTGES, dan efectivamente lugar a una reducción en la síntesis de la prostaglandina. Por otra parte, sí se observó un efecto inhibitor, tanto sobre la expresión de COX-2 como en la producción de PGE₂, en un modelo de daño mecánico *in vitro* con condrocitos bovinos, al añadir de manera simultánea un 10% de lisado de PRP ($20 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l; $7,5 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l). Sin embargo, este efecto se perdió al añadir el lisado 24 o 48 h tras la estimulación mecánica (Xie *et al.*, 2015).

Por el contrario, también encontramos dos trabajos en los que el tratamiento con PRP no da lugar a mejoras en este mediador. En una línea de condrocitos humanos inmortalizados estimulados con IL-1 β y *TNF α* , se aplicó un tratamiento con un lisado de PRP y no se encontró una reducción en COX-2, aunque sí una recuperación de la expresión de *SOX9*, *COLII* y *ACAN*, y la deposición de *COLII* y proteoglicanos (Wu *et al.*, 2011). En un modelo *in vitro* de inflamación endometrial bovina, se utilizó un lisado de PRP ($10 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, sin leucocitos), para, por un lado, estimular células endometriales directamente y, por otro, contrarrestar la inflamación inducida por un tratamiento con lipopolisacárido (LPS). La adición de un 5% de lisado indujo, en el primer caso, la

expresión de COX-2 (hasta 16 veces el control). En el segundo caso, tanto la expresión de COX-2 como la producción de PGE₂ a las 48 h fueron superiores a la condición estimulada con solo LPS, aunque sí se observaron reducciones en la expresión de NOS2 e IL-8 (Marini *et al.*, 2016). En nuestro modelo, de forma similar, la PGE₂ sigue elevada a las 48 h a pesar de las reducciones en expresión de sus enzimas principales de síntesis. Esto podría deberse, en parte, a un efecto dual ya descrito en condrocitos articulares humanos estimulados con IL-1 α (Pereira *et al.*, 2013), según el cual, tras una actividad proinflamatoria transitoria inicial, se produce una resolución del estado inflamatorio. Es posible que esto se aplique de igual modo a los niveles de IL-6, IL-8 y TNF α que hemos detectado a las 48 h, que podrían ser el remanente de un efecto proinflamatorio inicial, secretados al medio de cultivo y todavía no degradados, mientras que los análisis de expresión génica indicarían un efecto antiinflamatorio tras 48 horas de co-estimulación. En este sentido, sería interesante estudiar la evolución de la secreción de estos marcadores a tiempos más largos, p.ej. 72 h, para verificarlo.

Otro factor a tener en cuenta podría ser un aumento en la biodisponibilidad de glutatión (GSH). El GSH es un cofactor necesario para la síntesis de PGE₂ (Park *et al.*, 2006) y se ha demostrado, en un modelo *in vitro* de envejecimiento por exposición a radiación UVB, no solo que el PRP contiene GSH (Radha *et al.*, 1985), sino que puede inducir su síntesis (Jia *et al.*, 2017). La estimulación de las células expuestas a radiación con PRP con un PEF de 4 indujo un aumento de 2,7 veces los niveles basales de GSH. Por lo tanto, el incremento en el número de plaquetas en el PRP inicial podría haber resultado en un incremento dosis-dependiente de la concentración de GSH en los L-PRPs, que a su vez habría dado lugar a un aumento de la actividad de las enzimas de síntesis de PGE₂, a pesar de la reducción en su abundancia.

A mayores, hay que tener en cuenta que el calcio es también un cofactor que puede aumentar la actividad de ciertas enzimas como la fosfolipasa A2 (PLA2, *phospholipase A2*), encargada de liberar ácido araquidónico (ARA) de las membranas plasmáticas para que esté disponible para la síntesis de prostaglandinas (Park *et al.*, 2006). En nuestro modelo, el PRP se activó con una solución acuosa de CaCl₂ al 10% (p/v), lo que también podría haber influido en los niveles finales de PGE₂.

En cuanto al mediador MMP-13, en nuestro estudio observamos que todos los L-PRPs redujeron su expresión génica tanto en condrocitos OA de rodilla (Fig. 64Rl) como de cadera (Fig. 64Cj), con independencia de dosis en los primeros y una ligera pérdida de

efecto en los segundos. Los resultados de *ELISA* y de *ICQ* corroboraron este efecto en los condrocitos *OA* de rodilla (Fig. 64Rm), mientras que, en el caso de los condrocitos *OA* de cadera, la alta variabilidad no permitió ver diferencias significativas (Fig. 64Ck).

Las proteasas son las principales responsables de la degradación del cartílago y se ha visto que, mientras que en el cartílago sano se expresan a niveles muy bajos y participan en la remodelación y renovación del tejido, en el cartílago *OA* están sobreexpresadas por la acción de las citoquinas proinflamatorias (*IL-1 β* y *TNF α* , fundamentalmente) y tienen un papel crítico en el desarrollo y progresión de la enfermedad. En las etapas iniciales, se produce un incremento en la expresión de las agreganasas, seguido de un aumento en las *MMPs* (van Meurs *et al.*, 1999). La *MMP-13*, también conocida como colagenasa 3, es una de las proteasas más relevantes en la *OA*, ya que es capaz de degradar tanto la matriz de *COLII* como el *ACAN* y, además, su actividad es inducida por distintas vías catabólicas. En concreto, se conoce la presencia de sitios de unión para el factor de transcripción *AP-1* (*activation protein 1*, proteína de activación 1) en el promotor del gen que codifica *MMP-13*; este factor de transcripción es activado por diversos *GFs* y citoquinas, como *TGF- β* , *bFGF* y *TNF α* . Además, se ha demostrado la participación del factor de transcripción *NF- κ B* en la regulación de la expresión de *MMP-13*, de manera que su inhibición suprime los efectos activadores de *MMP-13* mediados por *IL-1* (Mueller y Tuan, 2011; Yan y Boyd, 2007).

Otros autores han descrito efectos anticatabólicos *in vitro* similares al de nuestro estudio al emplear condrocitos tratados con PRP o con alguno de sus derivados (Moussa *et al.*, 2017; Woodel-May *et al.*, 2011), y algunos han encontrado también un efecto pro-anabólico (Gilbertie *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2017). Otros, en cambio, no encontraron efecto modulador de *MMP-13*, a pesar de haber detectado un efecto pro-anabólico (van Buul *et al.*, 2011), e incluso se ha descrito un efecto catabólico al estimular células de menisco con *IL-1 α* y PRP ($40 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) (Lee *et al.*, 2016). No hay, hasta donde tenemos conocimiento, estudios que relacionen la dosis de plaquetas con el efecto del PRP sobre el catabolismo de la matriz cartilaginosa. Tan solo en el trabajo de Moussa *et al.* (2017), como vimos, se hace referencia a un efecto dosis-dependiente, describiendo una disminución de *MMP-13* al aumentar el porcentaje de suplemento de PRP en el medio. No obstante, cabe recordar que no proporcionan una caracterización del PRP empleado.

Por último, el *NO* es otro de los grandes mediadores oxidantes y catabólicos inducidos por *IL-1 β* en la *OA* (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). Entre sus funciones, cabe destacar su

participación en la supresión de la síntesis de GAGs y COLII, además de aumentar la actividad de las *MMPs*, activar la síntesis de IL-1 β y *TNF α* , y mediar la activación de la apoptosis en los condrocitos (Rahmati *et al.*, 2016; Blanco *et al.*, 1995). Respecto a su ruta de síntesis, tras la co-estimulación de condrocitos *OA* de rodilla y de cadera con IL-1 β , todos los L-PRPs redujeron acusadamente tanto la expresión génica (Fig. 64Rn, para condrocitos *OAr*, y Fig. 64Cl, para *OAc*) como la presencia en los lisados proteicos (*WB*) (Fig. 64Ro, para *OAr*, y Fig. 64Cm, para *OAc*) y en las células (ICQ) de la enzima *NOS2*, con independencia de la dosis plaquetaria. Debido a la interferencia del L-PRP con el reactivo de Griess disponible en el laboratorio y las limitaciones técnicas debidas al anticoagulante empleado, no fue posible cuantificar la producción del *NO* derivado de la actividad de *NOS2*.

No hay muchos estudios que describan el efecto del PRP o sus derivados sobre la expresión de *NOS2* o la producción de *NO* en condrocitos o células articulares, pero, en líneas generales, los resultados de otros modelos concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio en su capacidad inhibitoria sobre esta ruta oxidativa. En un modelo de co-cultivo de explantes de cartílago y membrana sinovial *OA in vitro* que se estimularon con IL-1 β , la adición de PRP bajo en leucocitos (PRP_{LP}=*ACP Arthrex*; $4,3 \pm 0,2 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l; $1,0 \pm 0,1 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l) o PRP rico en leucocitos (PRP_{HP}=*GPS III Biomet*; $8,2 \pm 1,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l; $23,0 \pm 1,4 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l) resultó en ambos casos en la inhibición de la producción de *NO* (Osterman *et al.*, 2015). También, empleando condrocitos bovinos en un modelo de daño mecánico, se demostró la capacidad de un lisado de PRP ($20 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l; $7,5 \cdot 10^3$ leucocitos/ μ l) para inhibir tanto la expresión de *NOS2*, como la síntesis de *NO* (Xie *et al.*, 2015). Además, se encontró un incremento en la expresión de los marcadores anabólicos COLII y ACAN. En cambio, en condrocitos *OA* de rodilla incluidos en esferas de alginato y tratados con IL-1 β y PRP (*PEF* 6-7,8; leucocitos 5,9-7,2x), no se encontró una modulación de la producción de *NO* (van Buul *et al.*, 2011).

