

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Tesis doctoral

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Investigación biomédica

EFICACIA DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS:

INFLUENCIA DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y EDAD DEL DONANTE

Ane Miren Bilbao Sánchez

Director: Luis Casis Sáenz

Codirector: Jon Torres Unda

(c)2023 ANE MIREN BILBAO SANCHEZ

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	9
RESUMEN.....	11
LISTA DE TABLAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS.....	17
SECCIÓN I	
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1 . Homeostasis y senescencia.....	25
1.1.1 La sangre y el mantenimiento de la homeostasis	
1.1.2 El envejecimiento celular y ambiente proinflamatorio senescente	
1.1.3 Terapia basada en hemoderivados para restablecer la homeostasis	
1.2 . La artrosis y nuevos enfoques terapéuticos.....	30
1.2.1 La articulación como un órgano complejo	
1.2.2 Fisiopatología de la artrosis: desequilibrio de la homeostasis articular	
1.2.3 Las terapias biológicas como herramientas terapéuticas en la artrosis	
1.3 . Plasma Rico en Plaquetas.....	38
1.3.1 Definición, composición y factores condicionantes	
1.3.2 Justificación del uso del PRP intraóseo en la artrosis	
1.3.3 Necesidad de clasificación de los PRP	
1.3.4 Características del PRGF®-Endoret®	
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
3.1. Estudio 1.....	53
3.1.1. Animales	
3.1.2. Preparación del PRP	
3.1.3. Administración del tratamiento	
3.1.4. Análisis micro-CT	
3.1.5. Análisis histológico	
3.1.6. Análisis estadístico	

3.2. Estudio 2	57
3.2.1. Preparación y caracterización del PRP	
3.2.2. Ensayos in vivo	
3.2.2.1. Cultivo y diferenciación neuronal de Células NT2	
3.2.2.2. Tratamiento con PRP, obtención de imágenes y análisis de la incorporación de BrdU en células progenitoras NT2	
3.2.2.3. Tratamiento con PRP, obtención de imágenes y análisis de células NT2 diferenciadas con AraC	
3.2.2.4. Cultivos primarios neuronales	
3.2.2.5. Ensayo de toxicidad	
3.2.2.6. Western Blot para marcadores sinápticos in vitro	
3.2.2.7. Inmunofluorescencia para marcadores sinápticos in vitro	
3.2.2.8. Intensidad de marcador sináptico y análisis de puntos	
3.2.2.9. Ensayo de activación de microglía y cultivo de microglía	
3.2.3. Análisis estadístico	
3.3. Estudio 3	62
3.3.1. Pacientes	
3.3.2. Preparación del PRP	
3.3.3. Tratamientos	
3.3.4. Evaluación de resultados	
3.3.5. Análisis estadístico	
4. RESULTADOS	67
4.1. Estudio 1	69
4.1.1. Caracterización del PRP	
4.1.2. Análisis histológico	
4.1.3. Análisis micro-CT	
4.2. Estudio 2	74
4.2.1. Caracterización del PRP: medición de factores de crecimiento y citoquinas	
4.2.2. Efecto del PRP en la incorporación de BrdU en progenitores NT2	
4.2.3. Efecto del PRP sobre la supervivencia celular y la morfología de las células NT2 AraC-diferenciadas	
4.2.4. Efecto del PRP sobre la toxicidad y la cuantificación de marcadores pre y postsinápticos	
4.2.5. Efecto del PRP sobre la inflamación de la microglía	
4.3. Estudio 3	80
4.3.1. Grupo IA	
4.3.2. Grupo IO	
4.3.3. Grupo IA vs Grupo IO	

5. DISCUSIÓN.....	85
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

SECCIÓN II

7. CONCLUSIONES.....	123
----------------------	-----

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y apoyo humano han colaborado en la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al director de esta tesis, el Dr. Luis Casis, por la dedicación y apoyo en el desarrollo de este trabajo, por su paciencia y perseverancia. Así mismo quiero agradecer al Dr. Jon Torres, codirector de esta tesis, su gran ayuda en los difíciles últimos pasos de su elaboración.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Mikel Sánchez, por transmitirnos todos sus conocimientos con pasión y abundante generosidad, por su inquietud, por abrirnos camino en el mundo de las terapias biológicas y la medicina regenerativa.

Quiero agradecer el esfuerzo realizado por todas las personas que han colaborado en los trabajos publicados en esta tesis, especialmente los miembros del equipo de investigación y desarrollo de UCA.

Una mención especial a Sabino Padilla y Diego Delgado, por su ayuda, su dedicación y su gran generosidad.

Agradecer también la colaboración de todo el equipo de UCA.

Un agradecimiento especial a los pacientes que participan en los proyectos de investigación, imprescindibles para el desarrollo de nuevas terapias.

Quiero dar las gracias a mis padres, a quienes tanto debo. Desde vuestro cariño y apoyo incondicional, me habéis animado siempre a perseguir mis sueños y nunca abandonarlos frente a las adversidades. Gracias a vuestra ayuda he podido culminar esta tesis.

Gracias a mi familia, por estar siempre cerca, apoyándome, especialmente en los momentos más difíciles.

Por último, quiero dar las gracias a mi esposo e hijos. Nico, gracias por tu apoyo incondicional y por darme siempre la confianza que necesito. Leire, Iñigo y María, gracias por vuestra paciencia y por el tiempo que me habéis concedido para realizar este trabajo.

RESUMEN

La artrosis de rodilla es una patología de muy alta prevalencia en el adulto y en las personas de edad avanzada, y que seguirá aumentando en los siguientes años debido al estilo de vida actual. Esto hace imperiosa la búsqueda de nuevos tratamientos para esta patología, ya que los tratamientos conservadores actuales sólo consiguen un alivio sintomático limitado, siendo la artroplastia de rodilla la única solución definitiva. Esto supone una serie de riesgos e inconvenientes para el paciente, así como un reto socioeconómico para los sistemas sanitarios.

En las últimas décadas, una terapia emergente como es Plasma Rico en Plaquetas (PRP) está ganando relevancia en el área de la regeneración y reparación tisular, con unos resultados clínicos prometedores en el tratamiento de la artrosis. El PRP emplea la sangre del propio paciente con el fin de obtener una suspensión de plasma con una concentración de plaquetas similar o mayor a los niveles en sangre periférica. Tanto las biomoléculas presentes en el plasma como las liberadas por las plaquetas participan en procesos que favorecen un ambiente biológico propicio para el mantenimiento de la homeostasis y la reparación tisular. La composición celular y plasmática está determinada por el método empleado para la obtención del mismo. Variables como el número de plaquetas, la presencia de leucocitos y el tipo de activación, entre otros, condicionan el PRP y su consecuente resultado. Así mismo, actuar sobre factores relacionados con la edad del donante y con la vía de administración pueden mejorar los efectos biológicos y los resultados clínicos obtenidos con el PRP.

En el presente trabajo se evalúa un nuevo enfoque del tratamiento de la gonartrosis con el PRP, administrando dicho tratamiento por vía intraósea. En la artrosis de rodilla de grado avanzado, la vía de administración de PRP es un elemento clave, debido a que la vía intraarticular de administración es insuficiente para abordar el hueso subcondral, tejido cuyo papel en la fisiopatología y el progreso de la artrosis, especialmente en las etapas tardías, es cada vez más reconocido y se ha postulado como una diana terapéutica clave.

Así, en un primer trabajo *in vivo* se evaluó, el efecto biológico y estructural que generaban estas infiltraciones intraóseas en tejido óseo. Además, también se analizó si la edad del donante a partir del cual se obtiene el PRP influye en dichos efectos. Tras realizar las infiltraciones intraóseas, utilizando dos tipos diferentes de PRP en función

de la edad de los donantes, se observaron mejores resultados biológicos y estructurales que los grupos control (sin tratamiento y salino), siendo estos más pronunciados en el grupo que recibió PRP de donantes jóvenes. Esto podría estar justificado por las diferencias halladas a nivel molecular, ya que la composición celular era similar. El PRP de donantes de edad avanzada tenía un perfil más proinflamatorio, mostrando niveles más altos de algunas citoquinas, como CCL21 y CXCL5.

En un segundo trabajo, se profundizó en los posibles efectos celulares que provocaban ambos tipos de PRP y que podrían justificar los diferentes efectos biológicos y estructurales. Consecuentemente, se evaluó la influencia de la edad del donante en los modelos celulares neurales, en los cuales se observó, entre otros, un efecto antiinflamatorio mayor tras la aplicación de PRP de donantes jóvenes, el cual también presentaba un perfil menos proinflamatorio que el de donantes de edad avanzada.

Así mismo, se evaluó la influencia de la vía de administración del PRP en el tratamiento de la artrosis grave de rodilla, teniendo en cuenta los aspectos clínicos. Para ello se comparó la evolución al año de dos grupos de pacientes con artrosis severa. Uno de los grupos recibió el tratamiento aplicado con inyecciones intraarticulares mientras que el otro grupo recibió una combinación de infiltraciones intraarticulares e intraóseas. Los resultados del estudio mostraron que los pacientes tratados con las infiltraciones intraarticulares no mejoraron significativamente. Sin embargo, las infiltraciones combinadas intraarticulares e intraóseas de PRP mostraron una reducción del dolor y una mejoría en la funcionalidad articular clínicamente significativas a los 6 y 12 meses.

Los resultados obtenidos en estos trabajos demuestran que el tratamiento con PRP intraóseo en la artrosis de rodilla es una herramienta terapéutica eficaz y segura, pero que dicha eficacia está condicionada por diversos factores. Concretamente, y según los datos obtenidos, la vía de administración es un elemento clave a la hora de tratar la artrosis de rodilla de grado avanzado. Además, dicha eficacia también puede verse afectada por la composición molecular del PRP la cual está condicionada, entre otros posibles factores, por la edad del donante a partir del cual se obtiene el PRP. Estos trabajos podrían abrir nuevas líneas de investigación en las que profundizar en estos u otros condicionantes para poder optimizar esta terapia y obtener los mejores resultados clínicos posibles.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Medidas micro-CT (Artículo 1).
- Tabla 2.** Características de ambos PRP (Artículo 2).
- Tabla 3.** Concentración de factores de crecimiento y citoquinas en ambos PRP (Artículo 2).
- Tabla 4** Valores de citoquinas (Artículo 2).
- Tabla 5.** Evolución de los pacientes del grupo intraarticular (Artículo 3).
- Tabla 6.** Evolución de los pacientes del grupo intraóseo (Artículo 3).
- Tabla 7.** Comparación de los pacientes con mejoría mínima clínicamente importante (MMCI) y diferencia de la mejoría en relación al inicio (Artículo 3).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Osteoartrosis: fisiopatología basada en la distribución anormal de cargas mecánicas y bucle catabólico en la membrana sinovial, líquido sinovial, cartílago articular y hueso subcondral.
- Figura 2.** Intervención molecular del PRP en el bucle catabólico a nivel de la membrana sinovial y líquido sinovial en la osteoartrosis.
- Figura 3.** Comunicación entre el hueso subcondral y cartílago articular.
- Figura 4.** Imágenes de técnica de infiltración de PRP intraóseo
- Figura 5.** Restablecimiento de la homeostasis mediante infiltraciones intraarticulares de PRP.
- Figura 6.** Imágenes de coágulo de fibrina.
- Figura 7.** Representación esquemática de ambos grupos de tratamiento (Artículo 3).
- Figura 8.** Análisis molecular del PRP de donantes jóvenes y de edad avanzada (Artículo 1).
- Figura 9.** Análisis histológico de la médula ósea del fémur (Artículo 1).
- Figura 10.** Análisis histológico del vasto lateral (Artículo 1).
- Figura 11.** Imágenes 3D de la metáfisis femoral (Artículo 1).
- Figura 12.** Análisis molecular de ambos PRP (Artículo 2).

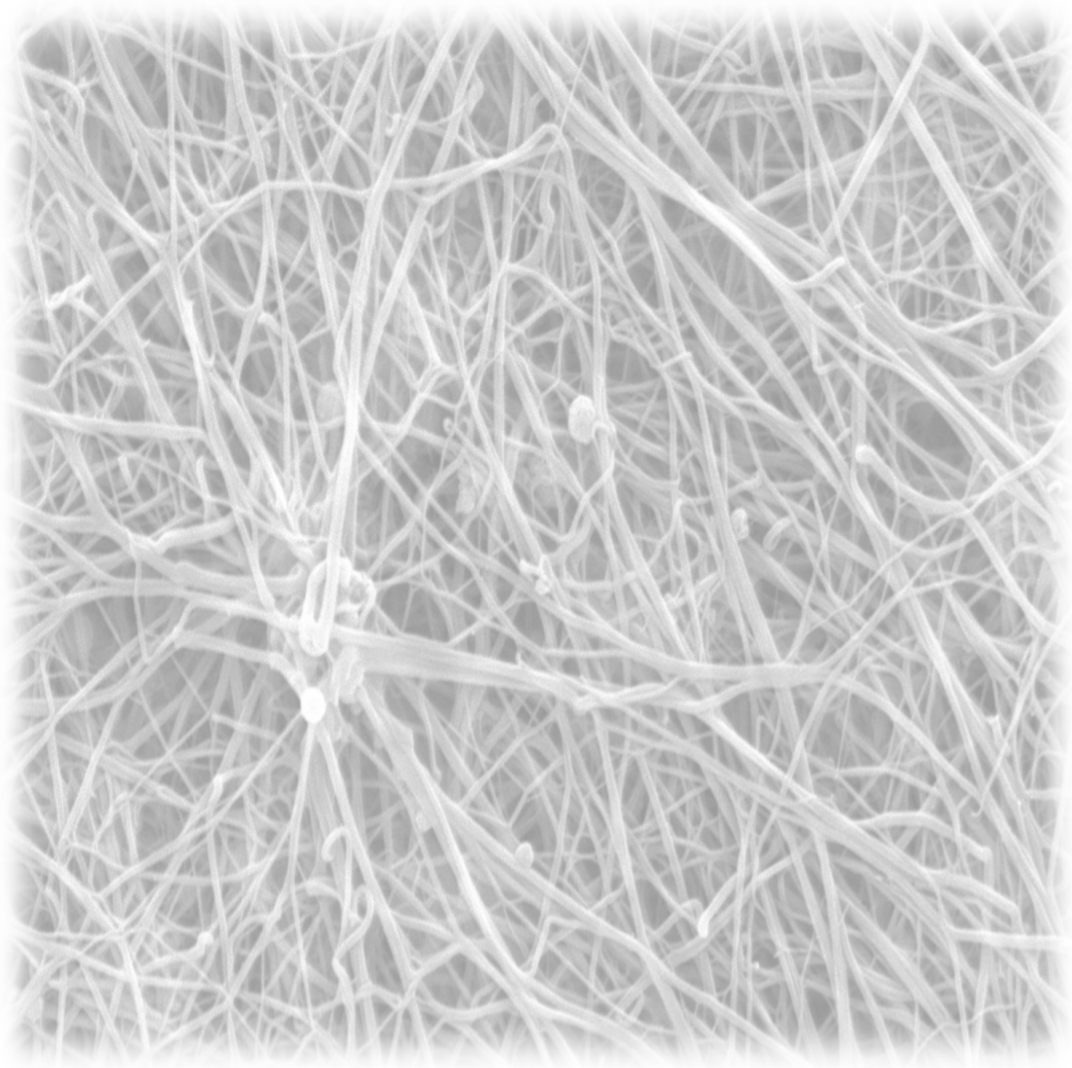
LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no-esteroides
AraC	Análogo del nucleósido pirimidina β -D-arabinofuranoside
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARNm	ARN mensajero
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
CaCl₂	Cloruro cálcico
CB	Receptor cannabinoide
CCL21	Ligando 21 de quimiocina CC
CMM	Células madre mesenquimales
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
EGF	Epidermal growth factor
ESSKA	European Society for Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy
FBS	Suero fetal bovino
FC	Factores de crecimiento
FGF	Fibroblast growth factor
FXII	Factor XII
GDF-11	Growth differentiation factor 11
HGF	Hepatocyte growth factor
IA	Intraarticular
IFN-γ	Interferon γ
IGF	Insulin-like growth factor
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IO	Intraóseo
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score
LPS	Lipopolisacárido
LS	Líquido sinovial
MEC	Matriz extracelular
MMCI	Mejoría mínima clínicamente importante
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MNR	Receptor de manosa
MO	Médula ósea
NCAM	Molécula de adhesión celular neural
NF-κB	Nuclear factor κ B
NGF	Nerve growth factor
ORBIT	ORthoBiologics InitiaTive
OP	Osteoporosis
PDGF	Platelet-derived growth factor
PF4	Factor plaquetario 4
PGE2	Prostaglandina E2
PMPs	Platelet-derived microparticles
PRP	Plasma rico en plaquetas
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
RL	Radicales libres
ROI	Región de interés
ROS	Reactive oxygen species
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SNC	Sistema nervioso central
TLR	Toll-like receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TNF-α	Tumor necrosis factor α

VAS	Visual analog scale
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index

SECCIÓN I



1. INTRODUCCIÓN

1.1. HOMEOSTASIS Y SENESCENCIA

1.1.1. La sangre y el mantenimiento de la homeostasis

La sangre es un tejido conectivo multifuncional en estado líquido en constante renovación, compuesto de células suspendidas en una fase líquida llamada plasma, que opera como colector, coordinador y comunicador entre los diferentes tejidos del organismo debido, entre otros elementos, a sus múltiples proteínas plasmáticas de señalización.¹⁻³ Entre las células más importantes encontramos a los eritrocitos o glóbulos rojos, los leucocitos o glóbulos blancos y, finalmente, las plaquetas. Éstas últimas son fragmentos celulares circulantes que masivamente ocupan la región externa vascular cercana al endotelio, facilitando así las funciones de defensa y coagulación (fenómeno conocido como marginalización).^{2,4} Diluidos en la solución acuosa que es el plasma, existen factores de crecimiento (FC), citoquinas, vehículos extracelulares (exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos),⁵ ARN mensajero (ARNm) y otras biomoléculas. La mayoría de ellas son de naturaleza proteica, con efectos pleiotrópicos de regulación clave en procesos biológicos que incluyen la señalización celular, el transporte de nutrientes y desechos, el crecimiento, el envejecimiento, la reparación y remodelación tisular y la defensa contra las infecciones.⁶⁻⁹ El contenido proteico del plasma, es el resultado de un flujo dinámico de síntesis y secreción celular (hígado, músculo, tejido adiposo, hueso, cerebro, intestino y piel predominantemente), responsable de generar y mantener un ambiente sistémico homeostático y de nicho celular considerado saludable.¹⁰⁻¹³ Estas proteínas (en su conjunto denominado proteoma plasmático), así como en determinados casos su ausencia (como ocurre en el envejecimiento), se ofrecen como una ventana desde donde explorar lo que en nuestros órganos, tejidos y células ocurre. Por lo tanto, las proteínas plasmáticas pueden utilizarse como biomarcadores de salud y enfermedad.¹⁴⁻¹⁶ Así mismo, existe una creciente evidencia a favor de que varias de estas proteínas plasmáticas actúan como efectores de multitud de fenotipos celulares de nuestro organismo.¹⁴⁻¹⁶ Destacar que a nivel celular son los nichos celulares

principalmente de células madre hematopoyéticas de la medula ósea (MO) las que mantienen la homeostasis e inmunidad del huésped. No obstante, otros nichos celulares como el muscular, tejido graso, pulmonar y el cutáneo ejercen también funciones sistémicas.^{12,17,18} Sin embargo, se ha demostrado que estímulos como el estrés, las lesiones tisulares, el sedentarismo y el envejecimiento promueven en general un fenotipo celular conocido como células senescentes o senescence-associated secretory phenotype (SASP), que secretan a la circulación sistémica proteínas inflamatorias a la vez que presentan un déficit en ciertas proteínas ligadas a disregulaciones y/o perturbaciones genéticas y epigenéticas.^{12,13,18-20}

1.1.2. El envejecimiento celular y ambiente proinflamatorio senescente

Las SASP son células con una naturaleza dual:¹⁸ han perdido la capacidad de dividirse, actuando, junto a su secretoma, como una barrera molecular a la tumorigénesis; sin embargo, conllevan una expresión genética cuyas proteínas ejercen un efecto inflamatorio de baja intensidad y están asociadas a las enfermedades relacionadas con el envejecimiento.^{21,22} Éste es el caso de la artrosis, la osteoporosis (OP), la sarcopenia, la aterosclerosis o las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, entre otras. Todas ellas presentan un vínculo etiopatogénico con las células SASP.²²⁻²⁷

El envejecimiento celular parece estar causado por varios factores como son el daño del ADN, los radicales libre (RL), el acortamiento de los telómeros y las células senescentes (SASP), que han sido estudiadas en profundidad recientemente.^{19,28-30} La pérdida de integridad fisiológica de las células senescentes se ve reflejada en diferentes aspectos biológicos que enumeramos a continuación.

El primero es el daño del ADN acumulado en cada célula con el paso del tiempo.^{31,32} Las fuentes de daño en el ADN varían desde sustancia químicas tóxicas endógenas y especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) hasta la luz ultravioleta exógena. Este factor se ha explorado para describir el envejecimiento de las células madre mesenquimales (CMM) in vitro,

particularmente en relación con la acumulación de inestabilidad cromosómica después de un cultivo prolongado.³³

El segundo factor es la génesis de especies reactivas de oxígeno (ROS), un proceso continuo de generación de radicales libres (RL) en el metabolismo que provoca daños en los tejidos debido a la presencia de electrones libres y desapareados en la capa más externa del átomo de oxígeno.³⁴ Los antioxidantes en el cuerpo combaten los efectos negativos de los ROS. Sin embargo, cuando se pierde el equilibrio entre la producción de antioxidantes y ROS, se desarrolla el estrés oxidativo.³⁵ Esto puede conducir a la oxidación de los ácidos nucleicos, dañando severamente el ADN y dando lugar a mutagénesis y modificación de la transcripción de genes específicos. En términos de envejecimiento de las CMM, esta teoría se ha aplicado principalmente para describir la disminución de la adhesión de las CMM³⁶ y su tendencia hacia la diferenciación adipogénica.³⁷

El tercer aspecto es el acortamiento de los telómeros que ocurre con cada división celular. Así, la longitud de los telómeros en las células maduras sigue reduciéndose debido al desgaste y la falta de actividad de la telomerasa, una enzima responsable del alargamiento de los telómeros. En las CMM de la médula ósea, el desgaste de los telómeros también puede ocurrir, conduciendo a la senescencia celular,³⁸ aunque su mecanismo exacto sigue sin estar claro, ya que en las CMM la actividad de la telomerasa está presente, pero es baja. En términos de envejecimiento de las CMM, esta teoría ha sido ampliamente probada utilizando CMM pasadas en serie, donde se confirmó una pérdida promedio de 17 pares de base de telómero con cada duplicación de la población.^{38,39}

Otro aspecto explorado intensamente es el envejecimiento de las células madre que postula una disminución en el número y las funcionalidades de las células madre como un efecto potencial del envejecimiento.^{20,40,41} Schultz y Sinclair han argumentado que las causas probables del envejecimiento celular (es decir, el daño del ADN, el desgaste de los telómeros y la senescencia celular antes mencionados) también se pueden aplicar a las células madre.³² Fukada y cols. han conectado las causas anteriormente mencionadas del envejecimiento

celular con la teoría del envejecimiento de las células madre para explicar la compleja progresión del envejecimiento.³⁵

Finalmente, mencionar los mecanismos epigenéticos⁴⁰ y la disminución de la homeostasis proteica,²⁰ que también han cobrado importancia en el pasado reciente. Si bien todos estos factores los hemos enumerado por separado, la relación entre ellos es muy estrecha. Así pues, el daño mitocondrial a menudo conduce a la producción de ROS que interactúan con moléculas del organismo afectándolas negativamente.⁴⁰ La acumulación de los subproductos oxidativos de las interacciones de ROS, con el tiempo, causa daño en el ADN e inestabilidad genómica que resulta en senescencia celular. Esto perturba la capacidad de autorrenovación de las células madre en su microambiente, lo que se sabe que interrumpe el funcionamiento normal de las CMM y de otros tipos celulares.^{35,42}

1.1.3. Terapia basada en hemoderivados para restablecer la hemostasis

Todo lo anteriormente mencionado, basado en múltiples trabajos experimentales,^{28,43-45} ha conducido a proponer que el restablecimiento, al menos parcialmente, de la homeostasis de las proteínas plasmáticas a nivel sistémico o a nivel de nicho celular pudiera ser un abordaje terapéutico atractivo para tratar enfermedades principalmente asociadas al envejecimiento, incluidas la artrosis o las enfermedades consideradas neurodegenerativas.^{1,10,20,43} En este sentido, varias líneas de evidencia derivadas de las terapias a nivel sistémico o local con células madre como dianas (experimentos parabióticos, microfracturas, infiltraciones intraóseas y las escarificaciones tendinosas) indican que, proteínas vehiculizadas en el plasma de organismos jóvenes, modulan la capacidad regenerativa y reparadora de múltiples tejidos haciendo que la sangre haya estado siempre presente en la ecuación de las terapias reparadoras.^{24,43,46-48} Éste es, por ejemplo, el caso de las proteínas plasmáticas multimodulares pertenecientes al sistema de coagulación y fibrinólisis como son la trombina, la fibrina, la plasmina o el factor XII (FXII), así como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Insulin-like Growth Factor, IGF-1) y el factor de crecimiento de

hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor, HGF), entre otras muchas proteínas solubles de señalización del plasma.⁴⁹

En los mamíferos, las proteínas plasmáticas mencionadas contribuyen a la reparación tisular, proceso multicelular mediado principalmente por señales moleculares derivadas de los mecanismos complementarios subyacentes al sistema de defensa biológico, que incluye a la hemostasia y la coagulación, el sistema inmune innato, el sistema nervioso sensorial y la fibrogénesis.^{49,50} Estas señales operan en forma de cascadas incluidas en el sistema inmune innato intravascular y contenidas en el plasma.⁴⁹

Sin embargo, estas terapias se enfrentan a ciertos obstáculos, ya que, en algunas patologías, como es el caso de la artrosis o las enfermedades neurodegenerativas, los pacientes a los que va dirigida la terapia son organismos envejecidos, con un proteoma plasmático alterado y proinflamatorio y una homeostasis desregulada a nivel sistémico y a nivel de nicho celular por las células SASP, entre otros fenotipos celulares.^{14,15,21,22,51} Y, por consiguiente, el producto biológico derivado del plasma de estos pacientes es deficitario en algunas proteínas a la vez que presenta en exceso algunas de las proteínas proinflamatorias que simultáneamente contribuyen a la patología que se pretende tratar (osteoartrosis, osteoporosis, Alzheimer...),^{11,14,15,52,53}

En esta dirección, y debido a que la fuente terapéutica es la sangre del propio paciente, la edad del donante ejerce una influencia determinante en la composición proteica y celular de la sangre y, consecuentemente, de los productos hemoderivados.^{11,14,15,52,53} En experimentos parabióticos, en los cuales animales unidos quirúrgicamente comparten sistema circulatorio, se observaba como los animales de edad avanzada presentaban mejoras biológicas cuando la sangre intercambiada provenía de animales jóvenes.^{11,14,15,52,53}

Por la tanto, es razonable pensar que las terapias alogénicas pueden funcionar eficientemente cuando provienen de donantes jóvenes.^{6,13}

1.2. LA ARTROSIS Y NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS

1.2.1. La articulación como un órgano complejo

A medida que se ha ido profundizando en el conocimiento de la fisiopatología de la artrosis, el concepto de esta enfermedad ha ido evolucionando, pasando de ser vista como una enfermedad limitada al cartílago a una enfermedad multifactorial que afecta a todas las estructuras que componen la articulación.⁵⁴ Debemos introducir aquí el concepto de articulación sinovial como órgano, compuesto por múltiples tejidos, con diferentes características biomecánicas que le confieren a cada uno de ellos propiedades específicas. Juntos harán de la articulación sinovial un órgano con grandes capacidades adaptativas a los diferentes estímulos mecánicos y biológicos a los que ésta se ve sometida⁵⁵. Existen elementos extraarticulares (músculos, ligamentos, meniscos...) que confieren estabilidad mecánica y contribuyen a la absorción de cargas de forma fundamental.⁵⁶⁻⁵⁹ No obstante, son los elementos intraarticulares los que mantienen la homeostasis articular: la membrana sinovial, el cartílago articular y el hueso subcondral.