Adicionalmente, realizamos experimentos *ex vivo* para corroborar los resultados obtenidos *in vitro* con condrocitos articulares a 48 h con discos de cartílago articular a medio plazo (21 días). Los resultados de estos experimentos sugieren que las concentraciones bajas de plaquetas en el L-PRP tienen efectos protectores sobre la matriz del cartílago y reducen la expresión de *MMPs* inducida por IL-1 β , mientras que en los L-PRPs con concentraciones muy elevadas de plaquetas se pierde este efecto. Por tanto, estos experimentos ratifican los

resultados obtenidos *in vitro* y la capacidad anticatabólica de los L-PRPs de bajas concentraciones de plaquetas.

Otros autores también han observado un efecto perjudicial de concentraciones elevadas de plaquetas en explantes de cartílago equinos (Kisiday *et al.*, 2012). En el trabajo mencionado, los explantes se estimularon con un 50% de seis tipos de PRP diferentes, obtenidos mediante kits comerciales y protocolos caseros. Las concentraciones superiores de plaquetas probadas fueron de unas $7,3 \pm 1,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l, lo que se encontraría entre los L-PRP6 y L-PRP15 de nuestro trabajo. Se vio que, tanto en presencia como en ausencia de IL-1 β , el incremento en la concentración de plaquetas disminuía la síntesis de MEC en el cartílago (reflejado como una reducción en la incorporación de prolina- 3 H y sulfato- 35 S) al tiempo que incrementaba la expresión de *ADAMTS-4*. Estos resultados concuerdan, por lo tanto, con los obtenidos en nuestro trabajo.

Por el contrario, también se encuentra algún estudio en donde los lisados de PRP con concentraciones elevadas de plaquetas no resultaron perjudiciales. En explantes de cartílago co-estimulados durante 28 días con IL-1 β y un 10% de lisado de PRP ($9,1 \pm 2,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l), se detectó una reducción en la expresión de mediadores catabólicos (*MMP-13*, *ADAMTS-5*, IL-1 β) y un incremento en la expresión de marcadores anabólicos (*COLII*, *ACAN*, *SOX9*) y en la deposición de COLII con respecto a los explantes estimulados solo con IL-1 β (Simental-Mendía *et al.*, 2018). Y la presencia de PRP_{LP} ($4,3 \pm 0,2 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) o PRP_{HP} ($8,2 \pm 1,0 \cdot 10^5$ plaquetas/ μ l) redujo la expresión de *ADAMTS-5* (proteasa que degrada proteoglicanos), al tiempo que se detectaba un incremento en la expresión de *ACAN*, en explantes de cartílago y membrana sinovial en un modelo de co-cultivo estimulado con IL-1 β (Osterman *et al.*, 2015).

6. MEDIADORES Y RUTAS IMPLICADAS EN LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS DERIVADOS DE PRP DESARROLLADOS

Una vez establecidos los efectos biológicos de los productos desarrollados, una segunda fase debería incluir una caracterización minuciosa y estudios funcionales para identificar las moléculas responsables y las rutas moleculares implicadas. Estos estudios se encuentran fuera del alcance de esta tesis. Sin embargo, como primera aproximación en este sentido y considerando que, tal como se ha destacado, la IL-1 β es la principal citoquina proinflamatoria implicada en la progresión de la OA, seleccionamos el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) como principal candidato a mediador de los efectos observados. IL-1Ra es una citoquina natural de la familia de IL-1 β que se une al receptor de IL1, pero que no induce ninguna respuesta intracelular. Es decir, IL-1Ra inhibe los efectos de IL-1 al bloquear su interacción con los receptores (Jacques *et al.*, 2006). La administración terapéutica de IL-1Ra exógeno se propuso inicialmente en los años 90 (Caron *et al.*, 1996; Dinarello y Thompson, 1991), y desde entonces se han desarrollado varios productos comerciales basados en el PRP y enriquecidos en IL-1Ra (Barreto y Braun, 2016; O'Shaughnessey *et al.*, 2011; Baltzer *et al.*, 2009).

Nos propusimos por tanto caracterizar el contenido en IL-1Ra en los L-PRPs preparados, así como su expresión en los condrocitos OA en condiciones inflamatorias, para evaluar su posible influencia en los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y anticatabólicos observados en nuestro trabajo.

En general, las concentraciones detectadas fueron bajas y no se observaron diferencias entre los L-PRPs como resultado de la concentración creciente de plaquetas. Sí se pudo confirmar su presencia en los medios de cultivo suplementados a tiempo final (48 h), experimentando una degradación de alrededor de un 30%.

La concentración de IL-1Ra en nuestros L-PRPs se encuentra dentro del rango descrito en la literatura (Barreto y Braun, 2016; Wright-Carpenter *et al.*, 2004; Meijer *et al.*, 2003). Se ha descrito que una proporción mínima IL-1:IL-1Ra de 1:10 es necesaria para que IL-1Ra pueda inhibir eficazmente la actividad proinflamatoria de IL-1 β (Granowitz *et al.*, 1991). Dado que la concentración de IL-1 β administrada como estímulo proinflamatorio fue de 5 ng/ml, la proporción experimental IL-1 β :IL-1Ra sería, aproximadamente, 50:1. En estas condiciones, la modulación antiinflamatoria mediada por IL-1Ra sería, en teoría, inoperativa. No obstante, se ha señalado que la proporción IL-1:IL-1Ra 1:10 solo sería aplicable en estudios *in vitro*, en sistemas sencillos en los que únicamente se usan estas dos

citoquinas para estimular las células, pero no cuando se utiliza un producto complejo como el PRP (O'Shaughnessey *et al.*, 2011). En esta situación, lo más probable es que los diversos factores antiinflamatorios contenidos en el preparado actúen coordinadamente para suprimir la inflamación.

En cualquier caso, se ha descrito que la expresión de IL-1Ra es indetectable en condrocitos OA en cultivo no estimulados, pero aumenta significativamente bajo el influjo de IL-1 β (Palmer *et al.*, 2002). La disminución de los niveles de expresión de IL-1Ra al co-estimular con los L-PRPs detectada en nuestros experimentos, por tanto, podría apuntar hacia un efecto antiinflamatorio ejercido por los L-PRPs, aunque otra posibilidad sería que alguno de los mediadores inflamatorios inducidos por IL-1 β estuviese inhibiendo la expresión de IL-1Ra. Por ejemplo, se ha demostrado que la elevada producción de NO inducida por IL-1 β modula negativamente la expresión de IL-1Ra (Pelletier *et al.*, 1996). No obstante, en nuestro estudio se detectó una supresión casi completa de NOS2, por lo que esta posibilidad parece poco probable.

Alternativamente, a la vista de nuestros resultados, también destaca como candidato probable la IL-10. Las IL-4, -10 y -13 son las principales representantes del grupo de citoquinas antiinflamatorias implicadas en la patogénesis de la OA. En particular, se ha demostrado que IL-10 ejerce efectos condroprotectores en el curso de la OA y que está implicada en la estimulación de la síntesis de COLII y ACAN. También se ha visto que es responsable de la inhibición de las MMPs, responsables de la destrucción del cartílago (Wojdasiewicz *et al.*, 2014; Wang y Lou, 2001). Según el esquema presentado en la Fig. 65, la IL-10 inhibiría de manera preferencial, respecto a los efectos de IL-4 y -13, la producción de MMPs y NOS2, por lo que un aumento de IL-10 podría también explicar los efectos diferenciales que encontramos entre los mediadores proinflamatorios y MMP-13 y NOS2. De hecho, otros autores han demostrado un aumento en la concentración intracelular de esta citoquina (y de TGF- β también) al estimular condrocitos OA con concentraciones crecientes de PRP (Moussa *et al.*, 2017).

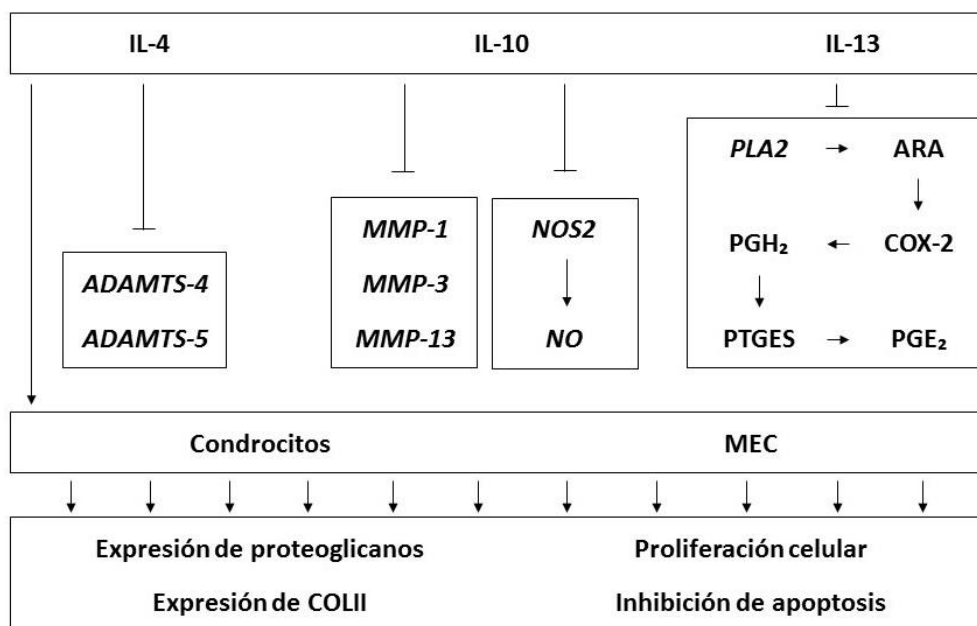


Fig. 65: Esquema de los efectos antiinflamatorios y condroprotectores de IL-4, IL-10 e IL-13 en el cartílago articular en el proceso OA. PGH₂: prostaglandina H₂ sintasa. Imagen tomada y adaptada de Wojdasiewicz *et al.*, 2014.

Los efectos diferenciales observados en los distintos marcadores también podrían deberse a los diferentes mecanismos moleculares que puedan estar participando en las respuestas de estimulación-inhibición descritas en nuestro trabajo. La modulación del factor de transcripción *NF-κB* es, con toda probabilidad, una de las principales rutas implicadas. Se ha descrito un papel crítico de *NF-κB* en la activación de IL-6, actuando posiblemente en combinación con el factor de transcripción *AP-1* y el adenosín monofosfato cíclico (*cAMP*, *cyclic adenosine monophosphate*) (Luo y Zheng, 2016; Wojdasiewicz *et al.*, 2014), y también de IL-8, en la que podría sinergizar con los factores de transcripción *AP-1* y *C/EBP-β* (*CCAAT/enhancer binding protein β*, proteína de unión a CCAAT/promotor) (Takahashi *et al.*, 2015). También activa la expresión de *TNFα* y la propia IL-1β (Wojdasiewicz *et al.*, 2014), así como COX-2 (Chun y Surh, 2004), PTGES (Park *et al.*, 2006), *NOS2* (Takahashi *et al.*, 2015; Pautz *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2010), *MMP-13* y *ADAMTS-4* (Mueller y Tuan, 2011). Las diferencias observadas entre los distintos marcadores podrían atribuirse a mecanismos específicos de modulación. Por ejemplo, en el caso de COX-2 y PTGES, la expresión es inducida en ambos casos por *NF-κB*, pero mediante rutas independientes para regular su expresión coordinada (Park *et al.*, 2006), lo que permitiría explicar las respuestas distintas al tratamiento con los L-PRPs. La participación de otras rutas de transcripción de señales y *GFs* determinaría también respuestas particulares. Además de lo que se acaba de describir para IL-6 e IL-8, la

expresión de COX-2 está regulada también por IL-6 y *cAMP*, mientras que en el caso de *MMP-13* entran en juego la ruta *AP-1* y los *GFs* *BMP-7*, *IGF-1* y *TGF-β*.

En definitiva, este trabajo es el primero, hasta donde tenemos conocimiento, en describir la estandarización de un derivado de PRP en base a la concentración absoluta de plaquetas. Los efectos biológicos encontrados son, por tanto, independientes de los niveles basales de plaquetas del paciente o donante.

Evaluando los resultados obtenidos de manera conjunta, se puede afirmar que, en las condiciones de nuestros modelos de *OA in vitro* y *ex vivo*, la efectividad de los derivados de PRP preparados para inducir la condrogénesis es dudosa en forma de soporte bioactivo para *TE*, aunque parece que sí podrían aplicarse como suplemento condrogénico en forma de lisado. Por otra parte, los L-PRPs preparados con concentraciones bajas de plaquetas ejercen efectos anticatabólicos, antioxidantes y antiinflamatorios. Es más, el lisado que presenta mejores propiedades es el resultante de la activación de PPP, lo que sugiere que estos efectos terapéuticos derivarían preferencialmente de factores plasmáticos (*HGF*, *IGF-1*, etc.) y que el enriquecimiento en plaquetas no aporta ningún beneficio adicional, sino que, por el contrario, resulta perjudicial en la respuesta proinflamatoria inicial, empeorando de manera dosis-dependiente.

Adicionalmente, este efecto es más acusado en condrocitos de cadera. Cabe destacar que nuestro trabajo también es el primero en evaluar los efectos de un derivado de PRP de manera independiente sobre condrocitos procedentes de tejido de rodilla y de cadera. La práctica totalidad de la literatura disponible se centra en células, tejido o pacientes con *OA* de rodilla, y en ningún caso se hacen comparaciones entre los comportamientos de las articulaciones por separado. Sin embargo, ya se pueden encontrar algunos estudios clínicos que indican que la *OA* de rodilla y la *OA* de cadera son dos patologías diferenciadas. Por ejemplo, en un estudio observacional comparativo se concluyó que los pacientes con *OA* de cadera muestran una progresión más rápida de la enfermedad, presentando síntomas más severos y cambios radiológicos más acusados que los pacientes con *OA* de rodilla, y en un periodo de tiempo más corto (Le Marshall *et al.*, 2013). Dabare *et al.* (2017) también señalan un comportamiento diferencial de los dos tipos articulares, siendo los pacientes con *OA* de cadera más propensos a requerir una cirugía de reemplazo protésico. Por lo tanto, la

realización de estudios preclínicos diferenciando las dos articulaciones es cada vez más relevante para identificar las diferencias moleculares de cara al desarrollo de dianas terapéuticas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La estandarización en función de la concentración absoluta de plaquetas permitió evaluar de forma objetiva los efectos de los L-PRPs resultantes en modelos de *OA in vitro*.
2. Los L-PRPs y G-PRPs no alteraron la viabilidad celular y aumentaron su proliferación.
3. Los L-PRPs inhibieron, de manera independiente de dosis, la condrogénesis y la adipogénesis de las *BM-MSCs*, pero estimularon la diferenciación osteogénica.
4. Los G-PRPs indujeron la condrogénesis de las *BM-MSCs* de manera dosis-dependiente.
5. El L-PRP de dosis bajas de plaquetas (0-0,5) mostró propiedades antiinflamatorias e inhibió la expresión génica de los marcadores IL-6, IL-8, *TNF α* , COX-2 y PTGES. En cambio, las dosis altas de plaquetas fueron proinflamatorias y estimularon la secreción de IL-6, *TNF α* y PGE₂ de manera dosis-dependiente.
6. El L-PRP mostró propiedades anticatabólicas e inhibió drásticamente la expresión génica y la secreción proteica de *MMP-13* en condrocitos *OA*, además de proteger la MEC del cartílago *OA* frente a la degradación inflamatoria y reducir la presencia de *MMP-3* y *MMP-13*.
7. El L-PRP mostró propiedades antioxidantes y redujo en gran medida la expresión génica y la abundancia proteica intracelular de *NOS2* en condrocitos *OA*, de manera independiente de la dosis de plaquetas.
8. Los L-PRPs indujeron respuestas diferentes en condrocitos *OA* de rodilla y de cadera, siendo los condrocitos de cadera los más sensibles a las dosis altas de plaquetas.

CONCLUSIONS

1. Standardization according to absolute platelet concentration allowed the objective evaluation of the effects of the resulting L-PRPs in *in vitro* OA models.
2. L-PRPs and G-PRPs did not influence cell viability and increased cell proliferation.
3. L-PRPs dose-independently inhibited chondrogenesis and adipogenesis of BM-MSCs but did stimulate osteogenic differentiation.
4. G-PRPs dose-dependently induced the chondrogenesis of BM-MSCs.
5. L-PRP of low platelet doses (0-0.5) showed anti-inflammatory properties and inhibited the gene expression of the markers IL-6, IL-8, TNF α , COX-2 and PTGES. Conversely, high platelet doses were pro-inflammatory and dose-dependently stimulated the secretion of IL-6, TNF α and PGE $_2$.
6. L-PRP showed anti-catabolic properties and drastically inhibited MMP-13 gene expression and protein secretion in OA chondrocytes. It also protected the *MEC* of OA cartilage against inflammatory degradation and reduced the presence of MMP-3 and MMP-13.
7. L-PRP showed anti-oxidant properties and largely reduced the gene expression and intra-cellular protein abundance of NOS2 in OA chondrocytes in a platelet dose-independent manner.
8. L-PRPs induced different responses in knee and hip OA chondrocytes. Hip chondrocytes were more sensitive to high platelet doses.

BIBLIOGRAFÍA

Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2(6):304-312

Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ *et al*. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14(12):1272-1280

Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104662

Andía I, Latorre P, Gómez MC, Burgos-Alonso N, Abate M, Maffulli N. Platelet-rich plasma in the conservative treatment of painful tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of controlled studies. *Br Med Bull*. 2014; 110(1):99-115

Andía I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N. Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes. *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473(5):1624-1634

Andía I, Sánchez M, Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12(1):7-22

Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, Merayo J, Durán J, Orive G. Plasma rich in growth factors for the treatment of ocular surface diseases. *Curr Eye Res*. 2016; 41(7):875-882

Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Oper Tech Orthop*. 2012; 22(1):25-32

Anitua E, Sánchez M, Aguirre JJ, Prado R, Padilla S, Orive G. Efficacy and safety of plasma rich in growth factors intra-articular infiltrations in the treatment of knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 2014; 30(8):1006-1017

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29(1):37-41

Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010; 62(7-8):741-752

Anitua E, Sánchez M, Zalduendo MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G *et al.* Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif.* 2009; 42(2):162-170

Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0121713

Arden N, Blanco F, Cooper C, Guermazi A, Hayashi D, Hunter D *et al.* Atlas of Osteoarthritis [Internet]. 1ª edición. Londres: Springer Healthcare; 2014 [Consultado 21 Ago 2018]. Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9781910315156>

Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G *et al.* Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol.* 2008; 181(7):5082-5088

Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10(1):1-4

Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17(2):152-160

Barreto A, Braun TR. A method to induce Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein from autologous whole blood. *Cytokine.* 2016; 81:137-141

Bayer A, Tohidnezhad M, Berndt R, Lippross S, Behrendt P, Klüter T *et al.* Platelet-released growth factors inhibit proliferation of primary keratinocytes in vitro. *Ann Anat.* 2018; 215:1-7

Beigi MH, Atefi A, Ghanaei HR, Labbaf S, Ejeian F, Nasr-Esfahani MH. Activated platelet-rich plasma improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(6):1327-1338

Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Ben Othman T, Ducrocq E *et al.* Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow:

comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3(1):6

Bandinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P *et al.* Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol.* 2010; 225(3):757-766

Benito-Ruiz P. Estructura y función de la articulación. En: Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* 1ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 81-90

Bennel KL, Hunter DJ, Paterson KL. Platelet-rich plasma for the management of hip and knee osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2017; 19(5):24