La membrana sinovial es un tejido con gran vascularización e inervación. Su tipo celular principal lo constituyen los sinoviocitos (tipo A, macrofágicos, y tipo B, fibroblásticos), aunque también contiene células inmunes y CMM.⁶⁰ La membrana sinovial constituye una barrera inmune de defensa articular y es productora de líquido sinovial (LS), que actúa como lubricante articular (gracias a su alto contenido en ácido hialurónico y lubricina) y transporta nutrientes, biomoléculas y señales celulares. De esta forma juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis articular.⁶¹

El cartílago articular hialino es un tejido avascular formado por condrocitos dispuestos de forma ordenada dentro de una matriz de colágeno tipo 2. Los condrocitos se estratifican en capas desde el hueso subcondral, donde existe mayor densidad celular, hasta la superficie articular.⁶² Éste tejido presenta un bajo coeficiente de fricción y suporta eficazmente la compresión y el cizallamiento.

El tercer elemento articular de importancia es el hueso subcondral. Está situado debajo de la línea de cartílago calcificado, formando la unidad osteocondral. Su estructura consiste en una placa de hueso cortical de donde emerge la médula ósea y el hueso trabecular.⁶³ La estructura del hueso subcondral, junto con otros tejidos periarticulares como el músculo y el tendón, aligera la carga que soporta el cartílago articular, absorbiendo entre el 30% y el 50% de la energía recibida en la articulación.⁶⁴ A pesar de que el cartílago calcificado y la placa cortical no son porosos, existe una comunicación entre el cartílago y el hueso subcondral. Esta comunicación hueso-cartílago ha sido evidenciada por estudios que muestran cómo los vasos y canales llegan al cartílago desde el hueso subcondral, y que son más abundantes en el cartílago de pacientes con artrosis⁶⁵. Los canales y vasos permiten el tránsito de moléculas involucradas en la homeostasis de la articulación como factores de crecimiento o proteínas morfogenéticas óseas. Los vasos provenientes del hueso subcondral proveen al cartílago de una importante fuente nutritiva.^{66,67} Así mismo, el hueso subcondral es una fuente de CMM y contribuye a la absorción de las cargas articulares.⁶⁸

Por lo tanto, la adecuada comunicación y sinergia entre estos tejidos implica la función óptima de la articulación y el mantenimiento de la homeostasis del cartílago. Los mecanismos de adaptación de la articulación serán los responsables de convertir los estímulos de carga y fuerzas mecánicas en estímulos moleculares y celulares en el rango fisiológico. Estos estímulos activan la expresión génica en los condrocitos, poniendo en marcha la síntesis de proteínas responsables de mantener la integridad y la renovación del cartílago articular.⁶⁹ Cualquier alteración mecánica y/o biológica que rompa éste equilibrio adaptativo provocará la degeneración articular. Cuando la homeostasis se altera por cambios bioquímicos o biomecánicos, todos los tejidos de la articulación participan en el restablecimiento del equilibrio biológico. Estos esfuerzos por recuperar la homeostasis se traducen en respuestas a nivel celular y de la matriz extracelular (MEC) en todos los tejidos.

1.2.2. Fisiopatología de la artrosis: desequilibrio de la homeostasis articular

Los estímulos mecánicos suprafisiológicos o infra fisiológicos (como el sedentarismo) provocarán una alteración en los mecanismos de renovación tisular⁷⁰; igualmente, otras patologías y trastornos biológicos como los procesos inflamatorios podrán provocar el fallo de los mecanismos adaptativos celulares y llevar a la degeneración articular. Estudios recientes ponen de manifiesto la presencia de un proceso inflamatorio crónico de bajo grado en la patogenia de la artrosis, que provoca la ineficiencia en los mecanismos de reparación de los tejidos articulares⁷¹⁻⁷³. Así pues, la artrosis no es un problema únicamente mecánico; debemos reconocer y entender los mecanismos celulares implicados para poder realizar terapias más eficaces.⁷⁴

Los múltiples tejidos implicados y la naturaleza multifactorial de la artrosis hacen que sea difícil conocer con exactitud la secuencia de pasos y el momento y localización en que estos ocurren durante el desarrollo de la artrosis. Lo que queda claro es que estas alteraciones ocurren principalmente en la membrana sinovial, el cartílago articular y el hueso subcondral, siendo este último de una importancia vital en el proceso.^{75,76} La consecuencia de la alteración de la homeostasis articular es la degeneración de la matriz extracelular, con la consiguiente generación de productos de degradación de la misma, que serán liberados al líquido articular.⁷⁷ De esta forma se generarán patrones moleculares asociados al daño tisular (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs), capaces de unirse a receptores de membrana tipo Toll (Toll-Like Receptor, TLR), en los diferentes tipos celulares articulares.⁷⁸ Esto provocará la activación de la vía de señalización intranuclear factor nuclear κ B (Nuclear Factor κ B, NF- κ B)^{77,79} que promueve un ambiente proinflamatorio mediante la expresión de genes inflamatorios. La expresión génica de las células afectadas cambia a un patrón inflamatorio que sintetiza moléculas, entre otras, las citoquinas como las interleucinas 1 β , 6 y 10 (IL-1 β , IL-6, IL10), factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ), prostaglandina E2 (PEG2), factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor, NGF) y otras biomoléculas proinflamatorias.⁸⁰ Todas estas moléculas serán responsables de

generar un ambiente global proinflamatorio e interferirán con los mecanismos de reparación tisular. En este microambiente proinflamatorio, los diferentes tipos celulares se polarizarán hacia sus fenotipos inflamatorios y generarán cambios tisulares de carácter degenerativo^{75,76,81}. A nivel de hueso subcondral los cambios desembocarán en una lesión del cartílago suprayacente.

Ya en 1827, el Dr. Physick, establecía la importancia del hueso subcondral como un elemento en la absorción de cargas y describe cambios articulares tras la lesión del mismo. Radin et al. en 1972 postula la relevancia de esta estructura en la génesis de lesiones condrales y artrosis⁸². Este concepto es retomado y ampliado con posterioridad, estudiando los cambios que ocurren en el hueso subcondral en la artrosis^{54,80}. En este ambiente alterado, los osteoblastos del hueso subcondral sobreexpresarán el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento transformante beta (Transforming Growth Factor β , TNF- β) y factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endotelial Growth Factor, VEGF). El resultado será la proliferación de un tejido fibroneurovascular aberrante^{78,83}. Esto provocará lesiones en la médula ósea del hueso subcondral (responsables de los edemas óseos en la artrosis⁸⁴) y un aumento en los canales de comunicación cartílago-hueso, que permitirá el intercambio de moléculas y células entre el hueso y la articulación.^{65,76,85} Cuando estas moléculas alcanzan el espacio articular activarán de nuevo vías inflamatorias celulares, perpetuando el proceso de lesión tisular⁷⁸. Otros cambios estructurales del hueso subcondral, sobre todo en fases más avanzadas de la artrosis, serán la desmineralización ósea, la esclerosis subcondral y la osteofitosis. Todos ellos son el resultado de una remodelación intermitente anormal del hueso subcondral; este aspecto de la artrosis la vincula con la osteoporosis, otra enfermedad relacionada con el envejecimiento, en la que aparecen cambios óseos similares a los vistos en la artrosis^{30,86} (**Figura 1**).

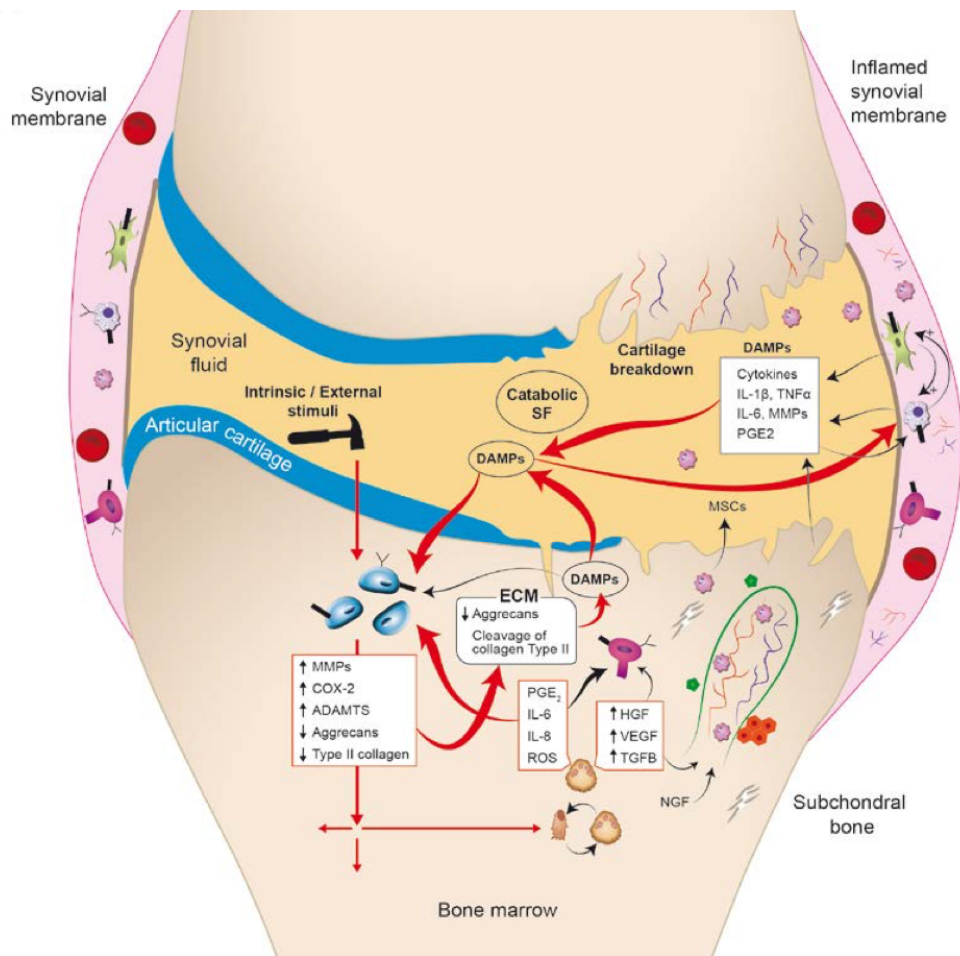


Figura 1.

La distribución anormal de la carga mecánica a través del cartílago articular rompe la homeostasis del cartílago articular y provoca respuestas celulares adaptativas o catabólicas, lo que conduce a una mayor síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMP) y agregcanasas (ADAMTS), expresión de citoquinas proinflamatorias y mediadores como la interleuquina-1B (IL-1B) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), la interrupción de la distribución de agua en los tejidos y fragmentos de matriz. Las citoquinas proinflamatorias involucradas en la artrosis, como la IL-1B y TNF- α son actores principales en la destrucción del cartílago articular al inhibir la síntesis de agregcanos y colágeno tipo II, mientras que al mismo tiempo estimulan la síntesis de MMPs en condrocitos. Se ha informado que la activación de TLR de macrófagos y fibroblastos sinoviales, y monocitos por DAMP presentes en un LS inflamatorio, es una vía importante en la promoción de la sinovitis en la artrosis a través de la vía de NF κ B, células que responden con la producción de MMPs, IL-1B, TNF- α e IL-6 entre otros mediadores catabólicos, promoviendo sinovitis en artrosis²²⁵.

Debemos detenernos también en las CMM del hueso subcondral y su papel en la patogenia de la artrosis.⁷⁴ Se han demostrado diversas alteraciones en las CMM de hueso subcondral en el paciente con artrosis. En primer lugar, encontramos un incremento del número de CMM en la articulación artrósica, tanto a nivel de hueso subcondral como en líquido sinovial. Existe un

reclutamiento de estas células desde el hueso subcondral hasta la superficie articular.^{83,87,88} Pero estas células presentan alteraciones serias en su perfil de diferenciación condrogénica y adipogénica, con un aumento de la capacidad osteogénica.⁸⁹ En este sentido, las CMM, células moduladoras de la actividad celular, pierden su capacidad de regulación del resto de tipos celulares. Esta falta de regulación es la responsable del crecimiento aberrante fibrovascular anteriormente descrito.⁸⁸ Otro aspecto relevante de las CMM en la articulación con artrosis es el aumento considerable del número de CMM senescentes.³⁰ Estas células senescentes presentan una evidente pérdida de su capacidad reguladora. Trabajos recientes encuentran que la artrosis puede ser causada por CMM senescentes y esas células pueden ser el objetivo de futuros tratamientos, con el fin de mejorar el pool de CMM y ralentizar la progresión de la enfermedad.⁹⁰

Por lo tanto, la artrosis es el resultado de varios procesos patológicos que ocurren en todos los tejidos articulares, con el hueso subcondral como elemento clave. Independientemente de cuál sea la causa o causas desencadenantes, el resultado es la instauración de un microambiente inflamatorio crónico que provoca la polarización celular a fenotipos proinflamatorios y a una pérdida de los mecanismos de regulación capaces de revertir esta situación.

1.2.3. Las terapias biológicas como herramientas terapéuticas en la artrosis

Algunas alternativas terapéuticas, como es el uso de AINEs de forma mantenida, poseen una elevada toxicidad sistémica, a la vez que local a nivel del hueso subcondral (mantienen un ambiente inflamatorio crónico de bajo grado por interferir con los mecanismos fisiológicos encargados de finalizar los procesos inflamatorios).⁹¹⁻⁹³ Es en este punto en el que las terapias biológicas tienen su relevancia, presentándose como moduladores de la respuesta celular capaces de revertir o al menos atenuar este proceso degenerativo. Y dado que todos los tejidos articulares están implicados y que el hueso subcondral posee una importancia fundamental en esta patología, los tratamientos intraóseos cobran gran importancia como terapia biológica, ya que son capaces de actuar en

localizaciones no accesibles a otras vías de administración, como la intraarticular.^{75,94,95} Los factores de crecimiento, por ejemplo, inducen la polarización de los macrófagos M1 (inflamatorios) hacia su fenotipo trófico M2, que está relacionado con funciones reparadoras en lugar de respuestas inflamatorias.⁹⁶ Varios estudios han demostrado la acción equilibrada de los factores de crecimiento en el PRP, como el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y el factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), inhibiendo la vía de señalización de NF- κ B en fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoblastos, reduciendo la síntesis de TNF- α e IL-1 β e interrumpiendo el proceso inflamatorio crónico articular.⁹⁷ Gracias a estos procesos, la restauración de un entorno biológico favorable, tiene un impacto positivo en la detención de la remodelación ósea y crecimiento fibroneurovascular del hueso subcondral durante la artrosis. Evitando o reduciendo la fibrosis o angiogénesis tisular no controlada puede ser decisivo para detener o ralentizar la progresión de la patología. La restauración de la homeostasis articular también influye en el comportamiento de las CMM que coordinan la remodelación ósea del hueso subcondral. Zhen y cols. lograron la atenuación de la degeneración del cartílago articular mediante la inhibición de la señalización de TGF- β en CMM nestina-positivas presentes en el hueso subcondral (**Figura 2 y 3**).

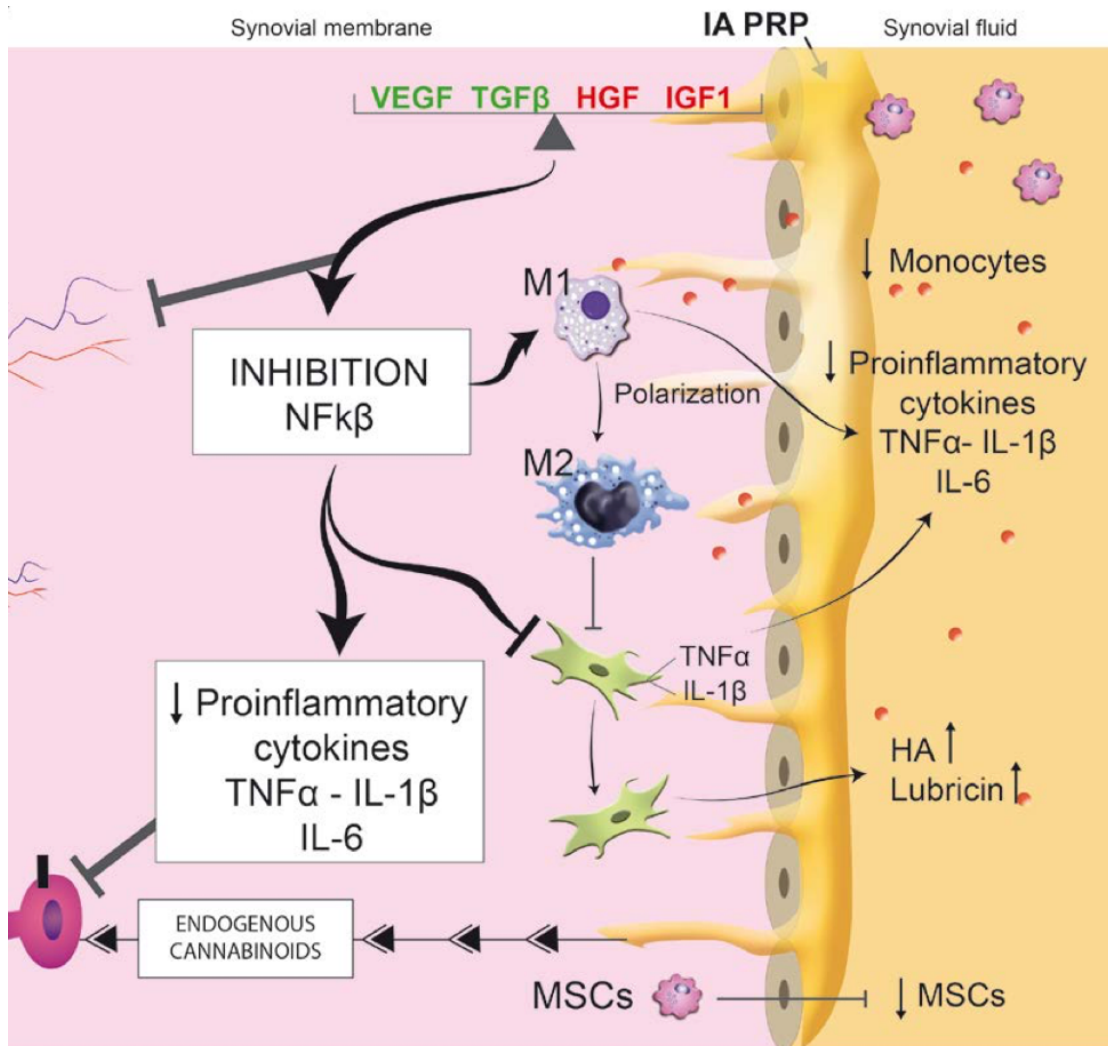


Figura 2.

El repertorio de respuestas antiinflamatorias inducidas por PRP puede romper el ciclo catabólico y amortiguar la respuesta inflamatoria en la membrana sinovial y cartílago articular cuando estas células están expuestas a citoquinas proinflamatorias y a estrés mecánico anormal y DAMPS, que es el contexto significativo de la artrosis.²²⁵

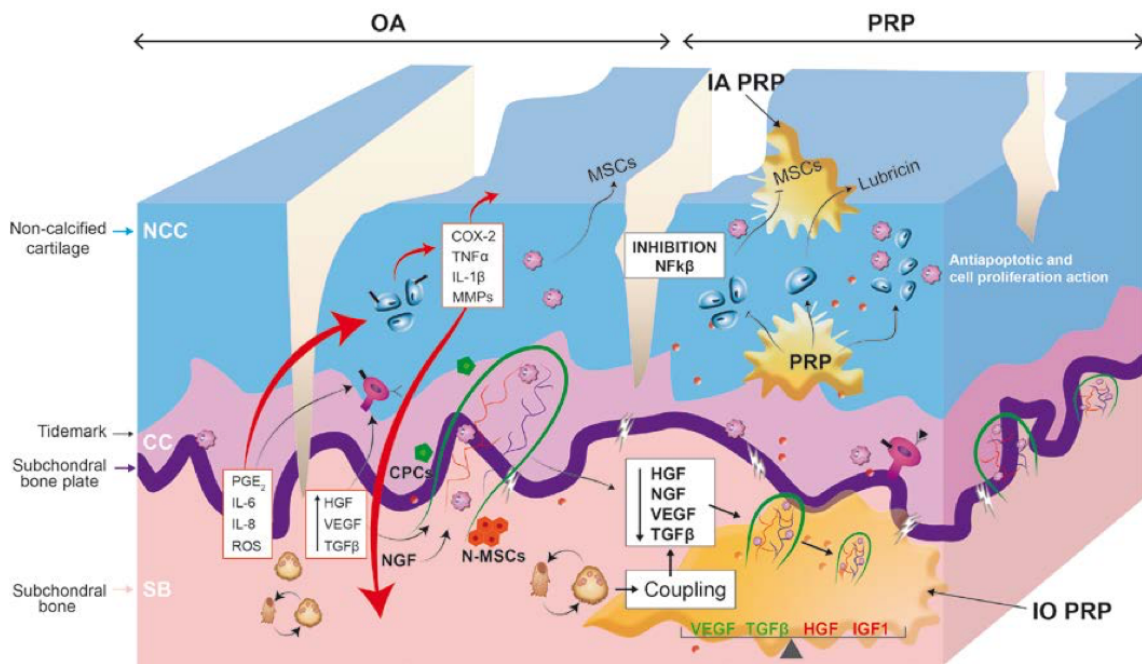


Figura 3

Representación esquemática del flujo de mediadores y células de afuera hacia adentro (cartílago articular-hueso subcondral) y de adentro hacia afuera (hueso subcondral-cartílago articular). El hueso subcondral (Subchondral Bone, SB) como un punto de salida de moléculas y células, a través de los canales y vasos que rompen la unión osteocondral, reclutados parcialmente por el líquido sinovial artrósico. La presencia excesiva de TGFβ1 y VEGF en el hueso subcondral con artrosis podría ser un factor determinante de los cambios en el acoplamiento osteoblastos-osteoclastos que conduce a un desequilibrio en la remodelación ósea, sobreexpresión de NGF y crecimiento fibrovascular, todos los cuales son cambios que además podrían contribuir a la degradación del cartílago suprayacente, cambios estructurales articulares y dolor.^{68,225}

1.3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

1.3.1. Definición, composición y factores condicionantes.

En las últimas décadas, una terapia emergente como es Plasma Rico en Plaquetas (PRP) está ganando relevancia en el área de la regeneración y reparación tisular.^{50,98-100} El PRP emplea la sangre del propio paciente con el fin de obtener una suspensión de plasma con una concentración de plaquetas superior a la de la sangre periférica. La composición celular y plasmática está determinada por el método empleado para la obtención del mismo. De esta manera, el PRP está compuesto por plasma, plaquetas a una concentración

similar o mayor a la sangre periférica y una concentración variable de leucocitos y eritrocitos, desde su ausencia hasta una alta concentración de los mismos.¹⁰¹ Tres elementos clave convergen simultáneamente en el PRP como una matriz líquido-dinámica: (1) los factores de crecimiento plasmáticos y plaquetarios y micropartículas derivadas de las plaquetas (Platelet-derived microparticles, PMPs), (2) la fibrina y (3) la interacción de estos factores de crecimiento tanto con la matriz de fibrina como con las células del tejido del propio paciente.^{50,102} Esta terapia biológica autóloga es un abordaje seguro y eficaz como agente terapéutico, tanto en formulaciones de infiltraciones líquidas de forma local o como en su equivalente de membranas.^{50,102}

En los últimos años se han desarrollado múltiples sistemas de producción de PRP, obteniendo diversos productos de características diferentes, todos bajo la misma denominación de PRP. Variables como el número de plaquetas, la presencia de leucocitos y el tipo de activación, entre otros, condicionan el PRP y su consecuente resultado.^{103,104} Así mismo, la eficacia de este tratamiento radica no sólo en las características del PRP, sino también de su vía de administración.

Una aplicación inapropiada de PRP puede conducir a una respuesta biológica ineficaz y resultados clínicos insatisfactorios. Por ejemplo, las infiltraciones intraarticulares de PRP alcanzan el cartílago y la membrana sinovial, promoviendo un cambio en el entorno de la rodilla, que frena la progresión de la artrosis y modula los síntomas clínicos. Sin embargo, esta vía de administración intraarticular no llega de forma suficiente ni eficaz a las capas más profundas del hueso subcondral, elemento clave en la patogenia de la artrosis. Otros factores como el estado de salud y la edad del donante pueden afectar a la eficacia de esta terapia.¹⁰⁵

1.3.2. Justificación del uso del PRP intraóseo en la artrosis de rodilla

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la necesidad de encontrar nuevas terapias para la artrosis de rodilla ha hecho que el PRP se haya convertido en una opción de primera línea para el tratamiento de esta patología. En diferentes estudios preclínicos se han determinado varios mecanismos mediante los cuales el PRP puede jugar un papel fundamental en restablecer el

equilibrio biológico articular. Este potencial terapéutico, podría verse incrementado optimizando su administración y llegando a más tejidos diana, responsables del buen funcionamiento de la rodilla. Esto podría conseguirse combinando las inyecciones intraarticulares con infiltraciones intraóseas que alcancen el hueso subcondral (**Figura 4**).

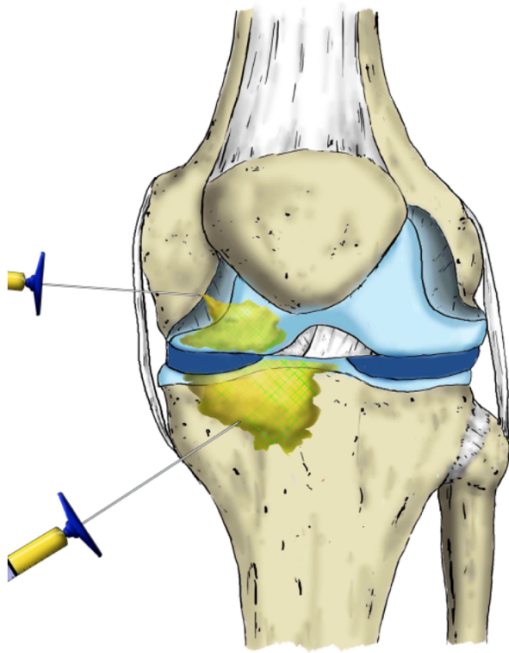


Figura 4.

Técnica de infiltración intraósea en rodilla

A: Posicionamiento del trócar de infiltración a nivel del cóndilo femoral (imagen intraoperatoria de fluoroscopia)

B: imagen de la difusión del PRP a nivel del cóndilo femoral obtenida tras la aplicación de 5 ml de PRP teñido con azul de metileno en pieza cadavérica.



Así, el PRP ha demostrado tener un papel protector sobre mecanismos relacionados con la senescencia celular, como es el estrés oxidativo, que influye en el estado catabólico del hueso subcondral.¹⁰⁶ El PRP activa el elemento de respuesta antioxidante (ARE) en cultivos de osteoblastos, protegiendo a las células de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estrés oxidativo.¹⁰⁷ Aunque el PRP contiene factores proangiogénicos y profibróticos, no se ha informado crecimiento aberrante durante los tratamientos con PRP en patologías de rodilla.¹⁰⁸

La acción moduladora del PRP también podría reducir la sobreexpresión de TGF- β responsable de las CMM aberrantes durante la artrosis. Además, los estudios *in vivo* mostraron que las infiltraciones intraóseas de PRP influyen directamente sobre las CMM, disminuyendo drásticamente su número aberrante en líquido sinovial de rodillas artrósicas tras la infiltración de PRP intraóseo, a la vez que mejoraban sus cualidades mermadas en lo referente a proliferación y diferenciación. En cuanto al proceso de envejecimiento celular, varios trabajos evidencian que la aplicación de PRP intraóseo rescató a las CMM de la senescencia, devolviéndoles su potencial de proliferación celular, mejorando su osteogénesis y previniendo el estrés oxidativo²⁴ (**Figura 5**).

Aunque en edades tempranas, los huesos largos albergan la médula ósea eritropoyética y las células responsables de la hematopoyesis,¹⁰⁹ los huesos largos del adulto (como es el caso del fémur o la tibia) presentan un predominio de médula ósea adipocitaria considerada atrófica o degenerada.¹¹⁰ Sin embargo, existen evidencias que sugieren que las infiltraciones intraóseas de PRP ejercen acciones sistémicas; en un estudio realizado en voluntarios sanos se observó, tras la infiltración de PRP en cresta ilíaca, movilización de células endoteliales progenitoras a sangre periférica sin interferir con las células hematopoyéticas, además de elevar, a los 3 días de la infiltración, los niveles de VEGF, factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), factor 1 derivado de células estromales (Stromal cell-Derived Factor 1, SDF-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor, FGF).¹¹¹ Así mismo, en una serie de experimentos llevados a cabo por Liu y

cols.^{24,47} en ratones, estos autores demostraron el efecto anti-senescencia de las infiltraciones intraóseas de PRP, principalmente en las células de piel, hueso y sistema nervioso central.

En un estudio clínico piloto¹¹² se evaluó la seguridad de esta forma de administración en 15 pacientes con artrosis de rodilla, confirmando su eficacia y ausencia de efectos adversos. Este estudio supuso el inicio de este tipo de tratamiento, así como la necesidad de continuar esta línea de investigación.

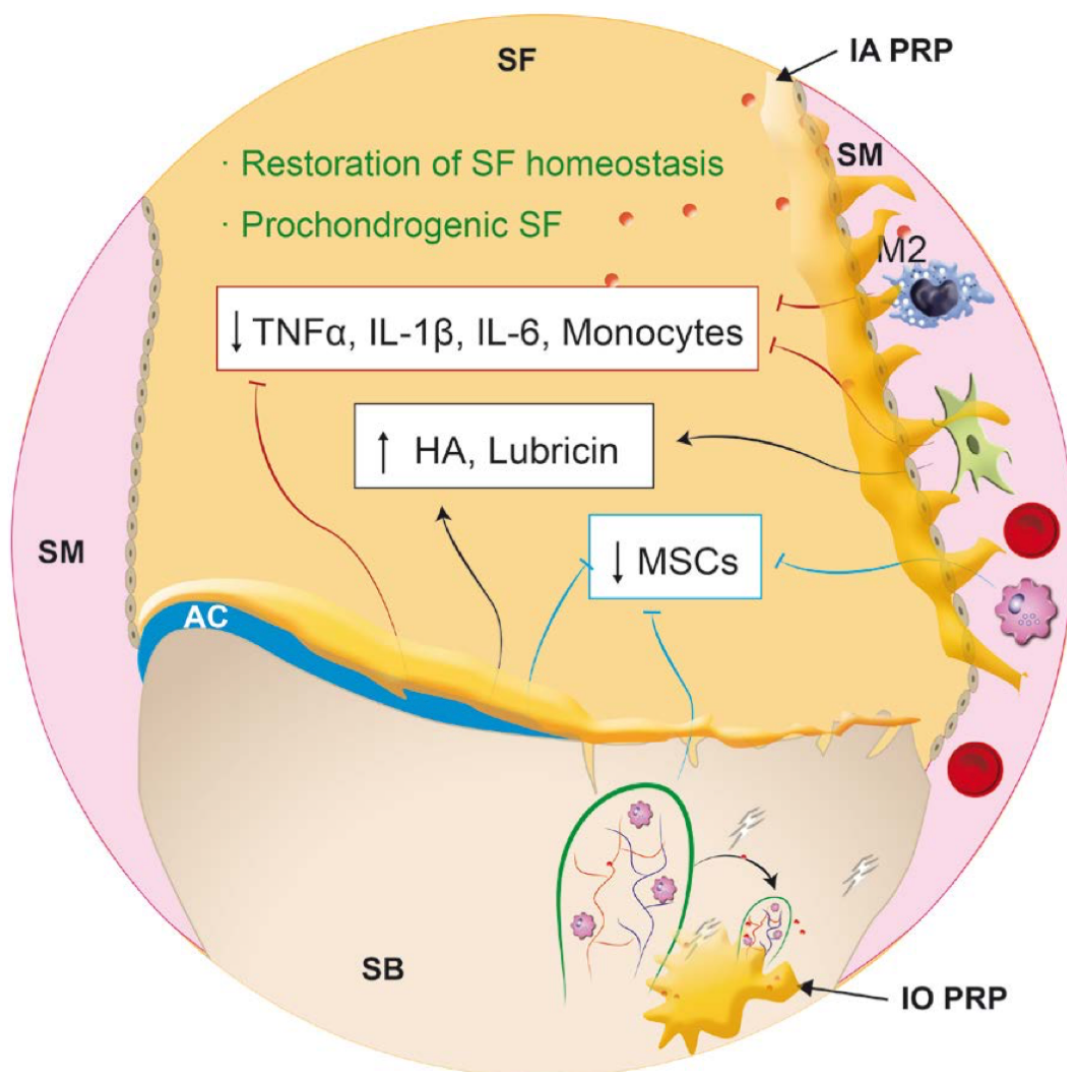


Figura 5.

La infiltración intraarticular de PRP ayuda a restaurar la homeostasis del SF al estimular la síntesis de ácido hialurónico y lubricina por los sinoviocitos y condrocitos respectivamente, amortiguando la inflamación y suprimiendo la concentración citoquinas en SF, lo que podría contribuir a la inhibición de la liberación y migración de CMM.²²⁵

Una de las principales limitaciones en el campo de la terapia biológica con PRP es que la mayoría de los estudios incluyen formulaciones de PRP obtenidas por diferentes métodos, con diversas composiciones y características, por lo que los resultados podrían ser diferentes dependiendo del producto utilizado, a pesar de que todos se denominen PRP. Esto hace que la comparación entre los resultados de diversos estudios a menudo sea confusa y contradictoria. Esta limitación ocurre tanto en la investigación clínica como en la preclínica.^{113–115} Un artículo reciente de Chahla y cols.¹¹⁶ concluyó que sólo 11/105 estudios (10%) proporcionaron informes completos sobre el protocolo de preparación de PRP, y solo 17/105 estudios (16%) proporcionaron métricas cuantitativas sobre la composición del PRP final. A menudo la literatura se caracteriza por la escasez de datos los proporcionados por los autores sobre la composición y la actividad biológica del PRP particular adoptado.¹¹⁷

En los últimos años se han propuesto varios sistemas de clasificación para informar sobre los parámetros más relevantes del PRP. Estas clasificaciones se han vuelto más sofisticadas al incluir múltiples parámetros, por lo que ninguna de ellas ha llegado al acuerdo de los expertos.^{118–120} Recientemente se ha publicado un sistema de codificación del PRP simplificado,¹²¹ basado en una secuencia de 6 dígitos agrupados en parejas que indican la composición plaquetaria, pureza y activación: N₁N₂-N₃N₄-N₅N₆. Los dígitos N₁ y N₂ muestran la composición plaquetaria del PRP, indicando la concentración plaquetaria en relación a la concentración basal en sangre periférica. Los dígitos N₃ y N₄ indican la pureza del PRP, en cuanto a la presencia o ausencia de eritrocitos y la concentración de leucocitos. Los dígitos N₅ y N₆ indican el método de activación. N₅ indica si la activación es endógena (0) o si la activación es previa a la infiltración (1) y N₆ hace referencia a la adición de calcio para la activación (0=no, 1=si). Así mismo, proponen tres tablas con el objetivo de resumir de una manera rápida y simple los aspectos relacionados con el PRP empleado en los diferentes estudios, en función de si se trata de estudios *in vitro*, *in vivo* o clínicos. Se trata de un sistema codificado, universal y abierto a la posibilidad de actualizarse conforme avance el conocimiento.

1.3.5. Características del PRGF®-Endoret®

El PRGF®-Endoret®, es un tipo de PRP que se caracteriza por una concentración moderada de plaquetas, alrededor de 2 veces superior a la concentración en sangre periférica. No contiene eritrocitos ni leucocitos, y la activación se lleva a cabo mediante cloruro cálcico (CaCl_2).¹²² De acuerdo con el último sistema de codificación anteriormente expuesto, este PRP corresponde a podría ser de tipo 12-00-11, 24-00-11 o 13-00-11, dependiendo de la concentración plaquetaria en sangre de los pacientes.

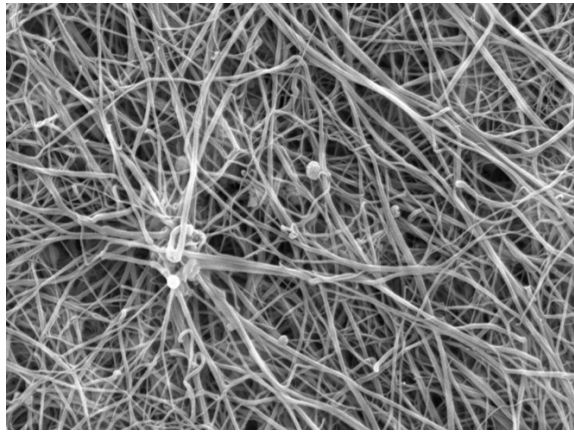
Para la obtención de este tipo de PRP, la extracción de sangre se realiza en tubos de 9 ml que contienen citrato de sodio 3,8% como anticoagulante. La centrifugación se realiza en una centrífuga específicamente diseñada, con parámetros específicos (580 g, 8 min) para maximizar la concentración de plaquetas y obtener un plasma libre de leucocitos. Tras la centrifugación se obtienen 3 fracciones. El plasma, la fracción más superficial de color amarillo que contiene un gradiente de plaquetas, con un máximo de concentración en la región inmediatamente superior a la capa leucocitaria. La fracción leucocitaria, situada inmediatamente inferior al plasma. La fracción más profunda, que contiene los glóbulos rojos. En función del volumen plasmático, es posible diferenciar 2 fracciones atendiendo a la concentración de plaquetas. La fracción más superficial contiene una concentración de plaquetas similar a la sangre periférica, mientras que la fracción más profunda contiene una concentración 2 o 3 veces superior. En función de las necesidades clínicas, se puede obtener una única fracción con un mayor volumen y una menor concentración de plaquetas, o dos fracciones consiguiendo un menor volumen, pero con mayor concentración de plaquetas. La activación se realiza añadiendo CaCl_2 10%, evitando de esta forma el uso de trombina bovina, fuente de posibles reacciones inmunológicas.¹²³⁻¹²⁵ Un aspecto a destacar es la ausencia de leucocitos, lo que lo categoriza como seguro y homogéneo, ya que la concentración de leucocitos es muy variable entre donantes, e incluso en el mismo donante, son altamente dependientes de pequeñas perturbaciones de la homeostasis corporal. Los leucocitos pueden agravar el daño tisular y promover un microambiente inflamatorio liberando $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, $\text{IFN-}\gamma$, citoquinas, que inducen la

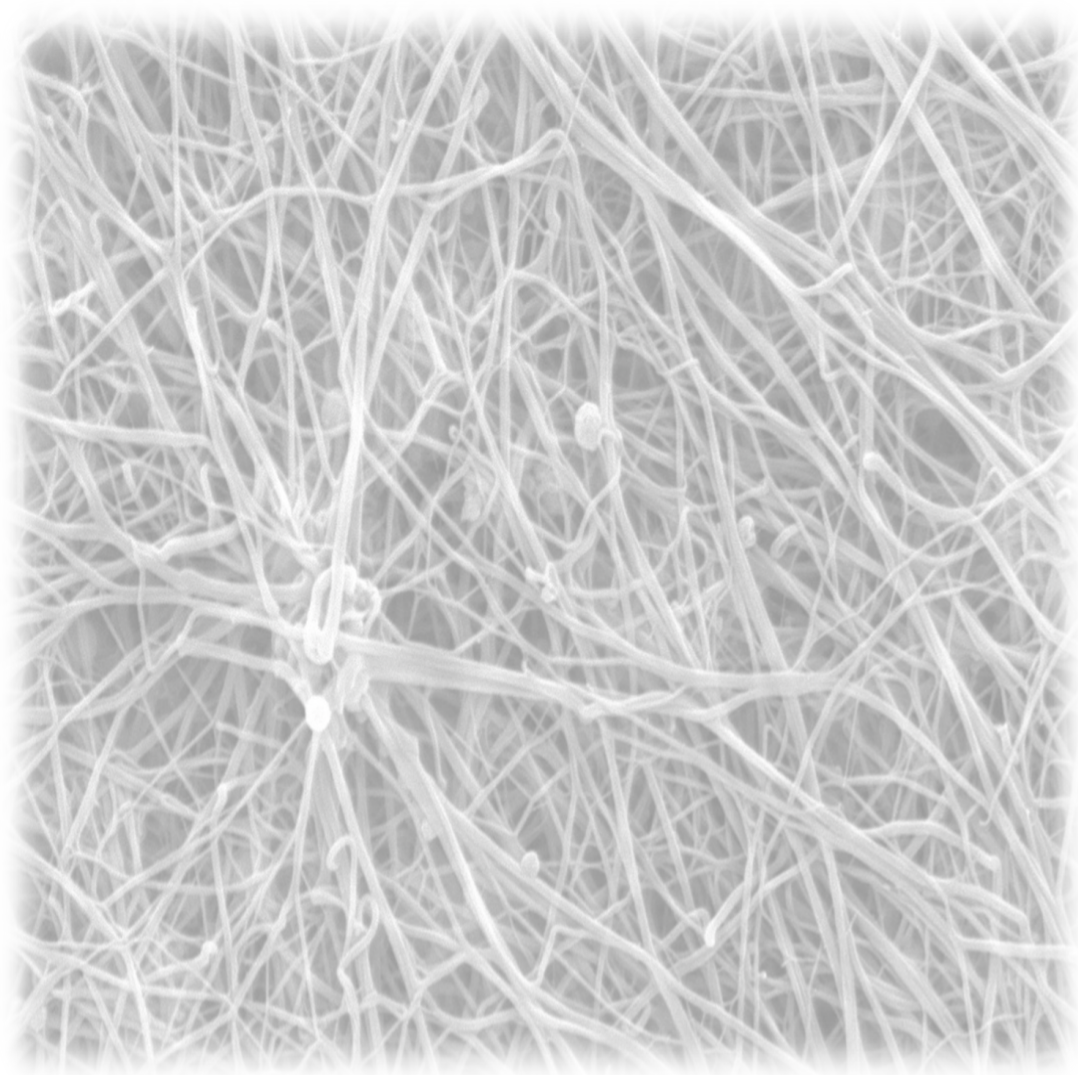
sobreexpresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), elastasa y catepsina G, así como especies reactivas de oxígeno entre otros, destruyendo de esta forma la MEC y exacerbando la lesión original.^{126,127} Numerosos grupos de investigación han puesto de manifiesto el efecto perjudicial de los leucocitos contenidos en el PRP sobre los sinoviocitos, condrocitos, CMM, así como sobre los síntomas clínicos.^{115,128–130} No obstante, varios estudios clínicos en artrosis no han visto diferencias en los resultados clínicos dependientes de la presencia de leucocitos. Además, algunos autores defienden la posibilidad de usar PRP con leucocitos en patologías tales como las tendinopatías crónicas, con el fin de buscar un estímulo inflamatorio que promueva la vascularización, precaria en este tipo de lesiones¹³¹.

Una vez activadas las plaquetas del PRP, comienza tanto la liberación de las moléculas plaquetarias como la polimerización del fibrinógeno plasmático en una estructura de fibrina transitoria tridimensional, que contiene dominios vinculantes de heparan sulfato para factores de crecimiento (PDGF, FGF, HGF, BDGF, VEGF, IGF y TGF- β), citocinas (TNF- α , IL-2, 3, 4, 5), quimiocinas (Factor plaquetario 4, PF4), componente de MEC (fibronectina, trombospondina y tenascina), moléculas de adhesión celular (L-selectina y moléculas de adhesión celular neural, NCAM), proteínas de fase aguda y proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico.^{132,133} Se genera una estructura biocompatible y biodegradable que secuestra diversos factores de crecimiento, micropartículas y otras biomoléculas liberadas de la degranulación de las plaquetas y el plasma **(Figura 6)**. Una vez infiltrado en el tejido a tratar y tras el comienzo de la fibrinólisis, se genera un gradiente de liberación prolongada y sostenida de biomoléculas, señales esenciales para la proliferación, diferenciación y migración celular, imitando el proceso biológico de reparación tisular.^{134–136}



Figura 6
Coágulo de fibrina (izquierda)
Imagen de la red de fibrina obtenida mediante
microscopía electrónica (derecha)





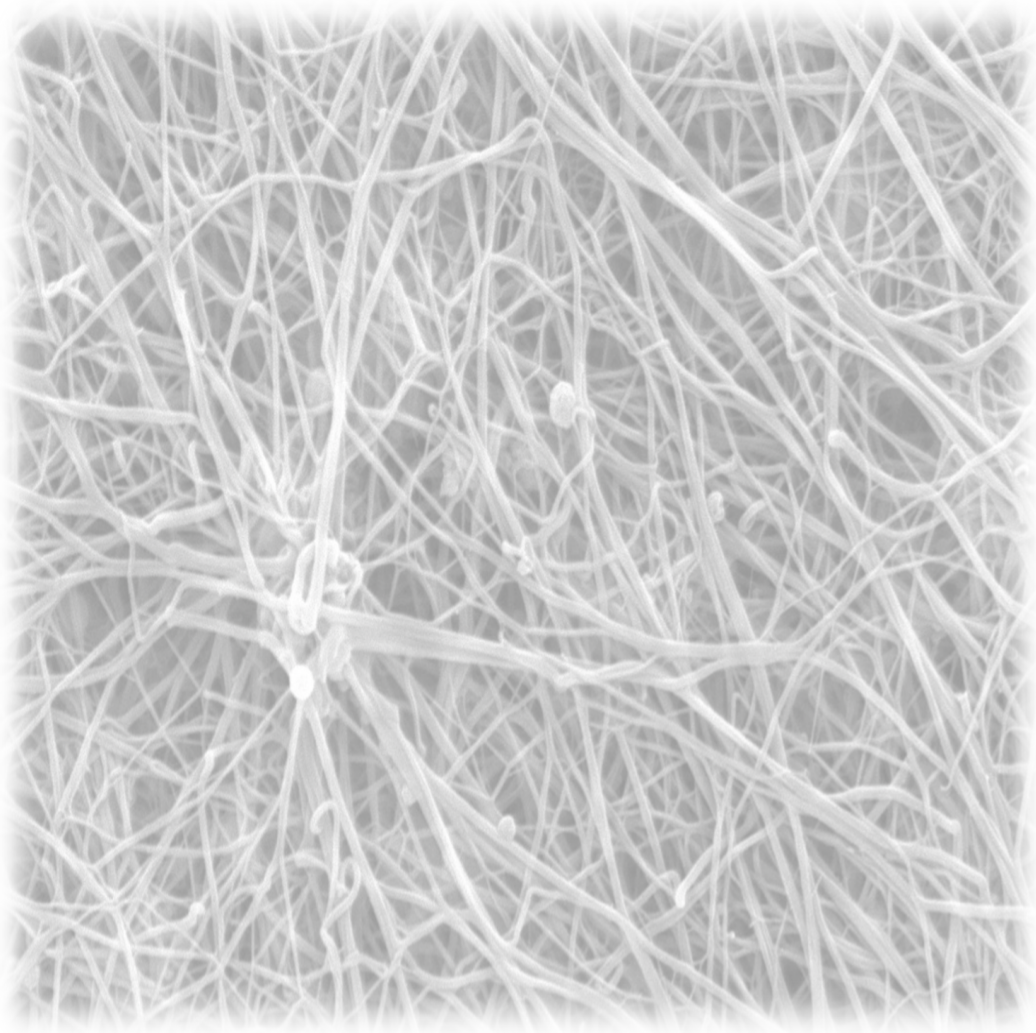
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una técnica terapéutica enmarcada dentro de la medicina regenerativa, mediante la cual se obtiene una fracción de plasma con una concentración de plaquetas similar o mayor a los niveles en sangre. Tanto las biomoléculas presentes en el plasma como las liberadas por las plaquetas participan en procesos que favorecen un ambiente biológico propicio para el mantenimiento de la homeostasis y la reparación tisular. La fácil obtención del PRP, su seguridad y sus resultados prometedores han hecho que esta técnica se extienda rápidamente por diferentes especialidades médicas incrementando su uso considerablemente. Sin embargo, y a pesar de su creciente popularidad, hay un gran desconocimiento sobre este tratamiento.