Bettach N, Baisamy L, Baghdiguan S, Payrastra B, Mangeat P, Bienvenue A. Mechanical constraint imposed on plasma membrane through transverse phospholipid imbalance induces reversible actin polymerization via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 11):2277-2284

Blanco FJ. Tratamiento de la artrosis. En: Sociedad Española de Reumatología. *Tratado de Enfermedades Reumáticas de la SER.* 7ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2018. p. 611-615

Blanco FJ, Lotz M. IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res.* 1995; 218(1):319-325

Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 1995; 146(1):75-85

Blanco FJ, Tornero Molina J. Artrosis. En: Farreras Rozman. *Medicina Interna.* 18ª edición. Barcelona: Elsevier; 2016. Cap. 112

Blanco FJ, Rego-Pérez I. Fisiopatología de la artrosis. En: Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* 1ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 163-177

Borghese C, Agostini F, Durante C, Colombatti A, Mazzucato M, Aldinucci D. Clinical-grade quality platelet-rich plasma releasate (PRP-R/SRGF) from CaCl₂-activated platelet

concentrates promoted expansion of mesenchymal stromal cells. *Vox Sang.* 2016; 111(2):197-205

Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Dragoo JL. The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med.* 2014; 42(5):1204-1210

Brossi PM, Moreira JJ, Machado TS, Baccarin RY. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res.* 2015; 11:98

Brower J, Blumberg S, Carroll E, Pastar I, Brem H, Chen W. Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Adv Skin Wound Care.* 2011; 24(11):524-532

Bunning RA, Richardson HJ, Crawford A, Skjodt H, Hughes D, Evans DB *et al.* The effect of interleukin-1 on connective tissue metabolism and its relevance to arthritis. *Agents Actions Suppl.* 1986; 18:131-152

Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhaes J, Meijide-Faílde R, Blanco FJ. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 β -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014; 22(7):1026-1035

Caramés B. El cartílago articular. En: Sociedad Española de Reumatología. *Tratado de Enfermedades Reumáticas de la SER.* 7ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2018. p. 17-19

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C *et al.* Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum.* 1996; 39(9):1535-1544

Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(1):144-154

Cerza F, Carnì S, Carcangiu A, Di Vavo I, Schiavilla V, Pecora A *et al.* Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *Am J Sports Med.* 2012; 40(12):2822-2827

Chahla J, Cinque ME, Piuzzi NS, Mannava S, Geeslin AG, Murray IR *et al.* A call for standardization in platelet-rich plasma preparation protocols and composition reporting: A systematic review of the clinical orthopaedic literature. *J Bone Joint Surg Am.* 2017; 99(20):1769-1779

Chang KV, Hung CY, Aliwarga F, Wang TG, Han DS, Chen WS. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2014; 95(3):562-575

Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J *et al.* Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(12):2146

Chen SH, Kuan TS, Kao MJ, Wu WT, Chou LW. Clinical effectiveness in severe knee osteoarthritis after intra-articular platelet-rich plasma therapy in association with hyaluronic acid injection: three case reports. *Clin Interv Aging.* 2016; 11:1213-1219

Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res Part B.* 2012; 100(4):948-955

Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(6):1089-1100

Chung E, Rytlewski JA, Merchant AG, Dhada KS, Lewis EW, Suggs LF. Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta Biomater.* 2015; 17:78-88

Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013; 6(3):299-309

Cole BJ, Karas V, Hussey K, Pilz K, Fortier LA. Hyaluronic acid versus platelet-rich plasma: A prospective, double-blind randomized controlled trial comparing clinical

outcomes and effects on intra-articular biology for the treatment of knee osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2017; 45(2):339-346

Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.* 1994; 46(2):205-229

Couceiro-Follente J, Silva-Ribera MT. Cartílago. Estructura y patología. En: Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Manual de cirugía ortopédica y traumatología.* 2ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 81-86

Cross JA, Cole BJ, Spatny KP, Sundman E, Romeo AA, Nicholson GP *et al.* Leukocyte-reduced platelet-rich plasma normalizes matrix metabolism in torn human rotator cuff tendons. *Am J Sports Med.* 2015; 43(122):2898-2906

Cuervo-Aguilera A. Biología articular. La membrana sinovial. En: Sociedad Española de Reumatología. *Tratado de Enfermedades Reumáticas de la SER.* 7ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2018. p. 12-16

Dabare C, Le Marshall K, Leung A, Page CJ, Choong PF, Lim KK. Differences in presentation, progression and rates of arthroplasty between hip and knee osteoarthritis: Observations from an osteoarthritis cohort study-a clear role for conservative management. *Int J Rheum Dis.* 2017; 20(10):1350-1360

Danisovic L, Varga I, Polák S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell.* 2012; 44(2):69-73

Dawood AS, Salem HA. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice. *Clin Exp Reprod Med.* 2018; 45(2):67-74

de Toro FJ. Anatomía y biomecánica de la articulación humana. En: Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* 1ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 73-80

Degen RM, Bernard JA, Kristin SO, Dines JS. Commercial separation systems designed for preparation of platelet-rich plasma yield differences in cellular composition. *HSS J.* 2017; 13(1):75-80

DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012; 28(7):998-1009

Dhillon MS, Karna SK, Dhatt SS, Behera P, Bhatia A. Can platelet rich plasma stimulate ACL growth in culture? A preliminary experience. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2015; 5(3):156-161

Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014; 7(4):189-197

Di Michele M, Van Geet C, Freson K. Recent advances in platelet proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2012; 9(4):451-66

Dinarelli CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*. 1991; 12(11):404-410

Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano (Diario Oficial L 311/67, 28.11.2001)

Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 2003, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes y por la que se modifica la Directiva 2001/83/CE (Diario Oficial L 33/30, 8.2.2003)

do Amaral RJ, Matsiko A, Tomazette MR, Rocha WK, Cordeiro-Spinetti E, Levingstone TJ *et al*. Platelet-rich plasma releasate differently stimulates cellular commitment toward the chondrogenic lineage according to concentration. *J Tissue Eng*. 2015; 6:2041731415594127

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(3):158-167

Dominici M, Le Blanck K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-317

Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol.* 2015; 170(2):150-61

Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009; 189(5):317-326

Duymus TM, Mutlu S, Dernek B, Komur B, Aydogmus S, Kesiktas FN. Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2017; 25(2):485-492

Elder S, Thomason J. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture. *Open Orthop J.* 2014; 8:78-84

Facchini A, Borzi RM, Marcu KB, Stefanelli C, Olivotto E, Goldring MB *et al.* Polyamine depletion inhibits NF-kappaB binding to DNA and interleukin-8 production in human chondrocytes stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Physiol.* 2005; 204(3):956-963

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.* 2002; 39(1-2):237-246

Fernández-Gutiérrez B. Epidemiología, etiología, anatomía patológica y patogenia de la artrosis. En: Sociedad Española de Reumatología. *Tratado de Enfermedades Reumáticas de la SER.* 7ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2018. p. 591-594

Filardo G, Kon E, Di Martino A, Di Matteo B, Merli ML, Cenacchi A *et al.* Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012; 13:229

Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L. Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. *Oral Implantol (Rome).* 2016; 8(4):96-113

Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of platelet-rich plasma extraction: Variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5(1):2325967116675272

Fortier LA, Hackett CH, Cole BJ. The effects of platelet-rich plasma on cartilage: Basic science and clinical application. *Oper Tech Sports Med.* 2011; 19(3):154-159

Freyman U, Metzloff S, Krüger JP, Hirsh G, Endres M, Petersen W *et al.* Effect of human serum and 2 different types of platelet concentrates on human meniscus cell migration, proliferation, and matrix formation. *Arthroscopy.* 2016; 32(6):1106-1116

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(14):1953-1960

Gilbertie JM, Long JM, Schubert AG, Berglund AK, Schaer TP, Schnabel LV. Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synoviocyte proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synoviocyte-derived inflammatory mediators. *Front Vet Sci.* 2018; 5:150

Giusti I, Di Francesco M, D'Ascenzo S, Palumbo P, Rughetti A, Dell'Orso L *et al.* Leukocyte depletion does not affect the in vitro healing ability of platelet rich plasma. *Exp Ther Med.* 2018; 15(4):4029-4038

Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; (427 Suppl):S37-S46

Goldring MB, Culley KL, Wondimu E, Otero M. Cartilage and chondrocytes. En: Firestein GS, Budd RC, Harris T, McInnes IB, Ruddy S, Sergent JS. *Kelley's textbook of rheumatology.* 8ª edición. Canadá: Saunders Elsevier; 2009. p. 34-59

Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K *et al.* Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater.* 2011; 21:202-220

Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015; 29(3):153-162

Görmeli G, Karakaplan M, Görmeli CA, Sarikaya B, Elmali N, Ersoy Y. Clinical effects of platelet-rich plasma and hyaluronic acid as an additional therapy for talar osteochondral lesions treated with microfracture surgery: a prospective randomized clinical trial. *Foot Ankle Int.* 2015; 36(8):891-900

Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J Biol Chem.* 1991; 266(22):14147-14150

Guney A, Akar M, Karaman I, Oner M, Guney B. Clinical outcomes of platelet rich plasma (PRP) as an adjunct to microfracture surgery in osteochondral lesions of the talus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015; 23(8):2384-2389

Guney A, Yurdakul E, Karaman I, Bilal O, Kafadar IH, Oner M. Medium-term outcomes of mosaicplasty versus arthroscopic microfracture with or without platelet-rich plasma in the treatment of osteochondral lesions of the talus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016; 24(4):1293-1298

Hamerman D, Klagsbrun M. Osteoarthritis. Emerging evidence for cell interactions in the breakdown and remodeling of cartilage. *Am J Med.* 1985; 78(3):495-499

Hapa O, Çakici H, Yüksel HY, Firat T, Kükner A, Aygün H. Does platelet-rich plasma enhance microfracture treatment for chronic focal chondral defects? An in-vivo study performed in a rat model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2013; 47(3):201-207