Así este trabajo se basa en la hipótesis de que la alteración de la homeostasis articular generada en la articulación de la rodilla durante la artrosis puede restaurarse mediante infiltraciones intraóseas de PRP, actuando a nivel biológico y clínico, el cual podría estar condicionado por la edad de los donantes. Para ellos, se han determinado los siguientes objetivos:

1. Analizar los efectos estructurales tras infiltraciones intraóseas de PRP en la médula ósea y las diferencias determinadas por la edad del donante mediante.
2. Estudiar las diferencias en los procesos celulares de distintos tipos de PRP según la edad del donante.
3. Evaluar la eficacia terapéutica de la aplicación intraósea de PRP en pacientes con artrosis de rodilla severa.

Para lograr cada uno de los objetivos, se plantearon los tres estudios expuestos a continuación.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudio 1: Efectos biológicos y estructurales tras infiltraciones intraóseas de plasma rico en plaquetas dependiente de la edad

3.1.1. Animales

En este estudio se utilizaron 24 ratas Wistar de edad avanzada (18 meses de edad). El manejo de animales y los procedimientos quirúrgicos se realizaron de acuerdo con la directiva del Parlamento Europeo y del Consejo de las Comunidades Europeas (2010/63/UE) y la legislación española (RD 1201/2005 y Ley 32/2007). El protocolo (M20_2017_57) de este estudio fue aprobado por el comité de ética local. Los animales se pusieron en cuarentena durante al menos 1 semana antes del estudio. Fueron alojados en condiciones estándar y tuvieron acceso “ad libitum” al agua y una dieta estándar para roedores de laboratorio. Los animales se dividieron en cuatro grupos: grupo de control (C), grupo de solución salina (S), grupo de PRP de donante joven (Y-PRP) y grupo de PRP de donante de edad avanzada (A-PRP). Durante 6 meses se realizaron seis infiltraciones bilaterales en los fémures mensualmente para los grupos S, Y-PRP y A-PRP. El PRP se obtuvo de donantes de 3 meses (jóvenes) y de 18 meses (ancianos) y se administró a los grupos Y-PRP y A-PRP, respectivamente. Por ello, durante el estudio se incluyeron ratas Wistar de 3 y 18 meses para utilizarlas como donantes de PRP. El grupo de solución salina recibió inyecciones intraóseas de solución salina mientras que el grupo de control se sometió a la misma cirugía sin recibir ningún tratamiento.

3.1.2. Preparación del PRP

Cada día de la intervención se prepararon ambos pools de PRP (joven y viejo) para extraer hasta un volumen total de sangre de 20 mL de cada grupo. Cada grupo de donantes estuvo compuesto por cuatro animales, de los cuales se extrajeron hasta 5 mL para lograr el volumen final de 20 mL para cada pool. La sangre se extrajo por punción cardíaca en tubos de 5 mL empapados con ácido etilendiaminotetraacético para evitar la coagulación. La sangre se

centrifugó durante 8 min a 300g a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se obtuvieron tres capas, plasma, capa leucocitaria y glóbulos rojos. El plasma se recolectó evitando la capa de leucocitos para preparar al menos 3 mL de PRP para realizar infiltraciones intraóseas. Ambos pools de PRP se prepararon cada día de la intervención, con un total de 6 pools de cada grupo de donantes a lo largo del estudio. El número de eritrocitos, leucocitos y plaquetas de PRP se evaluó utilizando un analizador de hematología. El análisis de ambos PRP se amplió analizando biomoléculas. Para estos análisis, se recolectaron muestras de cada grupo y se realizaron análisis por duplicado. Después de determinar la concentración de proteínas utilizando el kit de cuantificación de proteínas BCA (Abcam, Cambridge, Reino Unido; BD Transduction Laboratories, San Diego, CA), las muestras de PRP de donantes jóvenes y de edad avanzada se analizaron por duplicado utilizando el Proteome Profiler Ray XL Cytokine Array Kit según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN). Brevemente, las membranas manchadas con anticuerpos de captura contra 79 citocinas de rata diferentes impresas por duplicado se incubaron con 6,5 mg de proteína PRP en 1,5 ml durante la noche a 4 °C. A continuación, se añadió el cóctel de anticuerpos de detección conjugados con peroxidasa de rábano picante durante 1 hora a temperatura ambiente y las señales se visualizaron exponiendo películas de rayos X a quimioluminiscencia enzimática durante 10 minutos. Las películas se escanearon en modo de transmisión y se digitalizaron en escala de grises de 16 bits y resolución de 300 dpi. La densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de cada punto se cuantificó mediante densitometría utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ; NIH, Bethesda, MD).

3.1.3. Administración del tratamiento

Las infiltraciones fueron bilaterales en la epífisis-metáfisis distal del fémur, realizadas una vez al mes hasta un total de seis infiltraciones y bajo anestesia inhalatoria con isoflurano. Brevemente, se localizó el fémur por palpación y se realizó una incisión sobre él. Después de separar las capas musculares, se expuso el fémur y se perforó la parte distal del fémur para introducir la aguja y

realizar la inyección intraósea de PRP de donante joven, PRP de donante de edad avanzada o solución salina.

En cada fémur se infiltraron 200 μ L del producto según el grupo de estudio. Finalmente, se cerró la herida y se evaluó el buen estado de los animales. Durante el estudio se realizó control de peso y movilidad antes y después de cada infiltración. Los animales tuvieron una buena recuperación después de cada operación y ninguna de las ratas sufrió variaciones significativas de peso.

Después de la intervención y a las 24 horas los animales recibieron buprenorfina subcutánea (0,05 mg/kg). Cuatro días después de la última infiltración, los animales fueron anestesiados con ketamina y xilazina antes del sacrificio (80 y 10 mg/kg, respectivamente). Se extrajo uno de los fémures de cada rata y se conservó en formaldehído para la microtomografía computarizada (micro-CT). Los mismos fémures junto con el músculo vasto lateral también fueron evaluados por análisis histológico. Los fémures contralaterales que no se utilizaron para los análisis se conservaron en formaldehído y se mantuvieron y almacenaron como respaldo.

3.1.4. Análisis micro-CT

Se adquirieron imágenes tomográficas tridimensionales (3D) de fémures de rata usando micro-CT de rayos X (MicroCAT II; Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN) con los siguientes parámetros: voltaje de fuente de rayos X de 80 kVp, corriente de 500 μ A y 2000 -ms de tiempo de exposición por proyección. Se adquirieron 700 proyecciones micro-CT con un tamaño de vóxel isotrópico de 20 μ m y una resolución de 768 \times 768 píxeles. Las imágenes de micro-CT se reconstruyeron automáticamente utilizando el software Cobra (Exxim Computing Corporation, CA). Las imágenes óseas en 3D se reproducidos utilizando el software Amira 3D para análisis preclínico (Thermo Fisher Scientific, MA).

Para realizar el análisis de histomorfometría ósea, se definieron tres regiones de interés (ROI) que contenían la epífisis, la metáfisis y la diáfisis del hueso a partir del escaneo original con una resolución de 20 micras. El análisis de la histomorfometría ósea en cada ROI se llevó a cabo utilizando un complemento desarrollado para Fiji/ImageJ, un software de procesamiento de imágenes de

código abierto basado en Java. El complemento fue desarrollado por Imaging Platform en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Los parámetros de histomorfometría relacionados con el hueso cortical, el hueso trabecular y la placa subcondral se calcularon utilizando BoneJ versión 1.4.2.16.

3.1.5. Análisis histológico

Para estos análisis, se emplearon los mismos fémures que se utilizaron previamente en el análisis de micro-CT. Los fémures y el vasto lateral se fijaron en paraformaldehído al 4% durante al menos 24 h. En el caso de los fémures, una vez fijados, se descalcificaron sumergiéndolos en EDTA al 10% (0,8M) a pH 6,5 y a temperatura ambiente. La solución de EDTA se reemplazó cada 2 días durante 4 semanas. A continuación, todas las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes graduados, se enjuagaron en sustituto de xileno y se incluyeron en parafina, cortando longitudinalmente los bloques obtenidos. Las secciones resultantes del fémur se tiñeron con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. Las secciones del vasto lateral se tiñeron con Sirius rojo para evaluar el contenido de colágeno en las miofibras.

Las muestras fueron examinadas por microscopía óptica convencional (Axio Vert; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania) y fotografiadas con una cámara digital (AxiCam ICc1; Carl Zeiss Microscopy GmbH). El porcentaje de celularidad de la diáfisis del fémur respecto del área total y el porcentaje de colágeno en el músculo respecto del área total se analizaron de forma manual y/o semiautomática utilizando el software ImageJ v.1.4 (NIH). En el caso de la celularidad de la médula ósea, se cuantificaron los núcleos celulares (púrpura) y se compararon con el número de adipocitos o adipogénesis (blanco). El cartílago presente en la epífisis del fémur se analizó utilizando el sistema de puntuación de la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago (ICRS) (Mainil-Varlet).

3.1.6. Análisis estadístico

Las comparaciones se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). La distribución normal de las muestras se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene. En caso

de que los datos no se ajustaran a la distribución normal o las varianzas no fueran homogéneas, se aplicó el ANOVA no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p fueron inferiores a 0,05. El análisis estadístico se realizó con PASW Statistics 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

3.2. Estudio 2: Efectos del plasma rico en plaquetas en las poblaciones celulares del sistema nervioso central: la influencia de la edad en el donante.

3.2.1. Preparación y caracterización del PRP

La junta de revisión institucional aprobó este estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes de los que se extrajeron muestras biológicas.

El PRP se preparó a partir de sangre periférica de donantes sanos: 12 donantes de edad comprendida entre los 65 y 85 años y 8 donantes de edad comprendida entre los 20 y 25 años. En primer lugar, se extrajeron 81 mL de sangre venosa de cada donante para preparar el PRP y se almacenaron en tubos de 8 mL que contiene citrato de sodio al 3,8%. La sangre se centrifugó a 580 g durante 8 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, la fracción de plasma ubicada sobre los glóbulos rojos sedimentados, se recolectó en un tubo sin incluir la capa leucocitaria según el protocolo [38]. Este proceso de obtención evita la inclusión de glóbulos blancos y alcanza una concentración moderada de plaquetas (1 a 2 veces la concentración de plaquetas en comparación con sangre periférica, dependiendo del recuento y tamaño de las plaquetas, así como del hematocrito) y ausencia de eritrocitos y leucocitos. El plasma obtenido de cada paciente se activó agregando CaCl_2 al 10%, y el sobrenadante obtenido después de la coagulación del plasma se mezcló para obtener el PRP de donante de edad avanzada y PRP de donante joven.

Los PRP recolectados se analizaron usando un analizador de hematología para evaluar los eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Además, las moléculas y citoquinas fueron analizadas por diversos Kits ELISA y kit de matriz de citocinas XL humano perfilador de proteoma (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado según el procedimiento especificado en los kits.

3.2.2. Ensayos in vitro

3.2.2.1. Cultivo y Diferenciación Neuronal de Células NT2

Se sembraron células NTERA2-D1 de teratocarcinoma humano (NT2) de la American Type Culture Collection (ATCC®, CRL-1973TM, Manassas, VA, EE. UU.) en cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con poli-D-lisina con Matrigel™ diluido al 1:25 (BD Biosciences, Madrid, España), y mantenido en medio completo: Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM®, ATCC 30-2002TM), suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, Gibco, Life Technologies S.A., Madrid, España). Las células NT2 se analizaron de forma rutinaria para la contaminación por micoplasma mediante PCR utilizando los cebadores descritos por Uphoff y cols. [40]. Los controles positivos y negativos utilizados para estas pruebas fueron donados por el Dr. Uphoff (Leibniz-Institute DSMZ, Department of Human and Animal Cell Lines, Virus Diagnostics, Inhoffenstr. 7b, 38124 Braunschweig, Alemania).

Los cultivos que habían alcanzado el 70 % de confluencia fueron:

(1) inducidos a diferenciarse en neuronas mediante el tratamiento con 20 µM del análogo del nucleósido pirimidina citosina β-D-arabinofuranoside (AraC) durante tres días y se analizó el efecto del PRP en la viabilidad celular y morfología de estas células

(2) o privadas de FBS durante 24 h para analizar el efecto de la estimulación con PRP en la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU).

3.2.2.2 Tratamiento con PRP, obtención de imágenes y análisis de la incorporación de BrdU en células progenitoras NT2

Las células NT2 privadas de FBS durante 24 horas se estimularon durante 24 horas adicionales con FBS al 10%, FBS al 2%, PRP de donante de edad avanzada al 2% o PRP de donante joven al 2% y luego se incubaron con 10 μ M de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU; Thermo Fisher Scientific, Barcelola, España) durante 4h antes de ser fijado para el marcaje y análisis de inmunofluorescencia. El marcaje y análisis de inmunofluorescencia. Las células NT2 tratadas de forma idéntica, pero sin suero añadido, se usaron como control no estimulado.

3.2.2.3. Tratamiento con PRP, obtención de imágenes y análisis de células NT2 diferenciadas con AraC

Después de tres días de diferenciación, el medio completo que contenía 20 μ M de AraC se reemplazó por un medio completo fresco suplementado o no con 2% de PRP de donante de edad avanzada o 2% de PRP de donante joven y se mantuvo durante tres días más en cultivo. A continuación, las células se fijaron y procesaron para marcaje con inmunofluorescencia doble.

3.2.2.4. Cultivos primarios neuronales

Se obtuvieron cultivos de neuronas primarias de los lóbulos corticales de embriones de ratas E18 Sprague-Dawley de acuerdo con los procedimientos descritos previamente. Las células se resuspendieron en medio Neurobasal B27 más FBS al 10 % (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU) en placas recubiertas de poli-1-ornitina a $1,5 \times 10^5$ por placa. Un día después, el medio se reemplazó por medio neurobasal suplementado con B27 sin suero. Los cultivos estaban esencialmente libres de astrocitos y microglia; se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂. Los cultivos se usaron 8 a 10 días después de la siembra.

3.2.2.5. Ensayo de toxicidad

Se utilizó un ensayo de calceína para las mediciones de viabilidad y, en consecuencia, también para proporcionar mediciones de toxicidad. Después del

tratamiento deseado, las neuronas se incubaron con 1 μ M calceína-AM (Invitrogen) durante 30 min y los datos se adquirieron con un fluorímetro Synergy-HT (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.).

3.2.2.6. Western Blot para marcadores sinápticos in vitro

Los lisados se prepararon a partir de neuronas primarias de cultivo de ratas 7DIV utilizando un tampón RIPA modificado como se describió anteriormente [42]. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el ensayo de proteína DC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) y se analizaron cantidades iguales de proteína de cada muestra mediante Bolt 4–12 % Bis-Tris Plus SDS-PAGE (Thermo Fisher Scientific), seguido de inmunotransferencia. Las bandas de proteínas se detectaron con un sistema de imagen Chemi-Doc™ XRS (Bio-Rad), y las intensidades de las bandas se cuantificaron por densidad utilizando el software Quantity One® (Bio-Rad). Las mediciones de proteína sináptica de sinaptofisina y PSD-95 se dividieron por la medición de β -actina correspondiente para la normalización. Estas densidades normalizadas luego se escalaron para que el valor promedio para el tipo salvaje fuera 100%.

3.2.2.7. Inmunofluorescencia para marcadores sinápticos in vitro

Las neuronas cocultivadas a 10 DIV se fijaron en formaldehído al 4 % y sacarosa al 4 % en PBS durante 20 min, se lavaron en PBS, se permeabilizaron con Triton-X al 0,2 % durante 5 min y se bloquearon en BSA al 3 % durante 60 min. Los cultivos se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios, anti-Sinaptofisina y anti-Homer, en NGS al 2% en PBS. Los cultivos se lavaron tres veces con PBST (Tween al 0,05 % en PBS) y se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado apropiado, las placas se montaron con Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EE. UU.). La inmunofluorescencia se examinó mediante microscopía confocal usando un microscopio confocal Leica TCS STED CW SP8X (Leica, Wetzlar, Alemania).

3.2.2.8. Intensidad de marcador sináptico y análisis de puntos

Las imágenes confocales se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS STED CW SP8X. Se analizó un cubreobjetos de cada cultivo, con 2-5 neuronas por cubreobjetos. De cada neurona, se seleccionaron de 3 a 5 segmentos neuríticos de 20 μm de longitud de áreas donde se podía delinear cualquiera de los dos procesos. Las imágenes tienen un umbral para la eliminación del fondo. Para el análisis de marcadores sinápticos, la intensidad integrada de cada una de las áreas con umbral se cuantificó utilizando el software Fiji-ImageJ. Para el análisis de puntos sinápticos, las imágenes con umbral se convirtieron en imágenes binarias y se crearon regiones de interés (ROI). Cada ROI dentro del segmento se consideró un punto. Se cuantifica el número de puntos dentro del segmento. Para la colocalización de la sinaptofisina presináptica y Homer postsináptico, se cuantificaron los ROI de colocalización entre ambos canales dentro del segmento utilizando el software Fiji-ImageJ. Para cada condición, se promediaron las mediciones de segmentos individuales por embrión. Luego se usaron los promedios por embrión para calcular la media y la desviación estándar del grupo.

3.2.2.9. Ensayo de activación de microglia y cultivo de microglia

Los cultivos gliales mixtos primarios se prepararon a partir de la corteza cerebral de ratas neonatales (P0-P2) como se describió anteriormente [43]. Después de 10 a 15 días en cultivo, la microglía se aisló mediante agitación mecánica (400 rpm, 1 h) y se purificó sembrando en placas de Petri estériles (Sterilin), como se describió previamente por Domercq et al. [43]. Para analizar el impacto del PRP en la activación de la microglía, las células se expusieron (24 h) a lipopolisacárido LPS (10 ng/mL) e IFN γ (20 ng/mL; Peprotech; Londres, Reino Unido) en presencia o ausencia de plasma o PRP. Para cuantificar la activación de la microglía, analizamos por inmunocitoquímica la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), un marcador proinflamatorio, y la expresión del receptor de manosa (MNR), un marcador antiinflamatorio. La inmunorreactividad de iNOS y MNR se calculó con el software ImageJ (NIH) y se

normalizó al número de células (ocho campos por cubreobjetos, de al menos cuatro experimentos diferentes realizados por triplicado). Los resultados se expresaron como el cambio en la intensidad de la fluorescencia en relación con la observada en las células de control o en las células tratadas con LPS más IFN γ .

3.2.3. Análisis estadístico

Las comparaciones se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se usaron pruebas t de Student a menos que se indique lo contrario. La distribución normal de las muestras se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene. En caso de que los datos no se ajustaran a la distribución normal o las varianzas no fueran homogéneas, se aplicó el ANOVA no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p fueron inferiores a 0,05. El análisis estadístico se realizó con PASW Statistics 18.0 (SPSS®, Chicago, IL, EE. UU.) y GraphPad Prism (San Diego, CA, EE. UU.).

3.3. Estudio 3: Tratamiento de la artrosis grave de rodilla mediante la combinación de infiltraciones intraóseas e intraarticulares de plasma rico en plaquetas.

Se trata de un estudio observacional que incluyó pacientes desde 2015 hasta 2016.

3.3.1. Pacientes

El estudio incluyó 60 pacientes de edad comprendida entre los 40 y 80 años. Todos ellos fueron diagnosticados de osteoartrosis severa de rodilla, de acuerdo con los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología y una severidad radiológica grado III y IV según la escala de Ahlbäck.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: (1) Pacientes de ambos sexos de edad comprendida entre los 40 y 80 años. (2) Osteoartrosis de predominio medial. (3) Severidad radiológica grado III y IV, según la escala de Ahlbäck.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: (1) desalineación axial en varo superior a 4° y en valgo superior a 16°. (2) artroscopia en el año previo al tratamiento. (3) Infiltración de ácido hialurónico o corticoesteroides en los 6 meses previos al tratamiento. (4) Enfermedad sistémica reumática autoinmune.

Se incluyeron 30 pacientes en cada grupo de tratamiento, que recibieron un total de 3 infiltraciones de PRP con una frecuencia semanal. El primer grupo recibió 3 infiltraciones intraarticulares (IA) de PRP con una frecuencia semanal (grupo IA). El segundo grupo recibió una primera infiltración intraarticular de PRP junto con 2 infiltraciones intraóseas (IO) de PRP seguidas de 2 infiltraciones intraarticulares, con una frecuencia semanal (grupo IO) (**Figura 7**).

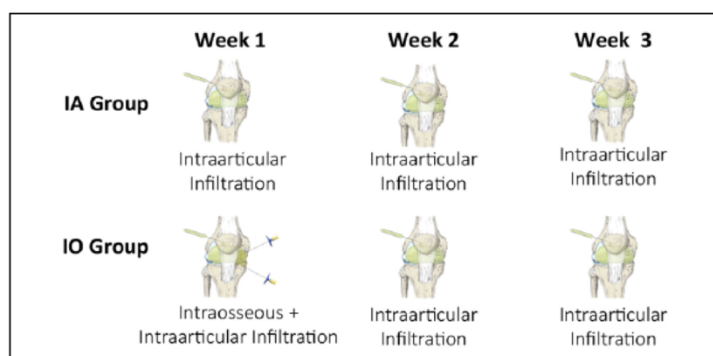


Figura 7 Representación esquemática de ambos grupos de tratamiento

Con respecto a la asignación del tratamiento, los pacientes eligieron la opción preferida, tras una correcta explicación del estudio y ofreciéndoles las dos opciones de tratamiento.

Los pacientes de ambos grupos fueron emparejados por edad, sexo, índice de masa corporal (IMC) y severidad radiológica (mismo Ahlbäck III y IV).

No existían diferencias entre ambos grupos en cuanto a edad, sexo, IMC, KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) basal y WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) basal, salvo en el apartado de actividades de la vida diaria del KOOS y función del WOMAC.

Se prohibió medicación coadyuvante en las 48 horas previas a la evaluación.

3.3.2. Preparación del PRP

Se realizó una extracción de 32ml de sangre venosa para la infiltración intraarticular y de 90 ml para la infiltración intraósea, en tubos de 9 ml que contenían citrato sódico 3,8% (w/v). La centrifugación se realizó a 580 g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó la fracción de plasma de 2 ml situada justo por encima de la columna de glóbulos rojos, sin incluir la capa leucocitaria. Esta fracción de plasma contiene una concentración moderada de plaquetas (1,5 a 2,5 veces superior a la concentración en sangre periférica, dependiendo del recuento y tamaño plaquetario, así como del hematocrito), y está libre de leucocitos y eritrocitos. El producto recibido por el grupo IA contenía una media de $377,65 \pm 74,60$ plaquetas/ml (rango de 250-552 plaquetas/ml). El PRP recibido por el grupo IO contenía una media de $363,30 \pm 71,13$ plaquetas/ml (rango de 198-518 plaquetas/ml). Se añadió cloruro cálcico 10% (w/v) al PRP líquido justo antes de la infiltración, para iniciar la activación de la coagulación plaquetaria. Todo el procedimiento de preparación del PRP se realizó bajo condiciones óptimas de esterilidad.

3.3.3. Tratamientos

La primera administración de PRP al grupo IO se realizó en quirófano, bajo sedación, e incluyó 3 infiltraciones en localizaciones anatómicas diferentes. En primer lugar, se realizó la infiltración de PRP intraarticular y, posteriormente, se realizaron 2 infiltraciones intraóseas de PRP, según la técnica descrita por Sánchez *et al.*¹³⁷ Con el paciente en posición decúbito supino, se realizaron 2 marcas en la piel de la región medial de la rodilla, una ellas localizada 2 cm proximal y la otra 2 cm distal a la interlínea articular medial. Se aplicó una solución de povidona yodada en el área de infiltración y se realizó infiltración de anestesia local en el periostio del cóndilo femoral y platillo tibial. En primer lugar, se realizó la infiltración intraarticular de 8 ml de PRP tras la evacuación del líquido sinovial. Posteriormente, se realizó la infiltración intraósea de 5 ml de PRP con trocar de biopsia ósea de 13G, siendo introducido manualmente y, bajo control

de fluoroscopia, 2 cm en el interior del cóndilo femoral medial y platillo tibial medial, alcanzando el hueso subcondral. Estos pacientes recibieron 2 infiltraciones intraarticulares de PRP a los 7 y 14 días tras la primera aplicación de PRP.

El grupo IA recibió 3 infiltraciones intraarticulares de PRP con una periodicidad semanal.