Hart R, Safi A, Komzák M, Jajtner P, Puskeiler M, Hartová P. Platelet-rich plasma in patients with tibiofemoral cartilage degeneration. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2013; 133(9):1295-1301

Hasan ML, Taz M, Lee BT. Effects of platelet-rich plasma on biological activity and bone regeneration of brushite-based calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018; 106(6):2316-2326

Hassan G, Bahjat M, Kasem I, Soukkarieh C, Aljamali M. Platelet lysate induces chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2018; 23:11

Ho STB, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2010; 31(1):38-47

Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20 (12):1465-1469

Hollander AP, Dickinson SC, Sims TJ, Brun P, Cortivo R, Kon E *et al*. Maturation of tissue engineered cartilage implanted in injured and osteoarthritic human knees. *Tissue Eng*. 2006; 12(7):1787-1796

Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2000; 96(1):188-194

Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(11):26035-26054

Idzko M, Pitchford S, Page C. Role of platelets in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135(6):1416-1423

INFORME/V1/23052013. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de plasma rico en plaquetas [Internet]. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2013. Disponible en:

<https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/medSituacionesEspeciales/docs/PRP-AEMPS-DEF-mayo13.pdf>

Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm*. 2006; 74:371-403

Jeong WH, Roh TS, Kim YS, Kang EH, Jung BK, Lee WJ *et al*. Acceleration of osteogenesis by platelet-rich plasma with acellular dermal matrix in a calvarial defect model. *Childs Nerv Syst*. 2016; 32(9):1653-1659

Jia C, Lu Y, Bi B, Chen L, Yang Q, Yang P *et al*. Platelet-rich plasma ameliorates senescence-like phenotypes in a cellular photoaging model. *RSC Adv*. 2017; 7(6):3152-3160

Jiménez-Castellanos Ballesteros J, Catalina Herrera CJ, Carmona Bono A. Anatomía humana general. 1ª edición. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones; 2002

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998; 238:265-272

Joshi-Jubert N, Rodríguez L, Reverté-Vinaixa MM, Navarro A. Platelet-rich plasma injections for advanced knee osteoarthritis: A prospective, randomized, double-blinded clinical trial. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5(2):2325967116689386

Kaps C, Loch A, Haisch A, Smolian H, Burmester GR, Haupl T *et al.* Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med Biol Eng Comput.* 2002; 40(4):485-490

Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R *et al.* Platelet-rich plasma powder: A new preparation method for the standardization of growth factor concentrations. *Am J Sports Med.* 2017; 45(4):954-960

Kingsbury SR, Gross HJ, Isherwood G, Conaghan PG. Osteoarthritis in Europe: impact on health status, work productivity and use of pharmacotherapies in five European countries. *Rheumatology (Oxford).* 2014; 53(5):937-947

Kisiday JD, McIlwraith CW, Rodkey WG, Frisbie DD, Steadman JR. Effects of platelet-rich plasma composition on anabolic and catabolic activities in equine cartilage and meniscal explants. *Cartilage.* 2012; 3(3):245-254

Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Chappuis V, Buser D, Schaller B *et al.* Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behavior. *BMC Oral Health.* 2017; 17(1):91

Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J *et al.* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(1):128-135

Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G *et al.* Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxiapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010; 11:220

Kon E, Mandelbaum B, Buda R, Filardo G, Delcogliano M, Timoncini A *et al.* Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2011; 27(11):1490-1501

Kraus VB, Blanco FJ, M Englund, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23(8):1233-1241

Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C. Human platelet-rich plasma stimulates migration and differentiation of human subchondral progenitor cells. *J Orthop Res*. 2012; 30(6):845-852

Krüger JP, Ketzmar AK, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C. Human platelet-rich plasma induces chondrogenic differentiation of subchondral progenitor cells in polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014; 102(4):681-692

Lana JFSD, Purita J, Paulus C, Huber SC, Rodrigues AA, Santana MH *et al.* Contributions for classification of platelet-rich plasma – proposal of a new classification: MARSPILL. *Regen Med*. 2017; 12(5):565-574

Laudy AB, Bakker EW, Rekers M, Moen MH. Efficacy of platelet-rich plasma injections in osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015; 49(10):657-672

Le Marshall KF, Yee B, Dieppe PA, Leung A, Page C, Choong PF *et al.* Differences between patients with hip and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21(Suppl):S139

Lee A, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ *et al.* A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. 2013a; 527(2):440-447

Lee HR, Shon OJ, Park SI, Kim HJ, Kim S, Ahn MW *et al.* Platelet-rich plasma increases the levels of catabolic molecules and cellular dedifferentiation in the meniscus of a rabbit model. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(1):120

Lee JK, Lee S, Han SA, Seong SC, Lee MC. The effect of platelet-rich plasma on the differentiation of synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2014; 32(10):1317-1325

Lee KS, Shetty AA, Kim SJ, Kim YJ, Jun YJ, Choi NY *et al.* Intra-articular injections of platelet-rich plasma in patients with knee pain of articular cartilage origin (degenerative chondropathy and early OA). *Tissue Eng Regen Med.* 2013b; 10(6):329-335

Levy DM, Petersen KA, Scalley-Vaught M, Christian DR. Injections for knee osteoarthritis: corticosteroids, viscosupplementation, platelet-rich plasma, and autologous stem cells. *Arthroscopy.* 2018; 34(5):1730-1743

Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (BOE-A-2006-13554)

Liao HT, James IB, Marra KG, Rubin JP. The effects of platelet-rich plasma on cell proliferation and adipogenic potential of adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21(21-22):2714-2722

Liou JJ, Rothrauff BB, Alexander PG, Tuan RS. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation of adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2018

Lippross S, Moeller B, Haas H, Tohidnezhad M, Steubesand N, Wruck CJ *et al.* Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(11):3344-3353

Liu X, Yang Y, Niu X, Lin Q, Zhao B, Wang Y *et al.* An in situ photocrosslinkable platelet rich plasma – Complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomater.* 2017; 62:179-187

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-408

Loza E, López-Gómez JM, Abasolo L, Maese J, Carmona L, Batlle-Gualda E *et al.* Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum.* 2009; 61(2):158-165

Lubis AM, Lubis VK. Adult bone marrow stem cells in cartilage therapy. *Acta Med Indones.* 2012; 44(1):62-68

Luo Y, Zheng SG. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front Immunol.* 2016; 7:604

Lynch MD, Bashir S. Applications of platelet-rich plasma in dermatology: A critical appraisal of the literature. *J Dermatolog Treat.* 2016; 27(3):285-289

Ma K, Titan AL, Stafford M, Zheng CH, Levenston ME. Variations in chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin/alginate blended hydrogels. *Acta Biomater.* 2012; 8(10):3754-3764

Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraud L *et al.* DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016; 2(1):e000060

Mariani E, Canella V, Cattini L, Kon E, Marcacci M, Di Matteo B *et al.* Leukocyte-rich platelet rich plasma injections do not up-modulate intra-articular pro-inflammatory cytokines in the osteoarthritic knee. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156137

Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P *et al.* Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 14(1):58

Markopoulou CE, Markopoulos P, Dereka XE, Pepelassi E, Vrotsos IA. Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; 9(3):167-172

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008; 22(2):351-384

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; 85(6):638-646

Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol.* 1970; 67(9):338-359

Matz EL, Pearlman AM, Terlecki RP. Safety and feasibility of platelet rich fibrin matrix injections for treatment of common urologic conditions. *Investig Clin Urol.* 2018; 59(1):61-65

Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S *et al.* A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R.* 2015; 7(4 Suppl):S53-S59

Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira Fernandez P, Goyanes N *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(1):275-284

Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP *et al.* Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 94(4):308-316

Meheux CJ, McCulloch PC, Lintner DM, Varner KE, Harris JD. Efficacy of intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: a systematic review. *Arthroscopy.* 2016; 32(2):495-505

Mei-Dan O, Carmont MR, Laver L, Mann G, Maffulli N, Nyska M. Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus. *Am J Sports Med.* 2012; 40(3):534-541

Meijer H, Reinecke J, Becker C, Tholen G, Wehling P. The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. *Inflamm Res.* 2003; 52(10):404-407

Mihaylova Z, Mitev V, Stanimirov P, Isaeva A, Gateva N, Ishkitiev N. Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta Odontol Scand.* 2017; 75(1):1-11

Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A *et al.* Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy.* 2012; 28(5):688-701

Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(7):1185-1195

Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V *et al.* Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15(3):431-435

Moatshe G, Morris ER, Cinque ME, Pascual-Garrido C, Chahla J, Engebretsen L *et al.* Biological treatment of the knee with platelet-rich plasma or bone marrow aspirate concentrates. *Acta Orthop.* 2017; 88(6):670-674

Mobasheri A, Csaki C, Clutterbuck AL, Rahmanzadeh M, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy. *Histol Histopathol.* 2009; 24(3):347-366

Monfort-Faure J, Trujillo-Martín E. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago. En: Sociedad Española de Reumatología. *Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.* 1ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2010. p. 91-108

Moore KL, Agur AMR. *Fundamentos de anatomía con orientación clínica.* 2ª edición. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2003

Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; (4):CD010071

Moroz A, Bittencourt RA, Almeida RP, Felisbino SL, Deffune E. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: an improved approach in cartilage tissue engineering. *Platelets.* 2013; 24(3):219-225

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8):1894-1904

Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(1):124

Moussa M, Lajeunesse D, Hilal G, El Atat O, Haykal G, Serhal R *et al.* Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritis cartilage. *Exp Cell Res.* 2017; 352(1):146-156

Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R.* 2011; 3(6 Suppl 1):S3-S11

Namazi H, Mehbudi A. Investigating the effect of intra-articular PRP injection on pain and function improvement in patients with distal radius fracture. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2016; 102(1):47-52

Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol.* 2000; 165(6):3402–3410

O’Shaughnessey KM, Panitch A, Woodel-May JE. Blood-derived anti-inflammatory protein solution blocks the effect of IL-1 β on human macrophages in vitro. *Inflamm Res.* 2011; 60(10):929-936

Organización Mundial de la Salud. Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud [Internet]. Luxemburgo: Organización Mundial de la Salud; 2015 [Consultado 20 Ago 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/es/>

Osterman C, McCarthy MB, Cote MP, Beitzel K, Bradley J, Polkowski G *et al.* Platelet-rich plasma increases anti-inflammatory markers in a human coculture model for osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2015; 43(6):1474-1484

Otero L, Carrillo N, Calvo-Guirado JL, Villamil J, Delgado-Ruíz RA. Osteogenic potential of platelet-rich plasma in dental stem-cell cultures. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 55(7):697-702

Otsuka S, Aoyama T, Furu M, Ito K, Jin Y, Nasu A *et al.* PGE2 signal via EP2 receptors evoked by a selective agonist enhances regeneration of injured articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009; 17(4):529-538

Pakfar A, Irani S, Hanaee-Ahvaz H. Expressions of pathologic markers in PRP based chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells. *Tissue Cell.* 2017; 49(1):122-130

- Palmer G, Guerne PA, Mezin F, Maret M, Guicheux J, Goldring MB *et al.* Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res.* 2002; 4(3):226-231
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clin Immunol.* 2006; 119(3):229-240
- Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* 2013; 41(2):356-364
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expresión of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010; 23(2):75-93
- Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet rich plasma: a short review of certain bioactive compounds. *Open Med (Wars).* 2016; 11(1):242-247
- Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996; 4(1):77-84
- Pelletier JP, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum.* 1991; 20(6 Suppl 2):12-25
- Pereira RC, Scaranari M, Benelli R, Strada P, Reis RL, Cancedda R *et al.* Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(11-12):1476-1488
- Perera JR, Gikas PD, Bentley G. The present state of treatments for articular cartilage defects in the knee. *Ann R Coll Surg Engl.* 2012; 94(6):381-387
- Radha E, Hill TD, Rao GH, White JG. Glutathione levels in human platelets display a circadian rhythm in vitro. *Thromb Res.* 1985; 40(6):823-831
- Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone.* 2016; 85:81-90

Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión (BOE-A-2005-15514)

Reglamento 1347/2007/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifica la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento 726/2004/CE (Diario Oficial L 300/32, 17.11.2007)

Renn TY, Kao YH, Wang CC, Burnouf T. Anti-inflammatory effects of platelet biomaterials in a macrophage cellular model. *Vox Sang.* 2015; 109(2):138-147

Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JA, Bierma-Zeinstra SM *et al.* Rationale, secondary outcome scores and 1-year follow-up of a randomised trial of platelet-rich plasma injections in acute hamstring muscle injury: the Dutch Hamstring Injection Therapy study. *Br J Sports Med.* 2015; 49(18):1206-1212

Riboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, Fortier L, Cole B. Effect of leukocyte concentration on the efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2016; 44(3):792-800

Richler C, Yaffe D. The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol.* 1970; 23(1):1-22

Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med.* 2009; 266(4):390-405

Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM *et al.* Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nar Rev Rheumatol.* 2016; 12(10):580-592

Roelofs AJ, Rocke JP, De Bari C. Cell-based approaches to joint surface repair: a research perspective. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(7):892-900

Roselló-Camps À, Monje A, Lin GH, Khoshkam V, Chávez-Gatty M, Wang HL *et al.* Platelet-rich plasma for periodontal regeneration in the treatment of intrabony defects: a meta-analysis on prospective clinical trials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015; 120(5):562-574

Rubio-Azpeitia E, Bilbao AM, Sánchez P, Delgado D, Andía I. The properties of 3 different plasma formulations and their effects on tendinopathic cells. *Am J Sports Med.* 2016; 44(8):19-52-1961

Sánchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A *et al.* A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy.* 2012; 28(8):1070-1078

Scher JU, Pillinger MH, Abramson SB. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2007; 9(1):9-15

Schmidt N, Pautz A, Art J, Rauschkolb P, Jung M, Erkel G *et al.* Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(5):722-732

Sclafani AP, Azzi J. Platelet preparations for use in facial rejuvenation and wound healing: a critical review of current literature. *Aesthetic Plast Surg.* 2015; 39(4):495-505

Sengul AT, Buyukkkarabacak YB, Altunkaynak BZ, Yetim TD, Altun GY, Sengul B *et al.* Effects of platelet-rich plasma on cartilage regeneration after costal cartilage resection: a stereological and histopathological study. *Acta Chir Belg.* 2017; 117(1):21-28

Shen L, Yuan T, Chen S, Xie X, Zhang C. The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res.* 2017; 12(1):16

Shinmei M, Okada Y, Masuda K, Naramatsu M, Kikuchi T, Harigai M *et al.* The mechanism of cartilage degradation in osteoarthritic joints. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 19(4 Suppl 1):16-20

Simental-Mendía M, Vilchez-Cavazos F, García-Garza R, Lara-Arias J, Montes-de-Oca-Luna R, Said-Fernández S *et al.* The matrix synthesis and anti-inflammatory effect of autologous leukocyte-poor platelet rich plasma in human cartilage explants. *Histol Histopathol.* 2018; 33(6):609-618

Simonpieri A, Del Coro M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G *et al.* Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-

rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(7):1231-1256

Singh B, Goldberg LJ. Autologous platelet-rich plasma for the treatment of pattern hair loss. *Am J Clin Dermatol.* 2016; 17(4):359-367

Sommeling CE, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Stillaert FB, Monstrey S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013; 66(3):301-311

Souza FG, Fernandes BL, Rebelatto CLK, Aguiar AM, Fracaro L, Brofman PRS. Proliferation and differentiation of stem cells in contact with eluate from fibrin-rich plasma membrane. *Rev Bras Ortop.* 2017; 53(1):45-52

Spartalis E, Tomos P, Moris D, Athanasiou A, Markakis C, Spartalis MD *et al.* Role of platelet-rich plasma in ischemic heart disease: An update on the latest evidence. *World J Cardiol.* 2015; 7(10):665-670

Speth C, Rambach G, Wuerzner R, Lass-Floerl C, Kozarcanin H, Hamad OA, *et al.* Complement and platelets: Mutual interference in the immune network. *Mol Immunol.* 2015; 67(1):108-118

Spreafico A, Chellini F, Frediani B, Bernardini G, Niccolini S, Serchi T *et al.* Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2009; 108(5):1153-1165

Stessuk T, Puzzi MB, Chaim EA, Alves PC, de Paula EV, Forte A *et al.* Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res.* 2016; 308(7):511-520

Suárez-López Del Amo F, Monje A, Padiál-Molina M, Tang Z, Wang HL. Biologic agents for periodonal regeneration and implant site development. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:957518

Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018; 2(3):450-460

- Sykes JG, Kuiper JH, Richardson JB, Roberts S, Wright KT, Kuiper NJ. Impact of human platelet lysate on the expansion and chondrogenic capacity of cultured human chondrocytes for cartilage cell therapy. *Eur Cell Mater.* 2018; 35:255-267
- Takahashi A, de Andrés MC, Hashimoto K, Itoi E, Oreffo ROC. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23(11):1946-1954
- Talay-Çalis H, Tomruk-Sütbeyaz S, Güler E, Halici C, Sayan H, Koç A *et al.* Efficacy of intra-articular autologous platelet rich plasma application in knee osteoarthritis. *Arch Rheumatol.* 2015; 30(3):198-205
- Tavakolinejad S, Ebrahimzadeh Bidskan A, Ashraf H, Hamidi Alamdari D. A glance at methods for cleft palate repair. *Iran Red Crescent Med J.* 2014a; 16(9):e15393
- Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, Bideskan AE, Mossavi N, Parizadeh SMR *et al.* The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Iran Biomed J.* 2014b; 18(3):151-157
- Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H *et al.* T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol.* 2012; 198(4):561-574
- Tohidnezhad M, Bayer A, Rasuo B, Hock VJP, Kweider N, Fragoulis A *et al.* Platelet-released growth factors modulate the secretion of cytokines in synoviocytes under inflammatory joint disease. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017:1046438
- Tong S, Zhang C, Liu J. Platelet-rich plasma exhibits beneficial effects for rheumatoid arthritis mice by suppressing inflammatory factors. *Mol Med Rep.* 2017; 16(4):4082-4088
- Vaisman A, Figueroa D, Calvo R, Espinosa M, Melean P, Gallego M *et al.* Steroids and platelet-rich plasma as adjuvants to microfracture for the treatment of chondral lesions in an animal model: can the healing be enhanced? *Cartilage.* 2012; 3(2):118-127
- van Buul GM, Koevoet WLM, Kops N, Bos PK, Verhaar JAN, Weinans H *et al.* Platelet rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med.* 2011; 39(11):2362-2370

van Meurs JB, van Lent PL, Holthuysen AE, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB. Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neopeptides in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(6):1128-1139

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, De Paeppe A *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* [revista en Internet]. 2002 [consultado el 07/08/2018]; 3(7):RESEARCH0034 [12p.]. Disponible en: <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>

Vaquerizo V, Plasencia MA, Arribas I, Seijas R, Padilla S, Orive G *et al.* Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthroscopy.* 2013; 29(10):1635-1643

Vela-Anero Á, Hermida-Gómez T, Gato-Calvo L, Vaamonde-García C, Díaz-Prado S, Mejjide-Faílde R, Blanco FJ, Burguera EF. Long-term effects of hydrogen sulfide on the anabolic-catabolic balance of articular cartilage in vitro. *Nitric Oxide.* 2017; 70:42-50

Vilahur G, Gutiérrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol.* 2018; pii:S1537-1891(18)30292-1

Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordelazze J, Brondello JM, Jorgensen C *et al.* Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009; 4(4):318-329

von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007; 100(1):27-40

Wang Y, Lou S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. *Chin Med J (Engl.).* 2001; 114(7):723-725

Weinberg JB, Fermor B, Guilak F. Nitric oxide synthase and cyclooxygenase interactions in cartilage and meniscus: relationships to joint physiology, arthritis, and tissue repair. *Subcell Biochem.* 2007; 42:31-62

Welsch U. Sobotta. *Histología.* 2ª edición. Madrid: Editorial Panamericana; 2009

- Weyrich AS. Platelets: more than a sack of glue. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014; 2014(1):400-403
- Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, Siau JL, Rose P, Schantz JT *et al*. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *FASEB J*. 2004; 18(12):1395-1397
- 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(11):1294-1299
- Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:561459
- Woodel-May J, Matuska A, Oyster M, Welch Z, O'Shaughnessey K, Hoepfner J. Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 β and TNF α -stimulated human articular chondrocytes. *J Orthop Res*. 2011; 29(9):1320-1326
- Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med*. 2004; 25(8):588-593
- Wu CC, Chen WH, Zao B, Lai PL, Lin TC, Lo HY *et al*. Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*. 2011; 32(25):5847-5854
- Wu W, Chen 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(10):1951-1957
- Xie X, Ulici V, Alexander PG, Jiang Y, Zhang C, Tuan RS. Platelet-rich plasma inhibits mechanically induced injury in chondrocytes. *Arthroscopy*. 2015; 31(6):1142-1150
- Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W *et al*. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2012; 33(29):7008-7018

Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16(1):204

Yamada Y, Ueda M, Naiki, T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng.* 2004; 10(5-6):955-964

Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007; 211(1):19-26

Yan R, Gu Y, Ran J, Hu Y, Zheng Z, Zeng M *et al.* Intratendon delivery of leukocyte-poor platelet-rich plasma improves healing compared with leukocyte-rich platelet-rich plasma in a rabbit achilles tendinopathy model. *Am J Sports Med.* 2017; 45(8):1909-1920

Yerlikaya M, Talay-Çalis H, Sütbeyaz S, Sayan H, Ibis N Koç A *et al.* Comparison of effects of leukocyte-rich and leukocyte-poor platelet-rich plasma on pain and functionality in patients with lateral epicondylitis. *Arch Rheumatol.* 2017; 33(1):73-79

Yin W, Xu H, Sheng J, Xu Z, Xie X, Zhang C. Comparative evaluation of the effects of platelet-rich plasma formulations on extracellular matrix formation and the NF-κB signaling pathway in human articular chondrocytes. *Mol Med Rep.* 2017; 15(5):2940-2948

Yu T, Pan H, Hu Y, Tao H, Wang K, Zhang C. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J Orthop Surg Res.* 2017; 12(1):178

Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:9060143

Zaleski-Larsen LA, Fabi SG, McGraw T, Taylor M. Acne scar treatment: a multimodality approach tailored to scar type. *Dermatol Surg.* 2016; 42 Suppl 2:S139-S149

Zhang JY, Fabricant PD, Ishmael CR, Wang JC, Petrigliano FA, Jones KJ. Utilization of platelet-rich plasma for musculoskeletal injuries: an analysis of current treatment trends in the United States. *Orthop J Sports Med.* 2016a; 4(12):2325967116676241

Zhang L, Chen S, Chang P, Bao N, Yang C, Ti Y *et al.* Harmful effects of leukocyte-rich platelet-rich plasma on rabbit tendon stem cells in vitro. *Am J Sports Med.* 2016b; 44(8):1941-1951

Zhang X, Wang J, Ren M, Li L, Wang Q, Hou X. A novel collagen/platelet-rich plasma (COL/PRP) scaffold: preparation and growth factor release analysis. *Cell Tissue Bank.* 2016c; 17(2):327-334

Zhao W, Jin X, Cong Y, Liu Y, Fu J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013; 88(3):327-339

Zhu H, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y *et al.* Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(11):1627-1637

ANEXOS

ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO



BIOBANCO A CORUÑA

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TÍTULO LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DR. FRANCISCO JAVIER BLANCO GARCÍA.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO DE REUMATOLOGÍA.

CENTRO HOSPITALARIO: XERENCIA XESTIÓN INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). – INSTITUTO INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA A CORUÑA (INIBIC)

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la Línea de investigación de de las enfermedades reumatológicas, es decir, patologías reumáticas y/o del aparato locomotor.

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de esta **Línea de investigación** es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el Dr. Francisco Javier Blanco García y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Reumatología del CHUAC - XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las patologías reumatológicas en general, y particularmente enfermedades reumáticas y/o del aparato locomotor.

Debe saber que la realización de los proyectos de investigación en los que se utilicen muestras humanas, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta investigación es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)*, la *Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM)*, el *Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre*.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (*Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos*) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad del **Dr. Francisco Javier Blanco García**.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimadas.

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario

obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. *(Más información en el apartado de Confidencialidad.)*

En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC).

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con esta investigación, se realizará de manera codificada (se mantendrá por el investigador responsable en este centro el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con esta línea de investigación de la insuficiencia cardíaca usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Secretaría del Servicio de Reumatología de la XXIAC, a la atención del Dr. Francisco Javier Blanco García.
- **CORREO POSTAL**: Dr. Francisco Javier Blanco García. Consultas Externas Reumatología. Planta 3ª, Hospital Universitario A Coruña. Xerencia Xestión Integrada A Coruña. As Xubias, 84. A Coruña. 15006
- **CORREO ELECTRÓNICO**: Fblagar@sergas.es

Usted puede contactar con el responsable de la Línea de investigación de insuficiencia cardíaca, D. Francisco J. Blanco García si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el **Teléfono: 981 17 63 99 / 981 17 63 06**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.



Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención del responsable de esta investigación D. Francisco Javier Blanco García, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que así lo autorice en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones del (*indicar el Centro del que depende el Biobanco*), bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores solicitantes de las muestras, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá por el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.



El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron.

BIOBANCO A CORUÑA

TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: Angel Concha López

TELÉFONO DE CONTACTO: 981 17 64 37. CORREO ELECTRÓNICO: BioBanco.CHUAC@sergas.es

CIERRE DEL BIOBANCO.-

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario http://www.inibic.es/inv_apoyo_biobanco.html y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Muchas gracias por su colaboración.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada
A Coruña

BIOBANCO A CORUÑA

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo, (Nombre y apellidos del participante manuscritos) he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto participar en la Línea de investigación de enfermedades reumatológicas con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado.

RESTRICCIONES DE USO (usted podrá indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que NO manifiesta ninguna condición de uso).

- NO** autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que
- NO** autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO** acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO** quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- NO** autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información

Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:

.....

Firma del participante

Identidad del participante:

Firma de la persona que informa

Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo

Confirmando el consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre

Identidad del testigo: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, a de de

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.



BIOBANCO A CORUÑA

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al.....(*nombre del Centro Sanitario*), que doy con esta fecha por finalizada.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña: con DNI

En calidad de: (*señale la opción aplicable a su caso*)

Testigo que firma en lugar

Representante legal

de D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al.....(*nombre del Centro Sanitario*), que doy con esta fecha por finalizada.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

ARTÍCULOS

Relacionados con la tesis

1. L Gato-Calvo, T Hermida-Gómez, C Ruiz-Romero, EF Burguera, FJ Blanco. Proliferative and anti-inflammatory effects of platelet rich plasma releasates on knee osteoarthritic chondrocytes in vitro. [Enviado a Current Pharmaceutical Biotechnology]
2. L Gato-Calvo, J Magalhaes, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. Platelet rich plasma in osteoarthritis treatment: a review of current evidence. Ther Adv Chronic Dis. DOI 10.1177/ 2040622319825567

Relacionados con otras líneas del grupo de investigación

1. A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, L Gato-Calvo, C Vaamonde-García, S Díaz-Prado, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Long term effects of hydrogen sulfide on the anabolic-catabolic balance of articular cartilage in vitro. Nitric Oxide. 2017; 70:42-50.

CAPÍTULOS DE LIBRO

1. EF Burguera, L Gato-Calvo, C Rodríguez-Pereira, FJ Blanco, JC Silva Magalhaes. Regenerative medicine approaches for osteoarthritis. En: SM Group. Osteoarthritis. ISBN: 978-1-944685-73-7.

PROCEEDINGS DE CONFERENCIAS

Relacionados con la tesis

1. L Gato-Calvo, T Hermida-Gómez, J Magalhaes, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. Chondrogenic potential of standardised platelet rich plasma on osteoarthritic mesenchymal stromal cells. Osteoarthritis Cartilage. 2018; 26(Suppl 1):S313
2. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, EF Burguera, FJ Blanco. Anti-inflammatory effects of standardirzed platelet-rich plasma releasates in knee and hip OA chondrocytes [abstract]. Arthritis Rheumatol. 2017; 69(Suppl 10)

3. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. Proliferative and anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25(Suppl 1):S270-S271
4. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, J Núñez-Amboage, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. In vitro chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells embedded in fibrin gels. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24(Suppl 1):S510-S511

Relacionados con otras líneas del grupo de investigación

1. EF Burguera, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, R Meijide-Faílde, FJ Blanco. SAT0056 Osteoarthritis severity is reduced by intra-articular administration of hydrogen sulfide. *Ann Rheum Dis*. 2018; 77(Suppl 2):892
2. A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, EF Burguera, R Meijide-Faílde, FJ Blanco. Intra-articular administration of hydrogen sulphide ameliorates severity of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018; 26(Suppl 1):S287-S288
3. N Gómez-Prieto, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Anti-oxidant effects of sulfurous spring water on osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24(Suppl 1):S495-S496
4. A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Reduced hydrogen sulfide synthesis in the joint, a new player in the pathogenesis of osteoarthritis [abstract]. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67(Suppl 10)
5. EF Burguera, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. El sulfuro de hidrógeno inhibe los procesos de catabolismo inducidos por interleukina 1beta en el cartílago hialino humano. IV Cibap Boí. Balnea. 2015; 10:303-304. Serie de monografías. F Maraver, L Vela, WJ Ankli (Eds.). ISBN: 978-84-606-9368-0
6. A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Endogenous hydrogen sulfide production is reduced in OA cartilage. Possible contribution to the pathogenesis of OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23(Suppl 2):A311

COMUNICACIONES ORALES

Relacionadas con la tesis

1. L Gato-Calvo. Fundamentos del PRP y su aplicación en reumatología. Cátedra BioIbérica de Ingeniería Tisular y Terapia Celular. A Coruña, 18 de noviembre de 2015.