3.3.4. Evaluación de resultados

Los pacientes rellenaron el cuestionario KOOS basal, a los 2 meses, 6 meses y 12 meses tras la última infiltración de PRP, y fueron evaluados por un profesional diferente al que aplicó el tratamiento.

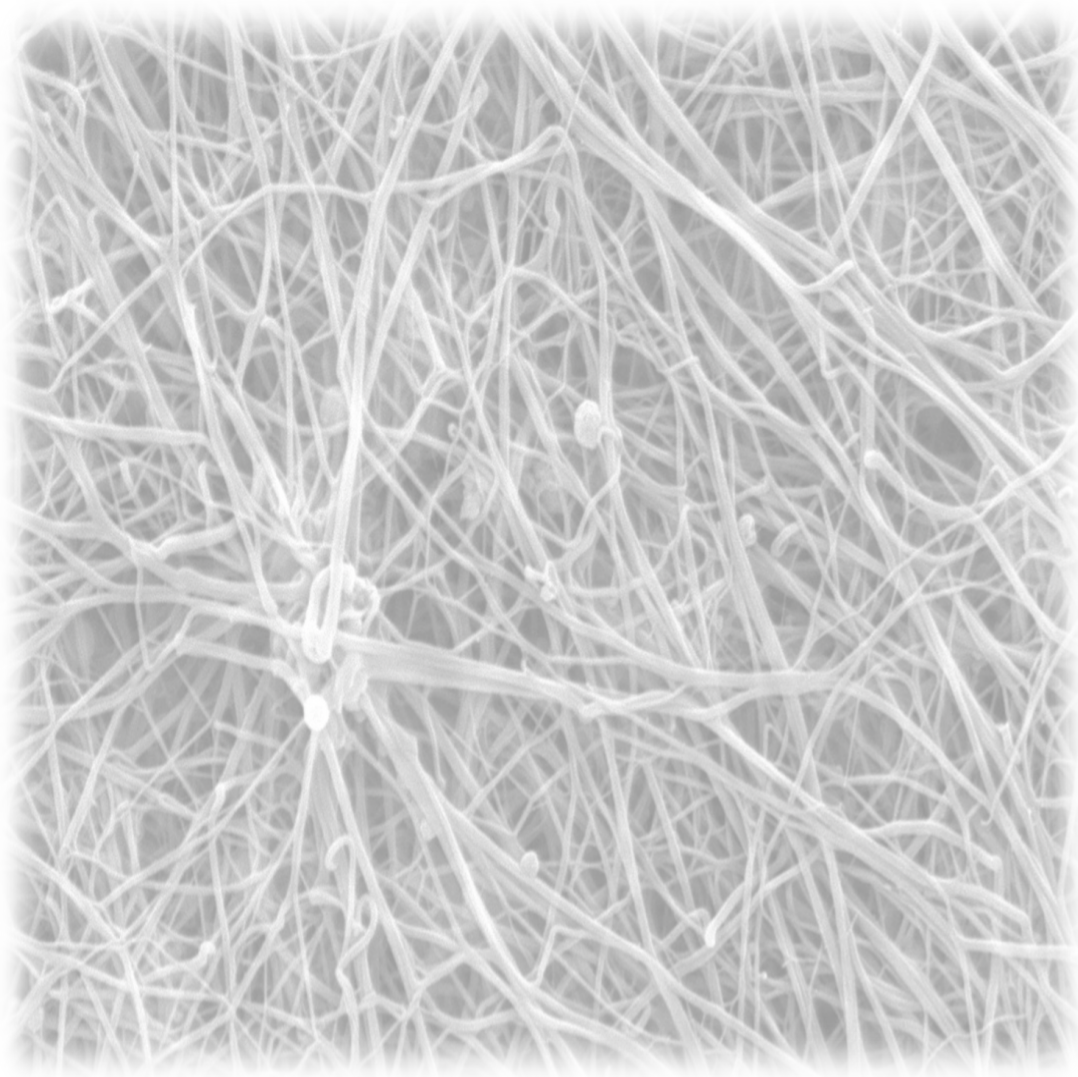
El criterio primario de eficacia fue el cambio en el dolor articular sobre el basal, medido según la subescala del dolor KOOS. Se consideró exitosa una reducción en la puntuación del dolor de al menos 10 puntos desde el valor basal (mejoría mínima clínicamente importante, MMCI).

Los criterios secundarios de eficacia incluían cambios en las subescalas de síntomas, actividades cotidianas, función en actividades deportivas y recreacionales y calidad de vida del cuestionario KOOS, así como las subescalas de dolor, rigidez y capacidad funcional del cuestionario WOMAC. La evolución desde el inicio del dolor general de rodilla después de la aplicación de la escala analógica visual (VAS) que osciló entre 0 y 100, se determinó mediante la escala WOMAC. En caso de pacientes que no mejoraron y se sometieron a otros tratamientos antes de los 12 meses, se incluyeron sus valores basales para obtener la puntuación en ese momento.

3.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de potencia para estimar el tamaño de la muestra necesario para lograr una potencia del 80 % a un nivel de significación del 5 % para las medidas de resultado primarias, para encontrar una diferencia de proporción estadísticamente significativa, que se espera que sea del 15 % en el grupo IA y del 50 % en el grupo IO.

Las variables demográficas y médicas (sexo, edad, IMC y grado de OA), fueron determinadas por la media, desviación estándar, rango y porcentaje. La tasa de éxito fue evaluada utilizando la prueba chi-cuadrado. Se realizaron comparaciones utilizando la prueba de *t* de Student para datos paramétricos de muestras independiente o emparejadas, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para datos no paramétricos de muestras no emparejadas y la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos de muestras independientes. La distribución de las muestras se evaluó mediante la prueba Saphiro-Wilk. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando la $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL).



4. RESULTADOS

4.1. Estudio 1: Efectos biológicos y estructurales tras infiltraciones intraóseas de plasma rico en plaquetas dependiente de la edad:

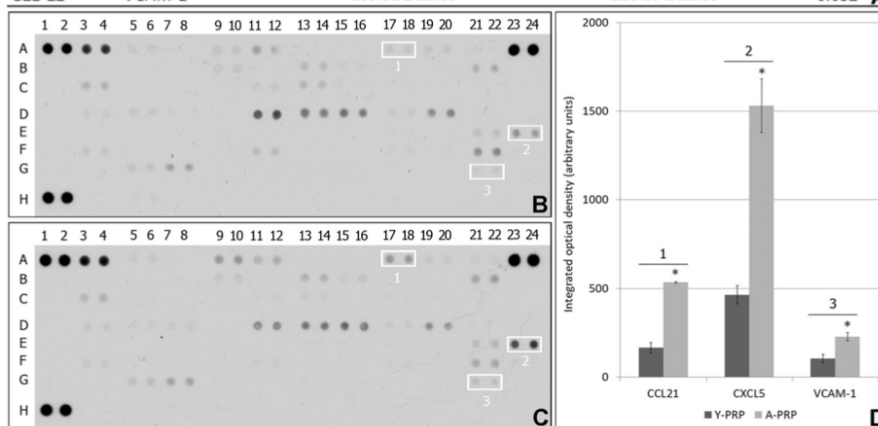
4.1.1. Caracterización del PRP

No hubo diferencias celulares significativas entre el PRP del grupo de donantes jóvenes (Y-PRP) y de edad avanzada (A-PRP). Ambos PRP no tenían eritrocitos (Y-PRP: $0,02 \times 10^6 \pm 0,01$ cels/ μ L; A-PRP: $0,02 \times 10^6 \pm 0,01$ cels/ μ L), leucocitos por debajo del valor basal (Y-PRP: $0,11 \times 10^3 \pm 0,11$ cell/ μ L; A-PRP: $0,05 \times 10^3 \pm 0,04$ cels/ μ L), y el enriquecimiento promedio en plaquetas fue de 1 a 1.5 veces la concentración de plaquetas en comparación con la sangre (Y-PRP: $979,0 \times 10^3 \pm 253,14$ cels/ μ L; A-PRP: $11\,149,00 \times 10^3 \pm 431,34$ cels/ μ L). Según el sistema de clasificación PAW, el PRP utilizado en este estudio fue P1-x-B β . En cuanto a la composición molecular: se detectaron 35 moléculas de las cuales el ligando 21 de la quimiocina CC (CCL21), CSCL5 y VCAM-1 fueron significativamente más altas en el PRP de donantes de edad avanzada ($P < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8.

Análisis molecular del PRP de donantes jóvenes (Y-PRP) y donantes de edad avanzada (A-PRP). **A**, Lista de moléculas detectadas en el análisis. **B**, Matriz de citoquinas del grupo Y-PRP. **C**, Matriz de citoquinas del grupo A-PRP. **D**, Moléculas que presentan un incremento significativo en el A-PRP respecto al Y-PRP

Coordinate	Analyte	Y-PRP Group (mean ± sd)	A-PRP Group (mean ± sd)	<i>p</i> value
A03-04	Adiponectin	2048.66 ± 115.41	2560.14 ± 187.24	0.081
A05-06	CCL2	99.36 ± 37.42	104.64 ± 13.77	0.875
A09-10	CCL5	181.67 ± 17.26	464.54 ± 154.21	0.124
A11-12	CCL11	420.65 ± 24.06	297.97 ± 52.37	0.094
A17-18	CCL21	164.42 ± 29.76	534.01 ± 4.77	0.003*
A19-20	CCL22	152.64 ± 23.13	98.53 ± 25.94	0.161
A21-22	Clusterin	61.19 ± 33.90	115.37 ± 16.06	0.177
B09-10	CXCL7	158.76 ± 75.17	145.53 ± 32.63	0.838
B11-12	CCN1	18.11 ± 25.61	36.79 ± 12.91	0.445
B13-14	Cystatin C	224.97 ± 84.98	278.34 ± 3.99	0.467
B15-16	DPPIV	97.77 ± 32.47	118.74 ± 2.02	0.468
B21-22	Endostatin	307.37 ± 69.24	460.88 ± 32.40	0.105
C03-04	Fetuin A	236.42 ± 35.92	359.45 ± 61.04	0.135
C11-12	Fibulin 3	88.58 ± 50.50	93.87 ± 54.37	0.933
C13-14	Flt-3 Ligand	210.33 ± 74.98	100.33 ± 6.67	0.176
D03-04	Hepassocin	51.51 ± 72.85	114.18 ± 1.31	0.349
D05-06	HGF	93.75 ± 48.96	90.97 ± 2.10	0.939
D07-08	ICAM-1	18.33 ± 25.92	89.46 ± 51.87	0.225
D11-12	IGF-I	1170.88 ± 430.14	848.54 ± 182.50	0.432
D13-14	IGFBP-2	791.28 ± 274.22	793.19 ± 61.62	0.991
D15-16	IGFBP-3	731.09 ± 246.53	991.62 ± 61.02	0.284
D17-18	IGFBP-5	54.44 ± 76.99	110.11 ± 29.49	0.442
D19-20	IGFBP-6	504.17 ± 261.05	675.82 ± 174.66	0.522
E17-18	Jagged 1	18.18 ± 25.71	28.42 ± 40.19	0.785
E21-22	Lipocalin-2	155.65 ± 54.14	367.59 ± 138.22	0.18
E23-24	CXCL5	464.33 ± 50.85	1532.18 ± 151.03	0.011*
F03-04	MMP-2	71.77 ± 39.29	69.56 ± 37.96	0.954
F11-12	CCN3	136.75 ± 90.18	93.9 ± 0.71	0.567
F17-18	Osteopontin	60.8 ± 15.70	102.85 ± 29.02	0.216
F19-20	Osteoprotegerin	46 ± 45.20	54.13 ± 28.75	0.852
F21-22	PDGF-BB	730.47 ± 114.39	505.6 ± 84.87	0.155
F23-24	Pref-1	9.45 ± 13.36	33.38 ± 47.20	0.562
G05-06	RBP4	110.31 ± 55.24	234.5 ± 19.80	0.096
G07-08	Resistin	283.37 ± 176.86	531.19 ± 103.63	0.229
G21-22	VCAM-1	103.92 ± 22.36	226.59 ± 22.58	0.032*



4.1.2. Análisis histológico

Ningún grupo mostró diferencias ($P > 0.05$) en el análisis histológico del cartílago en cuanto a superficie, matriz, distribución celular, viabilidad celular, hueso subcondral y mineralización del cartílago según la puntuación ICRS.

El análisis histológico de las muestras femorales longitudinales reveló diferencias en la diáfisis ósea. Los grupos tratados con PRP mostraron un porcentaje similar de celularidad en la médula ósea, siendo $59,94\% \pm 4,83\%$ en el grupo A-PRP y $60,08\% \pm 7,08\%$ en el grupo Y-PRP. Sin embargo, ambos grupos tratados con PRP sí mostraron mayor celularidad ($P < 0,05$) con respecto al grupo no tratado ($46,98\% \pm 4,79\%$) y al grupo tratado con inyecciones intraóseas de solución salina ($48,83\% \pm 6,88\%$) (**Figura 9**).

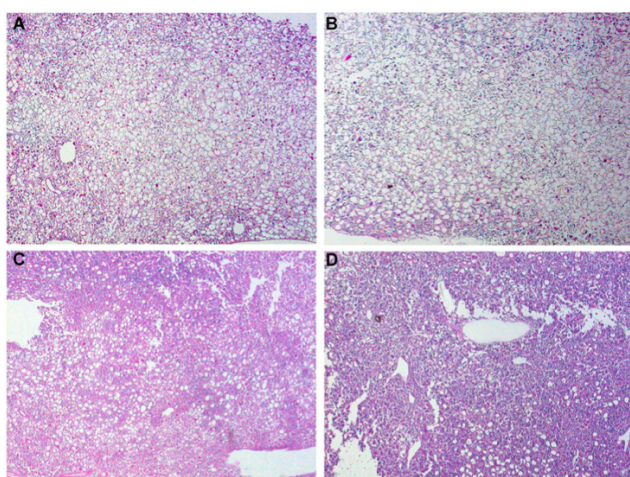
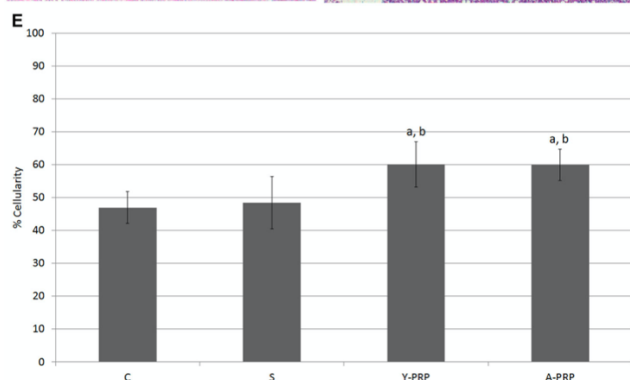


Figura 9. Análisis histológico de la MO del fémur **A**, Grupo control. **B**, Grupo salino. **C**, Grupo Y-PRP. **D**, Grupo A-PRP. **E**, Celularidad (%). **a**, $p < 0,05$ respecto al grupo C. **b**, $p < 0,05$ respecto al grupo S.



En cuanto a las muestras de vasto lateral, los grupos tratados con PRP mostraron menos colágeno que el grupo de control tratado con solución salina. De hecho, el grupo Y-PRP tuvo el porcentaje más bajo de colágeno ($5,65 \% \pm 4,00 \%$) en comparación con el grupo A-PRP ($7,69 \% \pm 3,90 \%$), así como los dos grupos de control ($10,58 \% \pm 5,58 \%$ para solución salina y $10,19\% \pm 6,78\%$ para el grupo no tratado) (**Figura 10**).

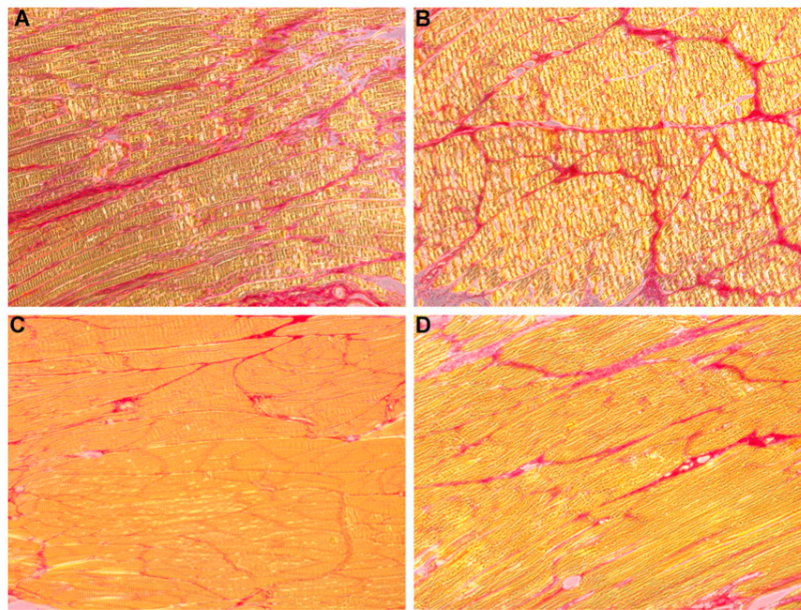
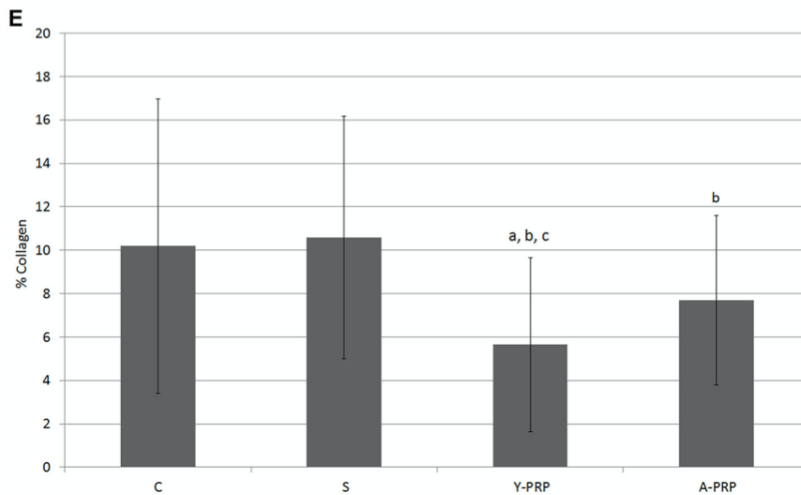


Figura 10. Análisis histológico del vasto lateral **A**, Grupo control. **B**, Grupo salino. **C**, Grupo Y-PRP. **D**, Grupo A-PRP. **E**, Niveles de colágeno (%). **a**, $p < 0,05$ respecto al grupo C. **b**, $p < 0,05$ respecto al grupo S. **c**, $p < 0,05$ respecto al grupo A-PRP



4.1.3. Análisis micro-CT

En cuanto al hueso cortical, no se encontraron diferencias entre ningún grupo en volumen e intensidad en ninguna de las regiones analizadas ($p > 0,05$). Cuando se analizó el hueso trabecular, el grupo tratado con PRP de donantes jóvenes (grupo Y-PRP) presentó menor espacio entre las trabéculas ($P < 0.05$) y mayor densidad trabecular ($P < 0.05$) en la metáfisis distal. Además, el grupo Y-PRP también mostró un mayor porcentaje de ocupación trabecular ($p < 0,05$) tanto en la metáfisis distal como en la epífisis distal. Se observó un mayor volumen de la placa subcondral del cóndilo femoral ($P < 0,05$) en el grupo Y-PRP (**Tabla 1, Figura 11**).

Tabla 1. Valores de micro-CT

	C group (mean \pm sd)	S group (mean \pm sd)	Y-PRP group (mean \pm sd)	A-PRP group (mean \pm sd)	P value
Diaphysis					
CB Vol, mm ³	259.08 \pm 18.19	267.32 \pm 37.09	274.05 \pm 38.40	294.73 \pm 17.01	.266
CB Int	58.57 \pm 4.51	193.47 \pm 4.34	191.89 \pm 5.33	194.39 \pm 3.18	.496
Distal metaphysis					
CB Vol, mm ³	58.57 \pm 6.34	54.01 \pm 10.94	55.94 \pm 10.49	62.99 \pm 14.91	.575
CB Int	175.70 \pm 3.96	173.16 \pm 5.00	169.39 \pm 5.06	174.45 \pm 2.52	.132
TB Vol, mm ³	14.43 \pm 1.99	14.67 \pm 3.26	18.26 \pm 3.69	16.99 \pm 3.8	.181
TB occup (%)	18.29 \pm 1.45	18.97 \pm 3.27	25.26 \pm 3.55 ^{a,b}	22.01 \pm 3.79	.006
TB Th Mean, mm	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	.721
TB Th Max, mm	0.43 \pm 0.06	0.45 \pm 0.09	0.48 \pm 0.04	0.46 \pm 0.11	.745
TB Sp Mean, mm	0.98 \pm 0.10	0.82 \pm 0.09	0.65 \pm 0.12 ^{a,b}	0.80 \pm 0.25	.018
TB Sp Max, mm	2.35 \pm 0.37	1.90 \pm 0.29	1.74 \pm 0.33	1.93 \pm 0.53	.086
Density, kg/mm ³	0.82 \pm 0.23	1.07 \pm 0.33	1.43 \pm 0.30 ^c	1.16 \pm 0.43	.044
Distal epiphysis					
TB Vol, mm ³	59.71 \pm 4.44	68.21 \pm 13.79	60.10 \pm 6.92	61.95 \pm 7.08	.361
TB occup (%)	65.97 \pm 1.70	66.43 \pm 4.46	71.79 \pm 3.1 ^a	67.92 \pm 3.45	.043
TB Th Mean, mm	0.36 \pm 0.02	0.37 \pm 0.06	0.39 \pm 0.04	0.39 \pm 0.03	.499
TB Th Max, mm	0.89 \pm 0.11	0.96 \pm 0.13	0.99 \pm 0.13	0.94 \pm 0.08	.561
TB Sp Mean, mm	0.66 \pm 0.04	0.69 \pm 0.08	0.66 \pm 0.05	0.70 \pm 0.08	.694
TB Sp Max, mm	1.69 \pm 0.15	1.74 \pm 0.17	1.70 \pm 0.23	1.80 \pm 0.2	.747
Density, kg/mm ³	1.69 \pm 0.40	1.58 \pm 0.34	1.72 \pm 0.61	1.37 \pm 0.15	.510
Subcondral plate					
Vol, mm ³	0.68 \pm 0.16	0.75 \pm 0.25	1.28 \pm 0.29 ^{a,b,c}	0.68 \pm 0.31	.003

Abbreviations: A-PRP, aged PRP; C, control; CB Int, cortical bone intensity; CB Vol, cortical bone volume; PRP, platelet-rich plasma; S, saline; TB occup, trabecular bone occupation; TB Sp Max, trabecular bone maximum space; TB Sp Mean, trabecular bone mean space; TB Th Max, trabecular bone maximum thickness; TB Th Mean, trabecular bone mean thickness; TB Vol, trabecular bone volume; Vol, volume; Y-PRP, young PRP.

^a $P < .05$ with regard to C group.

^b $P < .05$ with regard to S group.

^c $P < .05$ with regard to the A-PRP group.

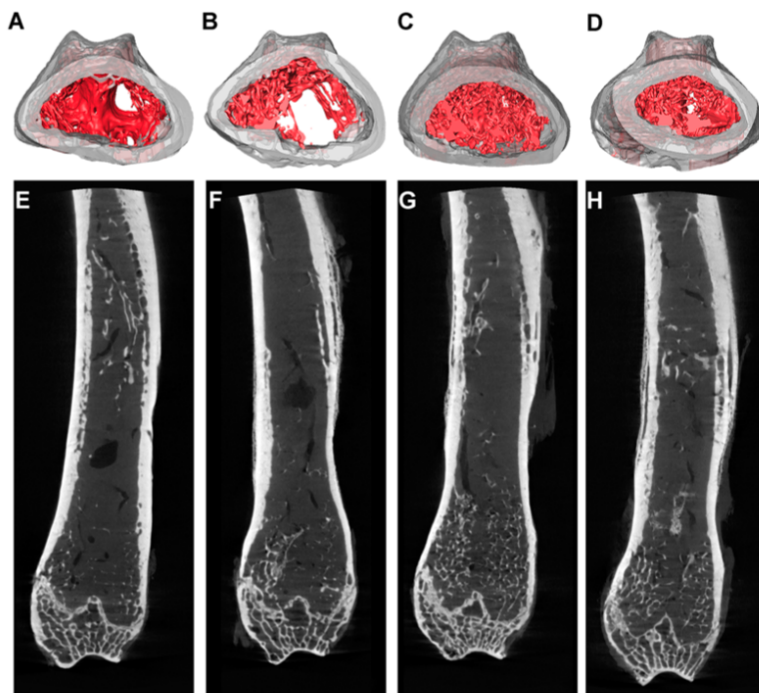


Figura 11.
 Imágenes 3D de la metáfisis femoral **A**, Grupo control. **B**, Grupo salino. **C**, Grupo Y-PRP. **D**, Grupo A-PRP.
 Imágenes de micro-CT del fémur del grupo control (**E**), grupo salino (**F**), grupo Y-PRP (**G**) y grupo A-PRP (**H**)

4.2. Estudio 2: Efectos del plasma rico en plaquetas en las poblaciones celulares del sistema nervioso central: la influencia de la edad en el donante.

4.2.1. Caracterización del PRP: medición de factores de crecimiento y citoquinas

La edad media del PRP de donantes de edad avanzada y del PRP de donantes jóvenes fue de $73,71 \pm 5,00$ y $22,13 \pm 1,81$ años, respectivamente.

De acuerdo con el último sistema de codificación y requisitos mínimos de información para los estudios de PRP, el tipo de PRP utilizado en este estudio fue 12-00-11 y las características de ambos PRP se informan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de ambos PRP

	Aged PRP	Young PRP
1. PRP Preparation		
Initial blood volume	81 mL per subject (9 mL per tube)	81 mL per subject (9 mL per tube)
Anticoagulant	Sodium citrate 3.8% (wt/V)	Sodium citrate 3.8% (wt/V)
System	Close	Close
Centrifugation	Yes	Yes
<i>number</i>	1	1
<i>Speed</i>	580 g—8 min	580 g—8 min
Final PRP volume	18 mL per subject	18 mL per subject
2. PRP Characteristics		
PRP Type	12-00-11	12-00-11
MPV	10.4 ± 0.5 fL	9.6 ± 0.5 fL
Red Blood Cells	<0.01 × 10 ⁶ /μL	<0.01 × 10 ⁶ /μL
White Blood Cells	<0.05 × 10 ⁶ /μL	<0.05 × 10 ⁶ /μL
<i>Neutrophils</i>	—	—
<i>Lymphocytes</i>	—	—
<i>Monocytes</i>	—	—
<i>Eosinophils</i>	—	—
<i>Basophils</i>	—	—
Activation	CaCl ₂ (10% wt/vol)	CaCl ₂ (10% wt/vol)
3. Application Characteristics		
Dose	2%	2%
Direct/Indirect	Direct	Direct
Cell line	CNS cells	CNS cells
4. Other Remarkable PRP and Study Features		
The product added to the cell cultures was the platelet lysate obtained after activation of PRP with calcium chloride (10%)		

El PRP empleado para elaborar ambos pools (de donante de edad avanzada y joven) no contenía leucocitos, y no hubo diferencias significativas en el número de plaquetas.

Sin embargo, tras el análisis del contenido de citoquinas y factores de crecimiento, se detectaron algunas diferencias entre los PRP: el grupo de PRP de donantes jóvenes presentó mayores niveles de factor de diferenciación de crecimiento 11 (Growth Differentiation Factor 11, GDF-11) (sólo detectado en plasma de donante joven), factor de crecimiento insulínico (IGF) ($p < 0,001$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ($p = 0,016$) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) ($p = 0,025$). El grupo de PRP de donante

de edad avanzada mostró niveles más altos de quimiocina 11 con motivo C-C (CCL-11) ($p = 0,022$) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ($p = 0,001$). Además, el PRP de donantes de edad avanzada tenía un perfil más inflamatorio, con niveles más altos de citoquinas proinflamatorias que el PRP de donantes jóvenes (Tabla 3 y 4, Figura 12).

Tabla 3. Concentración de factores de crecimiento y citoquinas en ambos PRP

Growth Factors and Cytokines	Aged PRP Mean \pm S.D. (pg/mL)	Young PRP Mean \pm S.D. (pg/mL)	<i>p</i>
CCL-11	72.51 \pm 19.00	46.75 \pm 13.56	0.022 *
GDF-11	0	169.04 \pm 6.25	<0.001 ***
G-CSF	209.91 \pm 88.92	143.82 \pm 69.10	0.181
HGF	1101.45 \pm 44.09	699.33 \pm 5.66	0.001 **
IGF	53,036.72 \pm 9254.97	106,320.62 \pm 10,470.11	<0.001 ***
PDGF	2834.75 \pm 427.59	3908.59 \pm 705.04	0.016 *
TGF- β	34,732.53 \pm 3657.98	42,332.98 \pm 4958.67	0.025 *
TNF- α	17.55 \pm 0.98	18.10 \pm 1.75	0.600

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tabla 4. Valores de citoquinas

Number	Coordinate	Analyte	Aged PRP Group (Mean \pm S.D.) (IOD)	Young PRP Group (Mean \pm S.D.) (IOD)	<i>p</i> Value	Number	Coordinate	Analyte	Aged PRP Group (Mean \pm S.D.) (IOD)	Young PRP Group (Mean \pm S.D.) (IOD)	<i>p</i> Value
1	A3, A4	Adiponectin	3989.26 \pm 304.47	4154.84 \pm 80.55	0.333	27	E3, E4	IL-5	364.37 \pm 230.30	286.47 \pm 77.85	0.545
2	A5, A6	Apolipoprotein A-1	4524.69 \pm 269.84	4493.79 \pm 272.99	0.877	28	E23, E24	IL-18 Bpa	3335.77 \pm 73.21	2785.41 \pm 499.27	0.064
3	A7, A8	Angiogenin	4835.93 \pm 61.23	4682.65 \pm 364.25	0.438	29	G1, G2	Leptin	1832.24 \pm 397.51	468.69 \pm 3.88	<0.001 *
4	A9, A10	Angiopoietin-1	1705.54 \pm 134.90	995.56 \pm 128.65	<0.001 *	30	G5, G6	Lipocalin-2	3055.21 \pm 136.35	1501.53 \pm 60.29	<0.001 *
5	A11, A12	Angiopoietin-2	397.67 \pm 46.55	203.83 \pm 81.25	0.006 *	31	G15, G14	MPF	752.34 \pm 36.06	344.14 \pm 52.74	<0.001 *
6	A13, A14	DAIF	1199.89 \pm 75.92	833.94 \pm 289.97	0.050	32	G21, G22	MIP-3 β	239.42 \pm 93.85	81.19 \pm 37.61	0.020 *
7	A17, A18	C5/C5a	2596.91 \pm 336.86	1945.71 \pm 203.49	0.016 *	33	G23, G24	MMP-9	1409.28 \pm 229.17	871.01 \pm 102.66	0.005 *
8	A19, A20	CD14	1803.53 \pm 217.21	1471.18 \pm 329.11	0.142	34	H1, H2	Myeloperoxidase	439.91 \pm 177.34	322.67 \pm 45.61	0.247
9	A21, A22	CD30	124.93 \pm 37.07	101.39 \pm 118.70	0.718	35	H3, H4	Osteopontin	2872.29 \pm 534.43	3260.3 \pm 129.74	0.088
10	B3, B4	CD40 ligand	585.14 \pm 117.44	735.12 \pm 44.84	0.054	36	H9, H10	Pentraxin 3	407.46 \pm 93.16	293.89 \pm 69.21	0.098
11	B5, B6	Chitinase 3-like 1	3953.46 \pm 211.37	3015.32 \pm 54.49	<0.001 *	37	H11, H12	PF4	3927.03 \pm 350.75	3697.05 \pm 114.58	0.263
12	B7, B8	Complement Factor D	2556.74 \pm 118.44	2444.56 \pm 105.74	0.207	38	H15, H16	RANTES	2685.81 \pm 85.30	2257.70 \pm 98.68	0.001 *
13	B9, B10	C-Reactive Protein	4920.45 \pm 152.84	4531.85 \pm 273.50	0.047 *	39	H17, H18	RBP-4	4169.65 \pm 662.79	3547.42 \pm 242.99	0.128
14	B11, B12	Cripto-1	2199.56 \pm 296.10	1683.65 \pm 108.46	0.016 *	40	H21, H22	Resistin	1452.82 \pm 110.10	781.19 \pm 43.31	<0.001 *
15	B15, B16	Dkk-1	369.85 \pm 32.40	259.23 \pm 104.68	0.090	41	H23, H24	SDF-1 α	540.59 \pm 146.77	252.61 \pm 35.56	0.008 *
16	B17, B18	DPPIV	4820.59 \pm 337.84	4297.65 \pm 253.27	0.047 *	42	I1, I2	Serpin E1	5621.19 \pm 241.19	5263.41 \pm 297.57	0.110
17	B21, B22	Emmprin	1067.68 \pm 137.51	622.89 \pm 376.77	0.088	43	I3, I4	SFBG	4753.72 \pm 249.73	4513.15 \pm 206.17	0.184
18	C3, C4	ENA-78	2057.37 \pm 66.20	2209.68 \pm 150.08	0.112	44	I5, I6	ST2	1107.68 \pm 81.92	746.5 \pm 144.46	0.004 *
19	C5, C6	Endoglin	3398.28 \pm 152.91	3700.11 \pm 98.83	0.016 *	45	I7, I8	TARC	905.01 \pm 42.82	603.39 \pm 169.32	0.013 *
20	C13, C14	FGF-19	305.75 \pm 42.74	142.15 \pm 29.98	<0.001 *	46	I9, I10	TFP3	1112.75 \pm 73.10	1314.63 \pm 179.57	0.082
21	C15, C16	Flt-3 Ligand	139.46 \pm 42.29	54.35 \pm 8.87	0.007 *	47	I11, I12	TR	852.16 \pm 73.98	571.47 \pm 85.82	0.002 *
22	C19, C20	GDF-15	1166.25 \pm 133.84	230.15 \pm 153.84	<0.001 *	48	I15, I16	Thrombospondin1	2055.38 \pm 123.63	1473.03 \pm 297.34	0.025 *
23	D3, D4	Growth Hormone	652.69 \pm 130.68	1380.33 \pm 187.64	<0.001 *	49	I19, I20	uPAR	700.47 \pm 33.23	189.58 \pm 56.00	0.001 *
24	D7, D8	ICAM-1	978.59 \pm 193.86	733.12 \pm 160.05	0.098	50	J7, J8	CD31	3444.59 \pm 256.88	3132.6 \pm 49.38	0.054
25	D11, D12	IGFBP-2	3227.19 \pm 71.56	2700.56 \pm 82.07	<0.001 *	51	J9, J10	TIM-3	2973.56 \pm 122.94	2075.5 \pm 114.34	<0.001 *
26	D13, D14	IGFBP-3	1146.28 \pm 155.31	640.54 \pm 138.50	0.002 *	52	J11, J12	VCAM-1	4394.29 \pm 100.97	4041.8 \pm 116.81	0.03

* $p < 0.05$.

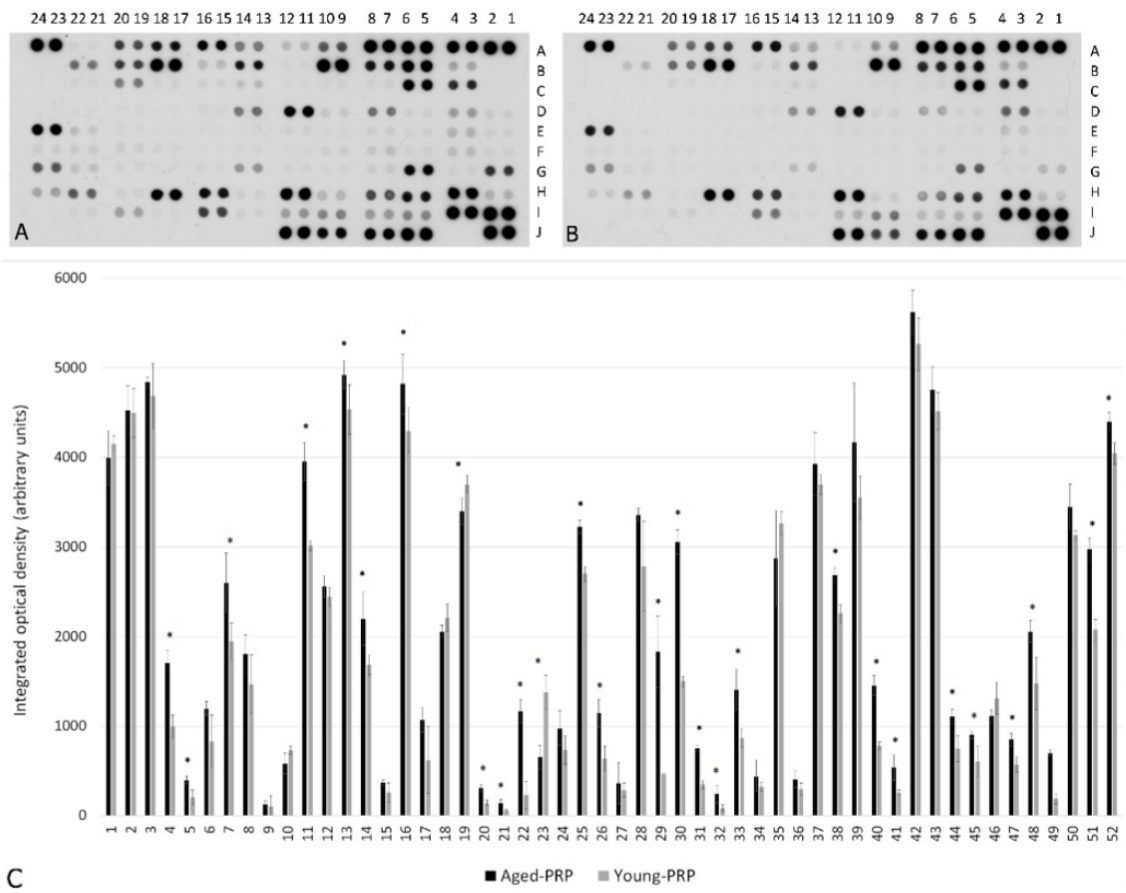


Figura 12.

Análisis molecular del Y-PRP y A-PRP

A, Matriz de citoquinas del A-PRP. **B**, Matriz de citoquinas del Y-PRP. **C**, Niveles de moléculas del A-PRP respecto a Y-PRP.

4.2.2. Efecto de PRP en la incorporación de BrdU en progenitores NT2

La incorporación de BrdU se analizó en células progenitoras NT2 privadas de suero después de la estimulación durante 24 h con FBS (2 % o 10 %) o PRP (2 % de PRP de donante de edad avanzada o 2 % de PRP de donante joven). Como se predijo, se objetivó un aumento significativo en el índice de incorporación de BrdU ($p < 0.001$, ANOVA unidireccional y prueba post hoc de Bonferroni) en todas las condiciones de estimulación en comparación con células no estimuladas (mantenidas en DMEM sin suero). La estimulación con PRP de

donante de edad avanzada al 2% dio como resultado un aumento significativo en el índice de incorporación de BrdU, en comparación con las células estimuladas con FBS al 2% o PRP de donante joven al 2%. Además, el PRP de donante de edad avanzada al 2% condujo a un mayor índice de incorporación de BrdU en comparación con FBS al 10%, lo que indica que el PRP de donante de edad avanzada aumenta actividad mitótica en progenitores NT2.

4.2.3. Efecto del PRP sobre la supervivencia celular y la morfología de las células NT2 AraC-diferenciadas

Las células NT2 AraC-diferenciadas se trataron con PRP de donante de edad avanzada y PRP de donante joven durante 72 h. El análisis de la densidad celular mostró que cualquiera de los tratamientos condujo a una disminución en el porcentaje de células neuronales, lo que se debió a un aumento en la supervivencia celular de la población no neuronal, manteniéndose sin cambios la densidad de células neuronales NT2N. Con respecto a la morfología neuronal, el tratamiento con PRP de donante de edad avanzada, no con PRP de donante joven, produjo una disminución en el área media del núcleo celular. Un análisis separado de las poblaciones NT2N y no neuronales mostró que este cambio se produjo principalmente en células no neuronales. No se encontraron diferencias entre las células NT2N no tratadas y las tratadas con PRP en términos del número de neuritas por célula o la longitud total del árbol neurítico, a pesar de la ligera disminución en el número promedio de neuritas después del tratamiento con PRP de donante joven (FBS, 2.28 ± 0.12 SEM, $n = 112$; PRP de donante de edad avanzada, 2.21 ± 0.14 SEM, $n = 112$; PRP de donante joven, 2.07 ± 0.12 , $n = 118$) y en la longitud total del árbol neurítico después del tratamiento con PRP de donante de edad avanzada o PRP de donante joven (FBS, $139.8 \mu\text{m} \pm 8.5$ SEM, $n = 112$; PRP de donante de edad avanzada, $127.4 \mu\text{m} \pm 7.4$ SEM, $n = 112$; PRP de donante joven, $127.2 \mu\text{m} \pm 6.7$, $n = 118$).

4.2.4. Efecto del PRP sobre la toxicidad y la cuantificación de marcadores pre y postsinápticos

Para analizar la toxicidad provocada por los dos PRPs, poblaciones neuronales primarias de cortezas de ratas E16-18 se cultivaron en ambas condiciones y se midió la viabilidad celular. Tanto los tratamientos de PRP de donante de edad avanzada como joven no mostraron ninguna toxicidad significativa o proporciones de dilución superiores a 1:20. Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de mantener similitud en líneas de células progenitoras, los siguientes ensayos se llevaron a cabo con PRP al 2% de donante de edad avanzada y joven.

Una vez establecida la concentración de los PRPs, se cuantificó tanto la expresión de proteínas sinápticas como el número de puntos sinápticos para evaluar el efecto de los PRP en las sinapsis. En primer lugar, la expresión del marcador presináptico Sinaptofisina y el marcador postsináptico PSD-95 se cuantificó en lisados de células enteras por Western blot. La sinaptofisina es una proteína presináptica involucrada en el reciclaje de las vesículas sinápticas y la PSD-95 es una proteína de densidad postsináptica. Este análisis reveló que el PRP no modificó los niveles globales de esos marcadores. Para un análisis más detallado, se cuantificó la expresión de marcadores tanto presinápticos como postsinápticos a nivel neurítico por inmunofluorescencia. Para este análisis, además del marcador presináptico Sinaptofisina, se utilizó el marcador postsináptico Homer en lugar de PSD-95. Homer, al igual que PSD-95, es una proteína de andamiaje de densidad postsináptica y está involucrada en la estabilidad de las espinas. Aunque no hay diferencias significativas en la intensidad de la sinaptofisina y el marcador postsináptico Homer en presencia del PRP de donante de edad avanzada y joven, la expresión de Homer mostró una tendencia al aumento.

Por lo tanto, decidimos evaluar si esta tendencia podría tener efecto sobre el número de puntos sinápticos en presencia de PRP. Para este análisis se utilizaron Sinaptofisina y Homer. Curiosamente, la cuantificación de los puntos

pre- y postsinápticos, reveló una tendencia de aumento en los puntos sinápticos representados por la colocación de Sinaptofisina y Homer. Además, se observó un aumento significativo de los puntos postsinápticos positivos para Homer.

4.2.5. Efecto del PRP sobre la inflamación de la microglía

El efecto de los dos PRP sobre la inflamación se probó en cultivos celulares primarios de la microglía de las cortezas de rata P0-2. Las células se activaron con lipopolisacárido (LPS) e interferón-gamma (IFN- γ) para causar inflamación y el efecto de ambos PRP se comparó a diferentes diluciones. Analizamos la expresión de un marcador proinflamatorio, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y la expresión de un marcador antiinflamatorio, el receptor de manosa (MNR). Ambos PRP tenían un potente efecto antiinflamatorio, ya que la dosis más baja (0,1%) inhibió significativamente la expresión de iNOS. Sin embargo, no hubo diferencias en el efecto inhibitorio de ambos PRP sobre la expresión del marcador proinflamatorio iNOS. Además, la incubación de las células con PRP de donante joven, pero no con PRP de donante de edad avanzada, aumentó la expresión del marcador antiinflamatorio MNR.

4.3. Estudio 3: Tratamiento de la artrosis grave de rodilla mediante la combinación de infiltraciones intraóseas e intraarticulares de plasma rico en plaquetas.

4.3.1. Grupo IA

El porcentaje de pacientes que mostró una reducción del dolor de al menos 10 puntos (MMCI) desde el inicio hasta los 2 y 6 meses de seguimiento, fue del 43,3% (13 de 30 pacientes) y del 26,7% (8 de 30 pacientes), respectivamente. Este grupo no presentó mejoría significativa del dolor a los 2 y

6 meses, de acuerdo con las escalas de KOOS, WOMAC y VAS. Tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de subescalas del cuestionario KOOS y WOMAC durante el seguimiento (**Tabla 5**).

Tabla 5. Evolución de los pacientes del grupo IA

	Baseline	2 Months		6 Months		12 Months	
	Score	Score	P	Score	P	Score	P
KOOS Pain	53.2 ± 14.8	58.3 ± 16.5	0.053	56.0 ± 19.0	0.335	53.2 ± 21.7	0.973
KOOS Symptoms	66.3 ± 20.8	69.2 ± 22.0	0.395	62.1 ± 21.3	0.311	63.0 ± 22.4	0.323
KOOS ADL	51.3 ± 14.5	55.8 ± 17.2	0.261	54.3 ± 20.7	0.376	51.7 ± 17.0	0.899
KOOS Sport/Rec	22.0 ± 25.6	18.5 ± 18.7	0.541	20.7 ± 17.3	0.843	19.0 ± 20.1	0.475
KOOS QOL	26.7 ± 18.1	31.3 ± 16.5	0.153	31.3 ± 18.1	0.170	29.2 ± 17.8	0.501
WOMAC Pain	8.8 ± 3.2	7.8 ± 3.3	0.062	7.9 ± 3.4	0.114	9.1 ± 4.1	0.612
WOMAC Stiffness	3.4 ± 2.04	3.3 ± 2.0	0.823	3.7 ± 1.7	0.291	3.7 ± 2.1	0.333
WOMAC Function	33.5 ± 11.8	30.0 ± 11.7	0.072	31.1 ± 13.4	0.288	33.9 ± 14.9	0.834
VAS	4.7 ± 1.60	4.2 ± 1.6	0.166	4.3 ± 1.8	0.271	5.0 ± 2.1	0.343

KOOS = Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score; ADL = activities of daily living; Sport/Rec = function in sport and recreation; QOL = knee-related quality of life; WOMAC = Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index; VAS = visual analogue scale.

^aIA group: intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma.

Antes de los 12 meses de seguimiento, 10 pacientes abandonaron el estudio, 8 de los cuales no respondieron al tratamiento y fueron sometidos a otros procedimientos (26,7% de los 30 pacientes). Los 2 pacientes restantes que no fueron monitorizados en los primeros 12 meses, no fueron localizados. A los 12 meses, el 16,7% de los pacientes (5 de 30 pacientes) del grupo IA presentaron una reducción del dolor basal de al menos 10 puntos (MMCI). En este momento, los pacientes tampoco presentaron mejoría estadísticamente significativa en el resto de parámetros.

4.3.2. Grupo IO

El porcentaje de pacientes que mostró una reducción del dolor de al menos 10 puntos (MMCI) en la subescala del dolor KOOS desde el inicio hasta los 2 y 6 meses de seguimiento, fue del 56,6% (17 de 30) y del 53,3% (16 de 30), respectivamente. A diferencia del grupo IA, el grupo IO presentó mejoría estadísticamente significativa ($p < 0,005$) del dolor a los 2 y 6 meses, de acuerdo a las escalas de KOOS, WOMAC y escala visual analógica (Visual Analog Scale,

VAS). Además, presentaron mejoría estadísticamente significativa en el resto de variable del cuestionario KOOS y WOMAC, salvo en la rigidez a los 2 meses (Tabla 6).

Tabla 6. Evolución de los pacientes del grupo IO

	Baseline	2 Months		6 Months		12 Months	
	Score	Score	P	Score	P	Score	P
KOOS Pain	56.7 ± 15.2	67.6 ± 13.8	<0.001*	69.1 ± 17.4	<0.001*	67.7 ± 17.2	<0.001*
KOOS Symptoms	62.5 ± 16.1	69.2 ± 15.8	0.014*	72.5 ± 18.3	0.006*	72.1 ± 17.5	0.002*
KOOS ADL	61.5 ± 17.2	71.1 ± 19.5	0.002*	73.3 ± 17.5	0.003*	71.2 ± 16.1	0.001*
KOOS Sport/Rec	23.2 ± 20.2	30.2 ± 20.8	0.019*	37.2 ± 25.1	0.017*	28.5 ± 22.1	0.032*
KOOS QOL	30.4 ± 15.8	41.0 ± 19.0	0.001*	42.7 ± 20.3	0.001*	37.5 ± 16.0	0.004*
WOMAC Pain	7.7 ± 3.3	5.7 ± 2.8	0.001*	5.3 ± 3.3	0.001*	5.2 ± 2.9	<0.001*
WOMAC Stiffness	3.1 ± 1.7	3.3 ± 2.0	0.271	2.1 ± 1.7	0.010*	2.4 ± 1.5	0.010*
WOMAC Function	26.5 ± 11.9	19.6 ± 13.3	<0.001*	17.7 ± 11.5	0.001*	19.9 ± 11.4	0.001*
VAS	4.1 ± 1.6	3.2 ± 1.5	0.004*	2.9 ± 1.6	0.001*	3.0 ± 1.6	0.001*

KOOS = Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score; ADL = activities of daily living; Sport/Rec = function in sport and recreation; QOL = knee-related quality of life; WOMAC = Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index; VAS = visual analogue scale.

^aIO group: intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma.

*P < 0.05 with regard to baseline.

En el grupo IO, 11 pacientes se retiraron antes de los 12 meses de seguimiento, 5 de los cuales no respondieron y fueron sometidos a otras intervenciones (16,6% de 30 pacientes). Otros cuatro pacientes continuaron con la mejoría y no consideraron necesario hacer un seguimiento. Los 2 pacientes restantes, no fueron localizados.

A los 12 meses, el 46,7% de los pacientes obtuvieron una reducción del dolor de al menos 10 puntos (MMCI) desde el inicio (14 de 30 pacientes). En este momento los pacientes mostraron una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el resto de variables de las escalas KOOS, WOMAC y VAS.