2. L Gato-Calvo, EF Burguera, FJ Blanco. Geles de fibrina y células madre mesenquimales para regeneración de cartílago. II Foro da Rede Galega de Biomateriais. San Simón, Vigo, 09 de octubre de 2015.

Relacionadas con otras líneas del grupo de investigación

1. EF Burguera, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, C Vaamonde-García, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. Administration of intra-articular hydrogen sulphide reduces the severity of osteoarthritis in vivo. 43rd World Congress of the International Society of Medical Hydrology (ISMH). Amarante, Portugal, 10-13 de junio de 2018.
2. EF Burguera, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Vaamonde-García, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. Efectos anti-catabólicos del sulfuro de hidrógeno en tejido articular artrósico. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hidrología Médica. Amarante, Portugal, 10-13 de junio de 2018.
3. EF Burguera, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, FJ Blanco, A Fioravanti, R Meijide-Faílde. Efectos anti-inflamatorios de las aguas minero-medicinales en artrosis. V Congreso Iberoamericano de Peloides 2017. Badajoz, 11-14 de junio de 2017.
4. A Vela-Anero, EF Burguera, L Gato-Calvo, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. Efectos anticatabólicos del sulfuro de hidrógeno en tejido articular artrósico. I Congreso Internacional del Agua. Ourense, 23-24 de septiembre de 2015.
5. EF Burguera, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. El sulfuro de hidrógeno inhibe los procesos de catabolismo inducidos por interleukina 1 β en el cartílago hialino humano. IV Congreso Iberoamericano de Peloides. Lleida, 01-03 de julio de 2015.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Relacionadas con la tesis

1. Potencial de diferenciación del plasma rico en plaquetas estandarizado en células estromales mesenquimales artrósicas. L Gato-Calvo, EF Burguera, FJ Blanco. Jornada BioIntegraSaúde 2018. Vigo, 29 de mayo de 2018. Póster.
2. Propiedades condrogénicas y anti-inflamatorias de una formulación estandarizada de plasma rico en plaquetas. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, C Ruiz-

Romero, FJ Blanco, EF Burguera. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. A Coruña, 22-25 de mayo de 2018. Póster.

3. Chondrogenic potential of standardised platelet rich plasma on osteoarthritic mesenchymal stromal cells. L Gato-Calvo, T Hermida-Gómez, J Magalhaes, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. OARSI 2018 World Congress on Osteoarthritis. Liverpool, Reino Unido, 26-29 de abril de 2018. Póster.

4. Anti-inflammatory effects of standardized platelet-rich plasma releasates in knee and hip OA chondrocytes. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting. San Diego, California, 03-08 de noviembre de 2017. Póster.

5. Standardization of platelet-rich plasma as a therapeutic agent in osteoarthritis. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. I Jornada Científica IBEROS. Oporto, Portugal, 05 de julio de 2017. Póster.

6. Efectos proliferativos y anti-inflamatorios del plasma enriquecido en plaquetas en condrocitos humanos OA de cadera y de rodilla. L Gato-Calvo, EF Burguera, FJ Blanco. Jornada BioIntegraSaúde 2017. A Coruña, 30 de mayo de 2017. Póster.

7. Efectos proliferativos y anti-inflamatorios del plasma rico en plaquetas en condrocitos OA. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. XLIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Bilbao, 23-26 de mayo de 2017. Póster.

8. Proliferative and anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on osteoarthritic chondrocytes. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, C Ruiz-Romero, FJ Blanco, EF Burguera. OARSI 2017 World Congress on Osteoarthritis. Las Vegas, Estados Unidos, 27-30 de abril de 2017. Póster.

9. Proliferative and anti-inflammatory effect of PRP on OA chondrocytes and synoviocytes. L Gato-Calvo, FJ Blanco, EF Burguera. 1ª Jornadas de Estudiantes en Ingeniería Biomédica JEIB 2016. Barcelona, 06-08 de julio de 2016. Póster. Special Mention Poster Award.

10. Proliferative and anti-inflammatory effect of PRP on OA chondrocytes and synoviocytes. L Gato-Calvo, FJ Blanco, EF Burguera. Jornada BioIntegraSaúde 2016. Santiago de Compostela, 12 de mayo de 2016. Póster.

11. In vitro chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells embedded in fibrin gels. L Gato-Calvo, A Vela-Anero, E Lourés-Fraga, JL Núñez-Amboage, C Ruiz-Romero,

FJ Blanco, EF Burguera. OARSI 2016 World Congress on Osteoarthritis. Ámsterdam, Holanda, 31 de marzo-3 de abril de 2016. Póster.

12. Geles de fibrina y células madre mesenquimales para regeneración de cartílago. L Gato-Calvo, E Lourés-Fraga, JL Núñez-Amboage, FJ Blanco, C Ruiz-Romero, EF Burguera. 9th Annual Conference of CIBER-BBN. Valencia, 30 de noviembre-1 de diciembre de 2015. Póster.

13. Determinación de la densidad celular óptima en biomateriales de fibrina para su diferenciación condrogénica. L Gato-Calvo, EF Burguera, E Lourés-Fraga, JL Núñez-Amboage, FJ Blanco. Jornada BioIntegraSaúde 2015. Vigo, 16 de junio de 2015. Póster.

14. In vitro chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in fibrin scaffolds. EF Burguera, L Gato-Calvo, A Vela-Anero, G Orive, FJ Blanco. 8th CIBER Annual Conference. Girona, 10-11 de noviembre de 2014. Póster.

Relacionadas con otras líneas del grupo de investigación

1. Osteoarthritis severity is reduced by intra-articular administration of hydrogen sulfide. EF Burguera, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco. EULAR 2018 Annual European Congress of Rheumatology. Ámsterdam, Holanda, 13-16 de junio de 2018. Póster.

2. La administración intra-articular de sulfuro de hidrógeno mejora la severidad de un modelo experimental de artrosis. EF Burguera, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, C Vaamonde-García, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco. Jornada BioIntegraSaúde 2018. Vigo, 29 de mayo de 2018. Póster.

3. La administración intra-articular de sulfuro de hidrógeno mejora la severidad de un modelo experimental de artrosis. EF Burguera, A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco. XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. A Coruña, 22-25 de mayo de 2018. Póster.

4. Intra-articular administration of hydrogen sulphide ameliorates severity of experimental osteoarthritis. A Vela-Anero, T Hermida-Gómez, P Filgueira-Fernández, L Gato-Calvo, EF Burguera, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco. OARSI 2018 World Congress on Osteoarthritis. Liverpool, Reino Unido, 26-29 de abril de 2018. Póster.

5. Efectos anti-inflamatorios de aguas mineromedicinales sulfuradas en condrocitos articulares. N Gómez-Prieto, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, R Mejjide-Faílde, FJ Blanco,

EF Burguera. Jornada BioIntegraSaúde 2016. Santiago de Compostela, 12 de mayo de 2016. Póster.

6. Anti-oxidant effects of sulfurous spring water on osteoarthritic chondrocytes. N Gómez-Prieto, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. OARSI 2016 World Congress on Osteoarthritis. Ámsterdam, Holanda, 31 de marzo-03 de abril de 2016. Póster.

7. Reduced hydrogen sulfide synthesis in the joint, a new player in the pathogenesis of osteoarthritis. A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. 2015 ACR/ARHP Annual Meeting. San Francisco, Estados Unidos, 06-11 de noviembre de 2015. Póster.

8. Efectos de las aguas mineromedicinales sulfuradas en condrocitos articulares in vitro. N Gómez-Prieto, EF Burguera, A Vela-Anero, L Gato-Calvo, FJ Blanco, R Meijide-Faílde. I Congreso Internacional del Agua. Ourense, 23-24 de septiembre de 2015. Póster.

9. Evaluation of biometals modified by UV nanosecond Nd:YVO4 laser. Effects on cell viability. EF Burguera, MP Fiorucci, L Gato-Calvo, J Magalhaes, AJ López, S Pozo-Antonio, FJ Blanco, A Ramil. 27th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB). Krakovia, Polonia, 30 de agosto-03 de septiembre de 2015. Póster.

10. La producción endógena de sulfuro de hidrógeno está reducida en el cartílago OA. Posible contribución en la patogenia de la artrosis. A Vela-Anero, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Jornada BioIntegraSaúde 2015. Vigo, 16 de junio de 2015. Póster.

11. Efectos de las aguas mineromedicinales sulfuradas en condrocitos articulares in vitro. N Gómez Prieto, L Gato-Calvo, C Ruiz-Romero, R Meijide-Faílde, FJ Blanco, EF Burguera. Jornada BioIntegraSaúde 2015. Vigo, 16 de junio de 2015. Póster.

12. Hydrogen sulfide donors reduce IL1B induced catabolism in human articular cartilage. A Vela-Anero, EF Burguera, L Gato-Calvo, R Meijide-Faílde, FJ Blanco. OARSI 2015 World Congress on Osteoarthritis. Seattle, Estados Unidos, 30 de abril-03 de mayo de 2015. Póster.