4.3.3. Grupo IA vs Grupo IO

Al comparar la respuesta de ambos tratamientos según el porcentaje de pacientes con MMCI en la escala del dolor, se objetivó una mejoría estadísticamente significativa a los 6 meses de seguimiento (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los pacientes con MMCI y diferencia de la mejoría en relación al inicio

	MCII, n (%)				δ (mean \pm SD)			
	IA Group ^a	IO Group ^b	Proportion/Mean Difference (95% CI)	P	IA Group ^a	IO Group ^b	Proportion/Mean Difference (95% CI)	P
Two months after treatment								
KOOS Pain	13 (43.3)	17.0 (56.7)	13.4 (-13.8 to 38.7)	0.303	5.4 \pm 15.5	10.9 \pm 12.0	5.5 (-1.6 to 12.6)	0.130
KOOS Symptoms	11 (36.7)	13.0 (43.0)	6.3 (-20.1 to 31.8)	0.621	3.2 \pm 21.6	6.6 \pm 12.5	3.4 (-5.7 to 12.5)	0.459
KOOS ADL	9 (30.0)	16.0 (53.3)	23.3 (-3.9 to 47.2)	0.069	5.1 \pm 16.8	9.7 \pm 15.5	4.6 (3.7 to 12.9)	0.275
KOOS Sport/Rec	6 (20.0)	13.0 (43.3)	23.3 (-2.7 to 46.1)	0.054	-2.6 \pm 24.3	7.0 \pm 14.7	9.6 (-0.7 to 19.9)	0.069
KOOS QOL	12 (40.0)	16.0 (53.3)	13.3 (-13.9 to 38.5)	0.305	5.2 \pm 18.2	10.6 \pm 14.6	5.4 (-3.1 to 13.9)	0.210
Six months after treatment								
KOOS Pain	8 (26.6)	16.0 (53.3)	26.7 (0.3 to 50.4)	0.037*	2.8 \pm 15.5	12.4 \pm 15.9	9.7 (1.5 to 17.8)	0.021*
KOOS Symptoms	9 (30.0)	17.0 (56.7)	26.7 (-0.6 to 50.2)	0.038*	-4.2 \pm 22.1	9.9 \pm 18.3	14.1 (3.6 to 24.6)	0.009*
KOOS ADL	10 (33.3)	14.0 (46.7)	13.4 (-13.3 to 38.3)	0.293	2.9 \pm 18.2	11.9 \pm 20.3	8.6 (-1.1 to 18.8)	0.081
KOOS Sport/Rec	9 (30.0)	17.0 (56.7)	26.6 (-0.7 to 50.1)	0.039*	-1.3 \pm 22.6	14.0 \pm 28.6	15.3 (2.0 to 28.7)	0.048*
KOOS QOL	12 (40.0)	18.0 (60.0)	20 (-7.4 to 44.5)	0.124	4.6 \pm 17.3	12.3 \pm 17.6	7.7 (-1.3 to 16.7)	0.060
Twelve months after treatment								
KOOS Pain	5 (16.7)	14 (46.7)	30.0 (4.3 to 51.9)	0.013*	-0.1 \pm 14.6	11.1 \pm 14.8	11.2 (3.5 to 18.8)	0.005*
KOOS Symptoms	3 (10)	10 (33.4)	23.4 (0.4 to 44.4)	0.029*	-3.3 \pm 17.9	9.6 \pm 15.2	12.9 (4.3 to 21.4)	0.004*
KOOS ADL	6 (20)	12 (40)	20.0 (-5.4 to 42.9)	0.094	0.4 \pm 13.6	9.7 \pm 14.8	9.4 (1.9 to 16.7)	0.014*
KOOS Sport/Rec	6 (20)	8 (26.1)	6.7 (-16.8 to 29.5)	0.543	-3.0 \pm 22.7	5.4 \pm 13.0	8.4 (-1.2 to 17.9)	0.085
KOOS QOL	8 (26.7)	11 (36.7)	10.0 (-15.5 to 34.2)	0.409	2.5 \pm 20.7	7.1 \pm 12.4	4.6 (-4.1 to 13.2)	0.292

MCII = minimal clinically important improvement; δ = difference in the improvement from baseline; CI = confidence interval; KOOS = Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score; ADL = activities of daily living; Sport/Rec = function in sport and recreation; QOL = knee-related quality of life; WOMAC = Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index; VAS = visual analogue scale.

^aIA group: intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma.

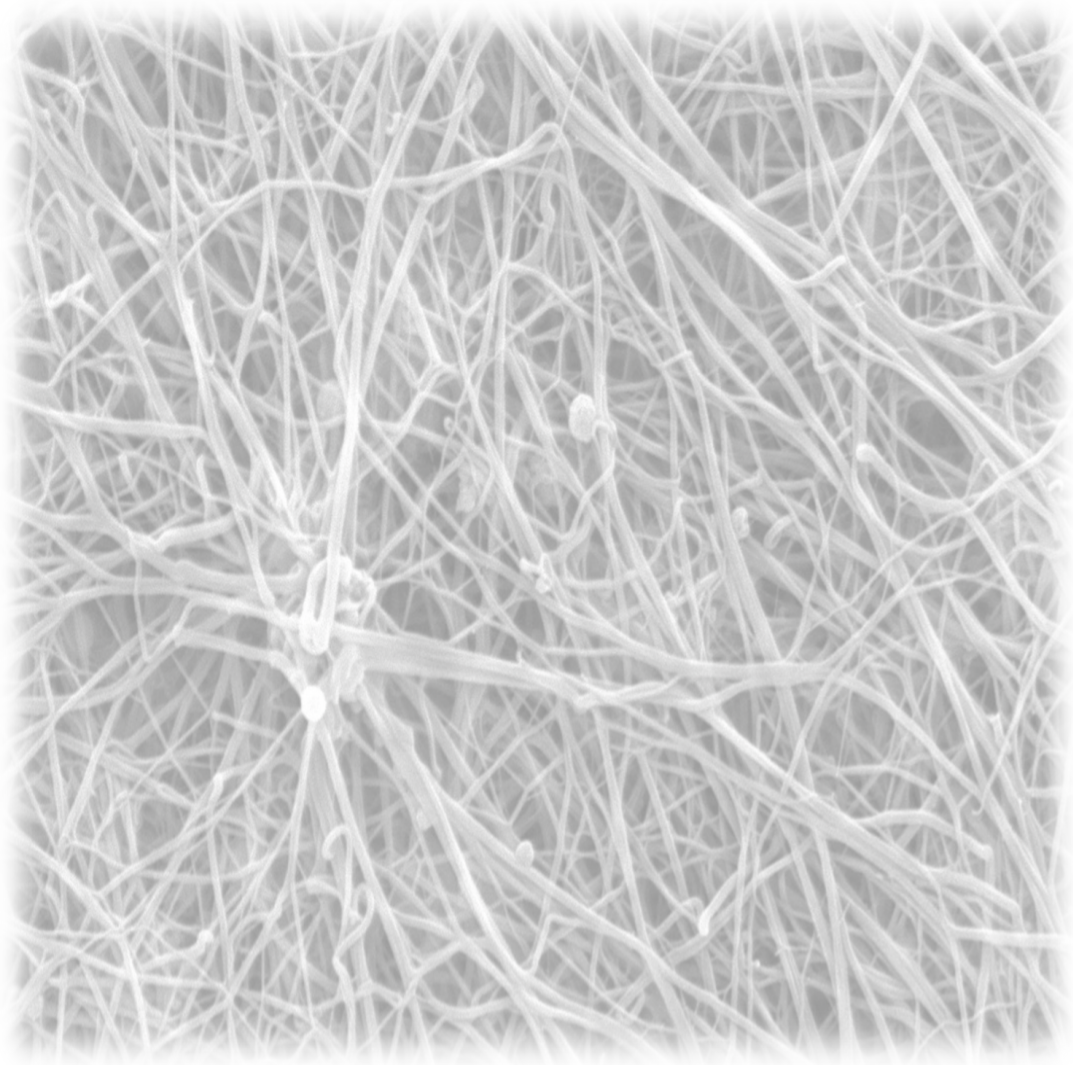
^bIO group: intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma.

* $P < 0.05$ with regard to baseline.

El porcentaje de pacientes que presentaron una MMCI en la reducción del dolor en el grupo IO fue un 26,7% superior al grupo IA (IC 95% -0,4 a 49,9; $p = 0,037$). Esta mejoría significativa se mantuvo a los 12 meses con 30,0 puntos de porcentaje superior a los del grupo IA (IC 95% 4,3 a 51,9; $p = 0,013$). Estas diferencias son consistentes cuando se comparan las puntuaciones desde el inicio hasta los puntos temporales (δ), siendo estadísticamente significativo a los 6 meses ($12,4 \pm 15,9$ vs $2,8 \pm 15,5$; $p = 0,021$) y a los 12 meses ($11,6 \pm 14,8$ vs $-0,1 \pm 14,6$; $p = 0,005$). Esta mejoría no se observó a los 2 meses. En cuanto a los síntomas, la tasa de respuesta fue también 26,7 puntos de porcentaje superior en el grupo IO a los 6 meses (IC 95% -0,6 a 50,2; $p = 0,038$) y 23,4 puntos a los 12 meses (IC 95% 0,4 a 44,4; $p = 0,029$). Así mismo, el grupo IO, en comparación con el grupo IA, presentó una diferencia estadísticamente significativa en la mejoría de síntomas a los 6 meses ($9,9 \pm 18,3$ vs $-4,2 \pm 22,1$; $p = 0,009$) y a los 12 meses ($9,6 \pm 15,2$ vs $-3,3 \pm 17,9$; $p = 0,004$).

No se observaron diferencias entre ambos grupos a los 2 meses de seguimiento.

Los pacientes sometidos a infiltraciones intraóseas de PRP, no presentaron efectos secundarios ni complicaciones durante el procedimiento. Tras la infiltración, refirieron dolor leve de corta duración (24-48 horas), sin presentar otros efectos secundarios.



5. DISCUSIÓN

La artrosis de rodilla es una patología cuyo tratamiento conlleva una gran dificultad, debido tanto a su confusa fisiopatología como a la complejidad de la propia articulación. Esto supone que actualmente la única solución definitiva sea la artroplastia de rodilla, con todos los riesgos e inconvenientes que supone para el paciente. Por eso, la búsqueda de nuevos tratamientos es necesaria para mejorar el arsenal terapéutico actual. En este sentido, el uso del PRP ha supuesto una alternativa muy valiosa a los tratamientos convencionales, ya que actúa sobre diferentes procesos biológicos favoreciendo la recuperación de la homeostasis articular y por consiguiente la reparación tisular. Sin embargo, y debido a que, en la artrosis, los diferentes elementos estructurales de la articulación pueden estar afectados, es necesario desarrollar protocolos de administración que actúen en los diferentes tejidos diana. Teniendo esto en cuenta, se desarrolló el protocolo de infiltración de PRP por vía intraósea mediante el cual, además de los elementos comprendidos en el espacio intraarticular, también se abordaba el hueso subcondral, obteniendo unos primeros resultados clínicos prometedores.¹¹² Sin embargo, se hacía necesaria conocer los mecanismos y efectos por los que esta nueva aplicación actuaba sobre la artrosis de rodilla además de buscar otros condicionantes como la edad del donante a partir del cual se obtiene el PRP.

Como consecuencia, en el primer estudio evaluamos por primera vez el efecto de las infiltraciones intraóseas de dos tipos diferentes de PRP en función de la edad de los donantes, consiguiendo mejores resultados biológicos y estructurales que los dos grupos control. Uno de estos controles recibió infiltraciones salinas para diferenciar los efectos biológicos del PRP de los efectos mecánicos debidos a las inyecciones. Cabe mencionar que, aunque ambos PRP tenían una composición con un número similar de plaquetas y sin leucocitos ni eritrocitos, estos resultados fueron más pronunciados en el grupo tratado con PRP de donantes jóvenes.

Se analizaron histológicamente los efectos producidos tras infiltraciones intraóseas de PRP en tejidos donde razonablemente se podía manifestar la

acción local de esta terapia. Así, en la médula ósea de los fémures donde se administraron directamente los tratamientos, los grupos que recibieron PRP tenían mayor celularidad mientras que ambos grupos control mostraron un aumento en la adipogenicidad. Este proceso natural, en el que el aumento de la adipogénesis de la médula ósea va en detrimento de la celularidad y la masa ósea,¹³⁸ concuerda con nuestro modelo animal envejecido, ya que el grupo control presentaba un número considerable de adipocitos. Sin embargo, los grupos que recibieron tratamiento con PRP tanto de donantes jóvenes como mayores presentaron aproximadamente un 15% menos de adiposidad, lo que sugiere algunos efectos biológicos capaces de ralentizar este proceso de envejecimiento.

Debido a ese aumento de la acumulación de tejido adiposo en la médula ósea se produce una pérdida de hueso que ha sido reportada por varios estudios¹³⁹ y también una disminución del volumen del hueso trabecular.¹⁴⁰ La invasión adiposa de la médula ósea y la consecuente pérdida de hueso se produce bajo condiciones fisiológicas como el envejecimiento normal¹⁴¹ y procesos patológicos como la osteoporosis.¹⁴² De acuerdo con estos hallazgos, el análisis de micro-CT realizado en este estudio mostró una mejor estructura ósea en los grupos tratados con PRP, y significativamente en el grupo tratado con PRP de donantes jóvenes. Aunque estas diferencias no se observaron en el hueso cortical, sí se encontró una mayor ocupación y densidad del hueso trabecular no solo en la metáfisis, que es la zona donde estos cambios suelen ser más relevantes,¹⁴³ sino también en la epífisis. Considerando parámetros como el espacio trabecular, el grosor y la densidad, la mayor ocupación trabecular observada se relaciona con un mayor número de trabéculas en comparación con el grupo control. El envejecimiento también es causa de la disminución del número trabecular, como se demuestra en otros estudios. En un trabajo realizado por Jiménez-Andrade y cols.,¹⁴⁴ las imágenes de micro-CT de la metáfisis distal mostraron una reducción relacionada con la edad en el número trabecular comparando fémures de ratas macho jóvenes, de mediana edad y

viejas. Por lo tanto, nuestros resultados histológicos y de micro-CT sugieren una acción preventiva del PRP en procesos fisiológicos como el envejecimiento.

Otro hallazgo tras el análisis óseo fue un mayor volumen de placa subcondral en el grupo tratado con PRP de donante joven. Varios estudios relacionaron el adelgazamiento de la placa subcondral con el desarrollo temprano de la osteoartrosis.¹⁴⁵ Los autores demostraron que, utilizando diferentes modelos de osteoartrosis, el grosor de la placa subcondral se redujo independientemente de las condiciones de carga y el daño del cartílago, lo que confirma que es un proceso inicial común para el desarrollo de artrosis.^{146,147} Los animales utilizados en el presente trabajo no eran modelos artrósicos, lo que se confirmó con valores elevados en la puntuación ICRS en todos los grupos. No obstante, podría suponer el desarrollo de una artrosis precoz que aún no se ha traducido en daño del cartílago y que va precedida de adelgazamiento del subcondral en todos los grupos excepto en el grupo tratado con PRP de donante joven.

Una de las principales posibles causas de los cambios histológicos y estructurales observados en este trabajo es la inflamación ya sea relacionada con el envejecimiento o con el desarrollo de patologías como la artrosis.^{148,149} Un ambiente inflamatorio en la médula ósea favorece su sustitución por tejido adiposo, y consecuentemente las futuras alteraciones de la microarquitectura ósea. Con el envejecimiento, la acumulación en la médula ósea de especies reactivas de oxígeno promueve la inducción del factor nuclear kappa B (NF- κ B), que es una de las vías mediadoras más importantes en la inflamación.¹⁵⁰ La activación de esta vía provoca la producción de moléculas proinflamatorias que crean un ambiente proinflamatorio y, en consecuencia, una serie de señales moleculares y celulares que favorecen el paso de la osteogénesis a la adipogénesis asociado a la edad.^{151,152} Es precisamente en este proceso donde actúa el PRP ya que su acción antiinflamatoria se lleva a cabo a través de la inhibición de la vía NF- κ B. Yin y cols.¹⁵¹ observaron en un estudio in vitro que la acción terapéutica del PRP sobre las células madre mesenquimales derivadas

de la médula ósea humana radicaba en parte en la supresión de la vía NF- κ B. El efecto del PRP sobre esta vía inflamatoria también se confirmó en un estudio in vivo en el que se evaluó la regeneración del cartílago.¹⁵³ El mecanismo por el que el PRP lleva a cabo su acción inhibidora de la vía NF- κ B está relacionado con factores de crecimiento presentes en ella, tales como como HGF,¹⁵⁴ que se detectó en el análisis molecular de los PRP administrados en el presente trabajo. Por tanto, la administración intraósea de PRP podría modular los procesos inflamatorios presentes en la médula ósea suprimiendo la vía NF- κ B, evitando la adipogénesis y por tanto previniendo cambios en la estructura ósea asociados a la edad u otras patologías.

Cabe señalar que, aunque los grupos tratados con PRP presentaron menor adipogénesis de la médula ósea, la arquitectura ósea fue más favorable en el grupo tratado con PRP de donantes jóvenes. Así mismo, los animales tratados con PRP de donantes jóvenes también mostraron un mayor efecto en la reparación del tejido muscular adyacente al fémur, que se dañó durante las cirugías. Los grupos de PRP mostraron una mejor reparación que los grupos control según la menor presencia de fibrosis en este tejido.¹⁵⁵ Sin embargo, estos hallazgos también mostraron una mejor actividad reparadora del PRP de donantes jóvenes.

La potenciación de los efectos generados en el grupo que recibió PRP de donantes jóvenes podría estar justificada por las diferencias a nivel molecular, ya que la composición celular era similar. En este sentido, la edad del donante podría ser una característica importante debido a las diferencias a nivel molecular que se han observado entre el PRP obtenido de poblaciones jóvenes y de edad avanzada, tal y como han demostrado estudios previos.^{156,157}

De hecho, tras el análisis molecular de ambos PRP y observamos que el PRP de donantes de edad avanzada tenía un perfil más proinflamatorio, mostrando un nivel más alto en algunas citocinas, como CCL21 y CXCL5. Además de su naturaleza proinflamatoria, varios autores informaron que estas dos moléculas también están relacionadas con la osteoclastogénesis, que

también es activada por la vía NF- κ B después de la inducción del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (Receptor activator for nuclear κ B ligand, RANKL) por CXCL5.^{152,153,158,159} Por lo tanto, los niveles más altos de moléculas proinflamatorias y con la estimulación de la resorción ósea puede disminuir el efecto del PRP de los donantes de edad avanzada, aunque aún mantienen sus propiedades antiinflamatorias. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que los PRP ricos en moléculas proinflamatorias mostraron una menor eficacia debido a la activación de la vía NF- κ B.^{151,160}

Para confirmar este efecto antiinflamatorio del PRP y otros procesos celulares, los cuales pueden estar condicionados por la edad del donante, se desarrolló nuestro segundo estudio, en este caso en modelos celulares del SNC. Los hallazgos de este trabajo mostraron diferencias entre el PRP de donantes jóvenes y donantes de edad avanzada sobre los diferentes procesos biológicos observados en cultivos celulares, corroborando también diferencias en la composición molecular.

Los procesos de obtención y tipos de PRP de los dos productos analizados en este trabajo eran idénticos, siendo la única variable la edad de los donantes. Ambos PRP presentaban una composición celular similar, sin diferencias en el número de plaquetas y sin leucocitos ni eritrocitos. Por el contrario, la composición molecular era diferente, con variaciones en factores de crecimiento y en citoquinas, presentando el PRP de donantes de edad avanzada niveles más altos de moléculas inherentes al envejecimiento, la inflamación y las enfermedades crónicas.

Los primeros procesos analizados estaban relacionados con las células progenitoras neuronales; considerando que éste era un paso preliminar necesario para el estudio de las propias neuronas. En primer lugar, la incorporación de BrdU se evaluó en células progenitoras NT2 para evaluar el proceso de proliferación. Sorprendentemente, el tratamiento con PRP de donante de edad avanzada, pero no el PRP de donante joven, produjo un aumento significativo en el índice de incorporación de BrdU en comparación con

el control FBS, lo que indica una mayor tasa de proliferación de células progenitoras neuronales. Aunque este resultado podría sugerir un mejor efecto biológico del PRP de edad avanzada, puede deberse al alto contenido de citocinas proinflamatorias. De hecho, diferentes trabajos reportaron que la proliferación de las células progenitoras neurales podría verse alterada y potenciada en ciertas fases en un entorno inflamatorio,¹⁶¹⁻¹⁶³ causado por la presencia de niveles más altos de ciertas citocinas en el PRP de donante de edad avanzada que en el PRP de donante joven.

Posteriormente, se evaluó la diferenciación neuronal de estas células progenitoras mediante el tratamiento con AraC. Ambos PRP provocaron una disminución en el porcentaje de células neuronales debido a un aumento de las no neuronales. Estos datos indican que el PRP no contribuyó a la diferenciación neuronal de células NT2 pero aumentó la supervivencia de las progenitoras, posiblemente evitando la apoptosis producida por el tratamiento con AraC.¹⁶⁴ Por el contrario, otros autores reportaron el PRP como un promotor de diferenciación en células madre mesenquimales de médula ósea, tejido adiposo o papila apical dentaria.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Por otro lado, la capacidad del PRP para suprimir la apoptosis se observó en otros tipos de células como los condrocitos,¹⁶⁸ los osteoblastos¹⁶⁹ y las células del músculo esquelético.¹⁷⁰ Curiosamente, las células neurales progenitoras tratadas con PRP de donante joven mostraron un núcleo celular más grande en comparación con los tratados con PRP de donante de edad avanzada, lo que podría ser indicativo de procesos que ocurren antes de la diferenciación celular.^{171,172}

Después de estudiar los procesos en las células progenitoras neurales, el siguiente paso fue evaluar las células neuronales. Para obtener una evaluación más profunda de los efectos del PRP en el sistema nervioso central, se emplearon cultivos primarios de neuronas. Ninguno de los PRP modificó los niveles de expresión de proteínas pre y postsinápticas analizadas. Sin embargo, PRP joven podría jugar un papel en la estabilidad de la columna, ya que la colocalización de los puntos pre y postsinápticos mostraron una tendencia al

aumento y los puntos postsinápticos positivos para Homer aumentaron significativamente con el tratamiento con PRP de donante joven. Homer es una proteína de andamio postsináptica y se ha informado que está involucrada, junto con la proteína Shank, en la ampliación de las cabezas de la columna y la promoción de su estabilidad.¹⁷³ Es difícil señalar el mayor potencial terapéutico del PRP joven con respecto al PRP envejecido con pocas moléculas, ya que la acción biológica del PRP se debe a la acción sinérgica de sus componentes. Sin embargo, algunas moléculas deben mencionarse por su contribución a la mejora estos procesos biológicos.

Por lo tanto, estos resultados podrían explicarse al menos en parte por los niveles más altos de CCL-11 que se encuentran en el PRP de edad avanzada, porque CCL-11 aumenta con la edad e interviene en procesos relacionados con una disminución de la neurogénesis. Trabajos de parabiosis realizados por Villeda et al., en el que se unieron quirúrgicamente ratones viejos y ratones jóvenes para compartir un sistema circulatorio, demostró que CCL-11, entre otros, era una molécula clave en cerebro envejecido de los ratones jóvenes unidos a ratones viejos.^{174,175} Además, debemos considerar la presencia de GDF-11 en el grupo de PRP de donante joven pero no en el PRP de donante de edad avanzada, donde los niveles fueron inferiores a lo esperado. Esta molécula podría estar involucrada con la modulación¹⁷⁶ sináptica o con enfermedades relacionadas con la edad.¹⁷⁷ Además, el IGF se describió como un regulador clave de neurogénesis, ayudando a promover la proliferación y diferenciación de las células neuronales.¹⁷⁸

Finalmente, la microglía es un componente importante del sistema nervioso central, esencial para el neurodesarrollo y orquestar la respuesta inmune y otros procesos como la sinaptogénesis y la muerte de células neuronales.^{179,180} Como se observa en el presente estudio, el PRP de donante joven, pero no el PRP de donante de edad avanzada, es capaz de aumentar la expresión del marcador antiinflamatorio receptor de manosa en la microglía después de la inflamación inducida por LPS e IFN-gamma. Esto sugiere que todo

el equilibrio proinflamatorio/antiinflamatorio de la activación de la microglía varía según la edad del donante de PRP y que el PRP de donante joven promueve un fenotipo pro-regenerativo en la microglía. Anteriormente se informó que el PRP es capaz de activar la microglía en un modelo de rata de lesión de la médula espinal.¹⁸¹ Una vez más, es difícil relacionar las mejoras provocadas por el PRP de donante joven sobre el PRP de edad avanzada a una sola molécula. El efecto antiinflamatorio del PRP es un proceso conocido mediado por varias moléculas como IGF-1 y otros factores de crecimiento, que están implicados en la reducción de la activación de NF- κ B, óxido nítrico, ciclooxigenasa y expresión del factor de necrosis tumoral en el cerebro.¹⁷⁸ Varios estudios in vitro han indicado que este factor de crecimiento tiene un efecto antiinflamatorio en astrocitos y microglía,¹⁸² y promueve el fenotipo M2 en la microglía,¹⁸³ contribuyendo a la reparación de tejidos. TGF β también es otro factor implicado en el efecto antiinflamatorio del PRP,¹⁸⁴ y el PRP de donante joven presentó niveles más altos que el PRP de donante de edad avanzada. Además, como se mencionó anteriormente, el perfil más proinflamatorio de PRP de edad avanzada, debido a su composición molecular, puede contribuir a su menor capacidad antiinflamatoria en comparación con el PRP de donante de joven.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos del primer trabajo, siendo el efecto antiinflamatorio uno de los mecanismos de acción más definidos del PRP, el cual genera un ambiente positivo para los cambios en la estructura tisular. Este efecto está a su vez condicionado por la edad del donante de PRP, cuyo efecto más potente puede deberse a una composición menos proinflamatoria que la de los donantes de edad avanzada.

La principal limitación de este estudio es inherente a los estudios in vitro ya que los resultados obtenidos no siempre son fáciles de traducir en resultados clínicos. Sin embargo, algunos de los modelos celulares utilizados en este trabajo provienen directamente de modelos animales, aportando conocimiento más próximo a la aplicación clínica. Se necesitan más estudios preclínicos y clínicos para consolidar los resultados obtenidos en el presente estudio y

avanzar en el campo de la patología del SNC y las potenciales herramientas terapéuticas. Así mismo, los resultados obtenidos en nuestros trabajos (Artículo 1 y 2) sugieren continuar en las líneas de investigación relacionadas con el uso de PRP alogénicos que más favorecen los procesos biológicos y conducen a la reparación de tejidos. Estos estudios deberían evaluar no sólo el potencial terapéutico de estos PRP alogénicos sino también los aspectos relacionados con las reacciones inmunes debido a la presencia de otras poblaciones celulares como los leucocitos en algunos de los tipos de PRP. Algunos autores mostraron resultados prometedores en estudios clínicos en pacientes con osteoartrosis y no informaron problemas de inmunidad.¹⁸⁵

En el tercer estudio, evaluamos si la aplicación del PRP por vía intraósea mostraba una mayor eficacia que las infiltraciones intraarticulares en artrosis de rodilla severas. Las infiltraciones intraarticulares de PRP son la modalidad convencional para abordar el cartílago articular, la membrana sinovial y el líquido sinovial, y han demostrado ser un método seguro y eficaz en la disminución del dolor y mejoría de la función articular en pacientes con artrosis moderada de rodilla.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Sin embargo, en la artrosis de rodilla de grado avanzado, la vía de administración de PRP es un elemento clave, debido a que la vía intraarticular de administración es insuficiente para abordar el hueso subcondral, tejido cuyo papel en la fisiopatología y el progreso de la artrosis, especialmente en las etapas tardías, es cada vez más reconocido y se ha postulado como una diana terapéutica clave.^{78,86,190}

En este trabajo de investigación, ambos grupos fueron tratados con 3 infiltraciones intraarticulares de PRP semanalmente, y solo el grupo IO se sometió a una novedosa terapia local consistente en una combinación de infiltraciones intraarticulares e intraóseas de PRP. La combinación de infiltraciones intraarticulares e intraóseas de PRP no mostró diferencias en comparación con el tratamiento control a los 2 meses, pero produjo una significativa reducción del dolor y mejoría en la funcionalidad de la articulación de la rodilla a los 6 y 12 meses después del tratamiento en paciente con artrosis

de rodilla de grado avanzado, sin efectos adversos graves en ambas modalidades de tratamiento.

Durante los últimos años, varios estudios clínicos han reportado resultados controvertidos sobre el uso del PRP intraarticular para la artrosis de rodilla. Por un lado, algunos estudios concluyeron que en pacientes con artrosis de rodilla de grado leve a moderado es seguro y más eficaz que el ácido hialurónico o la solución salina normal para aliviar el dolor y mejorar la funcionalidad del paciente.^{189,191,192} Por otro lado, la no superioridad del PRP frente a otros tratamientos también ha sido demostrada por varios estudios.^{193,194} El análisis de los productos utilizados en los estudios sigue sufriendo inconsistencias tanto en su preparación como en su aplicación, presentando muchas variables, como el número de plaquetas, método de activación, dosificación y presencia de leucocitos, entre otras. Este último ha sido uno de los más estudiados como responsable de la seguridad y eficacia del PRP. Estudios *in vitro* e *in vivo* asocian la presencia de leucocitos en el PRP con los efectos perjudiciales sobre los condrocitos, las células madre mesenquimales subcondrales humanas, los osteoblastos y los sinoviocitos,¹²⁹ probablemente debido a la liberación de citoquinas catabólicas (metaloproteinasa de matriz 9, MMP-9) y proinflamatorias (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), mediadas por la activación de la vía del factor nuclear- κ B (NF- κ B).^{128,151} Estudios clínicos que utilizaron PRP con leucocitos reportaron resultados tanto positivos como negativos,¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ y la presencia de leucocitos no parece provocar un ambiente proinflamatorio en comparación con el PRP sin leucocitos.¹⁹⁸

A pesar de las controversias que generan el uso del PRP en la artrosis, se ha publicado recientemente un trabajo del grupo trabajo ORthoBiologics InitiaTive (ORBIT) de la European Society for Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy (ESSKA) en el que por primera vez se alcanza un consenso basado en la evidencia clínica publicada. Dicho consenso recomienda el uso del PRP intraarticular en la artrosis de rodilla por encima de otros tratamientos intraarticulares como el ácido hialurónico o los corticoides. Esta

recomendación se centra en las artrosis leves, siendo más débil en la artrosis de grado más avanzado, ya que en estos casos disminuiría la efectividad del tratamiento.^{185,199} En este sentido, la vía de administración podría ser un elemento clave para mejorar el tratamiento en los casos de artrosis severa. La vía intraarticular de administración de fármacos es insuficiente para abordar el hueso subcondral, un tejido cuyo papel en la fisiopatología y el progreso de la artrosis de rodilla, principalmente en las etapas tardías, es cada vez más reconocido^{80,200,201} y se ha postulado como un objetivo fundamental para tratar la artrosis de rodilla grave.^{200,202} La mejora significativa en la puntuación de dolor del KOOS y de las medidas de resultado secundarias de las subescalas del KOOS y WOMAC desde el inicio hasta los 6 y 12 meses que mostró el grupo IO en comparación del grupo IA en el presente trabajo, fue atribuido a la modalidad de tratamiento adicional, es decir, las infiltraciones intraóseas de PRP. La falta de diferencia significativa a los 2 meses al comparar ambos grupos, a pesar de la ligera mejoría en el grupo IO, puede deberse a que el PRP inicia su efecto al segundo mes y su efecto real se observa progresivamente en el tiempo.²⁰³ Estos resultados están de acuerdo con el estudio piloto inicial anteriormente mencionado, y en el que se informó de una reducción significativa en la puntuación del dolor KOOS, una disminución significativa del líquido sinovial (LS) después de 1 semana de tratamiento y una mejora en la función de la articulación de la rodilla.¹¹²

Se ha demostrado que las inyecciones intraóseas de PRP en humanos son eficaces en varias afecciones, como en pseudoartrosis o autoestimulación de la médula ósea en cresta ilíaca.^{204–206} A pesar de estos resultados prometedores, la regeneración ósea basada en el uso del PRP genera controversia debido a estudios con resultados contradictorios. Como en el caso del cartílago, distintas variables que influyen en la preparación y aplicación de PRP, implican el uso de distintos productos y, por tanto, distintos resultados.²⁰⁷ Una revisión sistemática realizada por Roffi y cols.,²⁰⁸ mostró el beneficio del PRP en estudios preclínicos, mientras que en los estudios clínicos presentó más

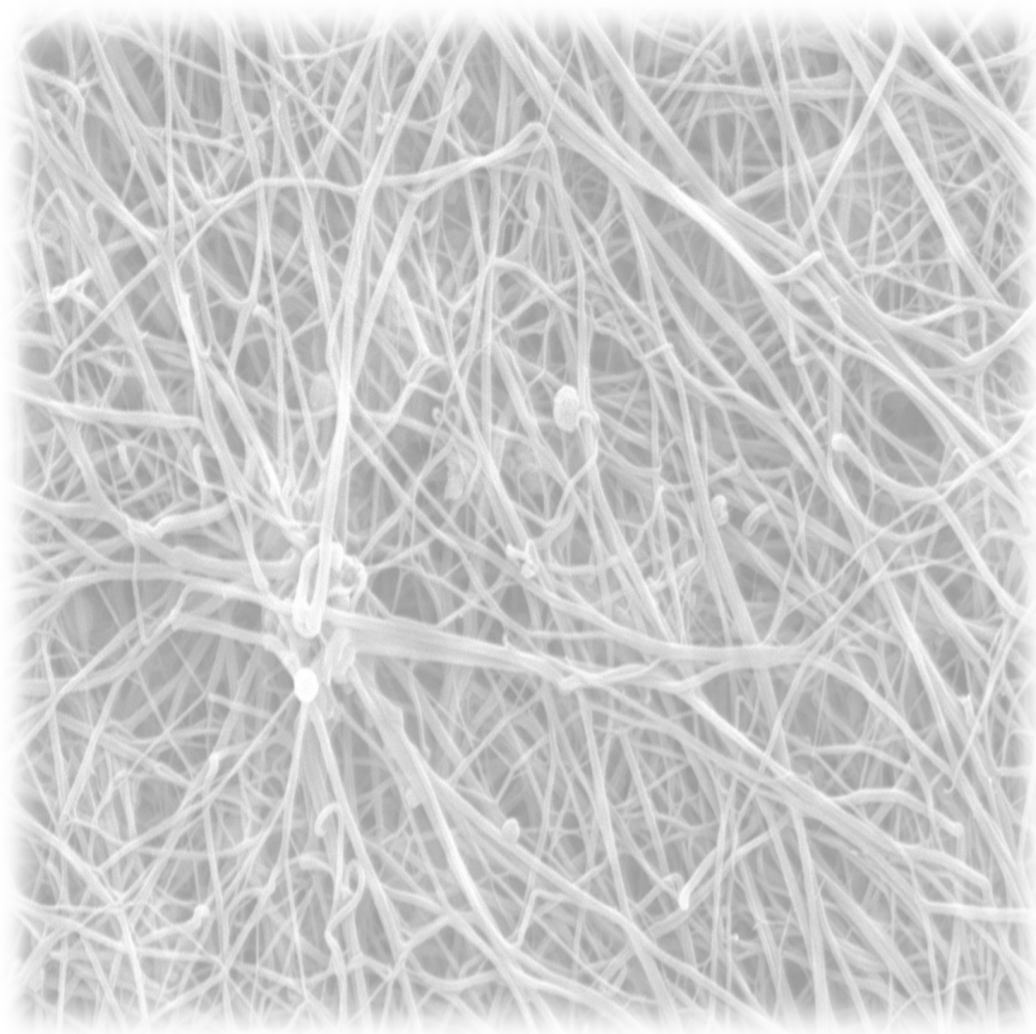
limitaciones al respecto, lo que sugiere la dificultad de traducir y optimizar el uso del PRP para la curación ósea en la práctica clínica. Sin embargo, las infiltraciones intraóseas de PRP en este trabajo no pretenden regenerar hueso, sino estimular el hueso subcondral para mejorar el entorno biológico articular. Zhen y cols.²⁰⁹ demostraron que al inhibir la señalización del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) en una población específica de células madre mesenquimales presentes en el hueso subcondral (células madre mesenquimales nestin-positivas) se redujo la gravedad de la artrosis.²⁰⁹ De hecho, estudios previos han demostrado que la disminución de las células madre mesenquimales en el LS, en artrosis de bajo grado, sugieren mejoría clínica.²¹⁰ Por lo tanto, es razonable especular que, al administrar PRP directamente en el hueso subcondral, la presencia simultánea de TGF- β 1 secretado por las plaquetas, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), así como los factores de crecimiento plasmáticos como el factor de crecimiento insulinoide-1 (IGF-1) y factor de crecimiento hepatocitario (HGF), podrían tener un efecto modulador en la vía de señalización de TGF- β .^{68,209} Esto podría reducir la presencia de células madre mesenquimales y probablemente podría estar relacionado con la reducción del tejido fibrovascular del hueso subcondral en la artrosis de rodilla, una explicación que es paralela al mecanismo antifibrótico ya informado en varios fenotipos celulares,²¹¹ contribuyendo así a la modulación del tejido fibrovascular aberrante, alivio del dolor y la hiperalgesia.²¹² En este sentido, Muiños-López y cols.²¹³ mostraron que las infiltraciones intraóseas de PRP, no así las intraarticulares, reducían la presencia de células madre mesenquimales en LS. Además de estos efectos que ocurrieron en el hueso subcondral, la infiltración intraarticular de PRP suprimió el efecto de NF- κ B en las células intraarticulares inflamadas, lo que conduciría a la reducción de las citoquinas proinflamatorias que de otro modo podrían contribuir al dolor al estimular la hiperalgesia y sensibilizar nociceptores articulares a otros estímulos.^{214,215} Este efecto antiinflamatorio no sólo favorece la reducción del dolor, sino que también podría influir en otros procesos

biológicos relacionados con la OA de rodilla, como la senescencia celular.^{216,217} Finalmente, una cantidad significativa de cannabinoides endógenos incluidos en el PRP podrían actuar como ligandos para los receptores cannabinoides 1 (CB-1) y 2 (CB-2) de los condrocitos, sinoviocitos y células óseas de las pacientes con artrosis, contribuyendo así a la reducción del dolor y la inflamación al actuar sobre el sistema cannabinoide endógeno.^{218,219}

Independientemente de cuánto del efecto terapéutico de la infiltración intraarticular e intraósea de PRP sea placebo, existe una amplia evidencia *in vitro* e *in vivo* que sugiere que la intervención del PRP en la artrosis de rodilla es algo más que una intervención simulada donde el PRP cumpliría con los requisitos de un placebo ideal.¹²⁹ Como ejemplo, las técnicas de estimulación de la médula ósea, y las infiltraciones intraósneas de PRP como una de ellas, han demostrado inducir una reparación tisular similar al cartílago y reparar defectos condrales,²²⁰ lo que hace que la aplicación de PRP sea una terapia modificadora de estructura. Sin embargo, y previo al tratamiento de PRP, primero retiraríamos el líquido sinovial y después infiltraríamos PRP intraarticularmente. Esto plantea la pregunta acerca de cuánto del efecto terapéutico de las infiltraciones intraarticulares es respuesta placebo o efecto fisiológico tras la extracción del LS con moléculas mediadoras y señalizadoras del dolor además de la inyección de un líquido mediante una aguja en la articulación de la rodilla.^{221–224}

Este estudio presenta algunas limitaciones. Primero, las particularidades de este nuevo tratamiento han impedido un mejor diseño del estudio que hubiera generado resultados y conclusiones más sólidas. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten considerar nuevos y más profundos estudios basados en este campo. En segundo lugar, se incluyó en el estudio un número relativamente pequeño de pacientes. En tercer lugar, desde el punto de vista del investigador, existe una falta de seguimiento de los cambios estructurales en el hueso subcondral a través de imágenes de resonancia magnética 3-T, estudios histológicos e inmunohistoquímicos y citometría de flujo, lo que podría sugerir una intervención de enfermedad modificadora de estructura.

Serán necesarios más estudios para aumentar nuestro conocimiento sobre las infiltraciones intraóseas de PRP, con el fin de conocer si se puede modificar la evolución de la enfermedad. Así mismo, nuestros estudio sugieren continuar las líneas de investigación relacionadas con el uso de PRP alogénicos de donante joven, para mejorar la eficacia de estos tratamientos así como la posibilidad de disminuir la senescencia celular.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villeda SA, Wyss-Coray T. The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging. *Autoimmun Rev.* 2013;12(6):674-677. doi:10.1016/J.AUTREV.2012.10.014
2. Willmer P, SG, JI. Environmental physiology of animals. *John Wiley & Sons.*
3. Schaller J, GS, KU, LS, TC. Human blood plasma proteins: Structure and function. . *John Wiley & Sons.* Published online 2008.
4. Fogelson AL, Neeves KB. Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. *Annu Rev Fluid Mech.* 2015;47:377-403. doi:10.1146/ANNUREV-FLUID-010814-014513
5. Kalluri R, LeBleu VS. The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020;367(6478). doi:10.1126/SCIENCE.AAU6977
6. Pluvinage J v., Wyss-Coray T. Systemic factors as mediators of brain homeostasis, ageing and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2020;21(2):93-102. doi:10.1038/S41583-019-0255-9
7. Nurden AT. The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018;23(4):726-751. doi:10.2741/4613
8. Padilla S, Sánchez M, Vaquerizo V, et al. Platelet-Rich Plasma Applications for Achilles Tendon Repair: A Bridge between Biology and Surgery. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):1-17. doi:10.3390/IJMS22020824
9. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weismann IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature.* 2005;433(7027):760-764. doi:10.1038/nature03260
10. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):795-803. doi:10.1038/nbt.2978
11. Emilsson V, Ilkov M, Lamb JR, et al. *Co-Regulatory Networks of Human Serum Proteins Link Genetics to Disease Downloaded From.* Vol 361.; 2018. <http://science.sciencemag.org/>
12. Pedersen BK. The Physiology of Optimizing Health with a Focus on Exercise as Medicine. *Annu Rev Physiol.* 2018;11:58. doi:10.1146/annurev-physiol-020518
13. de Miguel Z, Betley MJ, Willoughby D, et al. Exercise conditioned plasma dampens inflammation via clusterin and boosts memory. doi:10.1101/775288
14. Williams SA, Kivimaki M, Langenberg C, et al. Plasma protein patterns as comprehensive indicators of health. *Nat Med.* 2019;25(12):1851-1857. doi:10.1038/s41591-019-0665-2
15. Lehallier B, Gate D, Schaum N, et al. Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. *Nat Med.* 2019;25(12):1843-1850. doi:10.1038/s41591-019-0673-2
16. Stastna M, van Eyk JE. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics.* 2012;12(4-5):722-735. doi:10.1002/pmic.201100346

17. Espín-Palazón R, Stachura DL, Campbell CA, et al. Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell*. 2014;159(5):1070-1085. doi:10.1016/j.cell.2014.10.031
18. Neves J, Sousa-Victor P, Jasper H. Rejuvenating Strategies for Stem Cell-Based Therapies in Aging. *Cell Stem Cell*. 2017;20(2):161-175. doi:10.1016/j.stem.2017.01.008
19. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
20. Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014;20(8):870-880. doi:10.1038/NM.3651
21. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2014;69:S4-S9. doi:10.1093/gerona/glu057
22. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014;31(6):722-733. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012
23. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology*. 2002;3(5):257-264. doi:10.1023/A:1020185404126
24. Liu HY, Huang CF, Lin TC, et al. Delayed animal aging through the recovery of stem cell senescence by platelet rich plasma. *Biomaterials*. 2014;35(37):9767-9776. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.08.034
25. Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 2014;506(7488):316-321. doi:10.1038/nature13013
26. Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(4):668-677. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202783
27. Toh WS, Brittberg M, Farr J, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis: Implications for cartilage repair. *Acta Orthop*. 2016;87:6-14. doi:10.1080/17453674.2016.1235087
28. Mattson MP, Arumugam T v. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab*. 2018;27(6):1176-1199. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.011
29. Wang Q, ZF, XW, ZX, LX. Research progress on aging mechanisms. *Adv Aging Res*. Published online 2016.
30. Ganguly P, El-Jawhari JJ, Giannoudis P v., Burska AN, Ponchel F, Jones EA. Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplant*. 2017;26(9):1520-1529. doi:10.1177/0963689717721201
31. Medawar PB. An Unsolved problem of Biology. London, UK: HK Lewis and company. Published online 1952.

32. Schultz MB, Sinclair DA. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development*. 2016;143(1):3-14. doi:10.1242/DEV.130633
33. Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(4):445-453. doi:10.1089/TEN.TEB.2009.0825
34. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300. doi:10.1093/GERONJ/11.3.298
35. Fukada S ichiro, Ma Y, Uezumi A. Adult stem cell and mesenchymal progenitor theories of aging. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2(MAR). doi:10.3389/FCELL.2014.00010
36. Song H, Cha MJ, Song BW, et al. Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells*. 2010;28(3):555-563. doi:10.1002/STEM.302
37. Kanda Y, Hinata T, Kang SW, Watanabe Y. Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2011;89(7-8):250-258. doi:10.1016/J.LFS.2011.06.007
38. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004;22(5):675-682. doi:10.1634/STEMCELLS.22-5-675
39. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. 2006;7. doi:10.1186/1471-2121-7-14
40. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194. doi:10.1016/J.CELL.2013.05.039
41. Jones DL, Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):506-512. doi:10.1038/NCB0511-506
42. García-Prat L, Muñoz-Cánoves P. Aging, metabolism and stem cells: Spotlight on muscle stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;445:109-117. doi:10.1016/J.MCE.2016.08.021
43. Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):362-369. doi:10.1016/j.stem.2012.02.018
44. Villeda SA, Wyss-Coray T. The circulatory systemic environment as a modulator of neurogenesis and brain aging. *Autoimmun Rev*. 2013;12(6):674-677. doi:10.1016/J.AUTREV.2012.10.014
45. Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA. Heterochronic parabiosis: Historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell*. 2013;12(3):525-530. doi:10.1111/accel.12065
46. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011;477(7362):90-96. doi:10.1038/nature10357

47. Liu HY, Wu ATH, Tsai CY, et al. The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. *Biomaterials*. 2011;32(28):6773-6780. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.080
48. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weismann IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005;433(7027):760-764. doi:10.1038/nature03260
49. Anitua E, Prado R, Padilla S. Evolutionary Insight into Immunothrombosis as a Healing Mechanism. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15). doi:10.3390/ijms23158346
50. Anitua E, Nurden P, Prado R, Nurden AT, Padilla S. Autologous fibrin scaffolds: When platelet- and plasma-derived biomolecules meet fibrin. *Biomaterials*. 2019;192:440-460. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.11.029
51. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653
52. Sun BB, Maranville JC, Peters JE, et al. Genomic atlas of the human plasma proteome. *Nature*. 2018;558(7708):73-79. doi:10.1038/s41586-018-0175-2
53. Suhre K, Raffler J, Kastenmüller G. Biochemical insights from population studies with genetics and metabolomics. *Arch Biochem Biophys*. 2016;589:168-176. doi:10.1016/J.ABB.2015.09.023
54. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2. doi:10.1038/NRDP.2016.72
55. Buchman TG. The community of the self. *Nature*. 2002;420(6912):246-251. doi:10.1038/NATURE01260
56. Dorrell JH, Catterall A. The torn acetabular labrum. *J Bone Joint Surg Br*. 1986;68(3):400-403. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
57. Abrams G, Hart M, Takami K, et al. Effect of Capsulotomy, Capsulectomy, and Capsular Repair on Hip Stability. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. Published online 2014. doi:10.1016/j.arthro.2014.04.045
58. Hewitt JD, Glisson RR, Guilak F, Vail TP. The mechanical properties of the human hip capsule ligaments. *Journal of Arthroplasty*. Published online 2002. doi:10.1054/arth.2002.27674
59. Retchford T, Crossley KM, Grimaldi A, Kemp JL, Cowan SM. Can local muscles augment stability in the hip? A narrative literature review. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*. 2013;13(1):1-12. doi:10.1136/bjism.2009.066944
60. de Sousa EB, Casado PL, Neto VM, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5). doi:10.1186/SCRT501
61. D. Smith M. The normal synovium. *Open Rheumatol J*. 2011;5(1):100-106. doi:10.2174/1874312901105010100

62. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Padilla S. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(8):1161-1172. doi:10.1517/14712598.2013.801450
63. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(SUPL.):20-30. doi:10.1016/j.joca.2003.09.016
64. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: A rediscovered functional unit. *Invest Radiol.* 2000;35(10):581-588. doi:10.1097/00004424-200010000-00004
65. Pan J, Wang B, Li W, et al. Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints. *Bone.* 2012;51(2):212-217. doi:10.1016/J.BONE.2011.11.030
66. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):43-49. doi:10.1038/NRRHEUM.2010.197
67. Gerter R, Kruegel J, Miosge N. New insights into cartilage repair - the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. *Matrix Biol.* 2012;31(3):206-213. doi:10.1016/J.MATBIO.2012.01.007
68. Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: Combination of intra-articular and intraosseous injections of Platelet Rich Plasma. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(5):627-643. doi:10.1517/14712598.2016.1157162
69. Tchetina E v. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis.* 2011;2011:1-16. doi:10.1155/2011/683970
70. Nam J, Aguda BD, Rath B, Agarwal S. Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF-kappaB pathway: experiments and modeling. *PLoS One.* 2009;4(4). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0005262
71. Woodell-May JE, Sommerfeld SD. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2020;38(2):253-257. doi:10.1002/JOR.24457
72. Chow YY, Chin KY. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/8293921
73. Aspden RM, Saunders FR. Osteoarthritis as an organ disease: from the cradle to the grave. *Eur Cell Mater.* 2019;37:74-87. doi:10.22203/ECM.V037A06
74. Zhao X, Zhao Y, Sun X, Xing Y, Wang X, Yang Q. Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. doi:10.3389/FBIOE.2020.575057
75. Delgado D, Garate A, Vincent H, et al. Current concepts in intraosseous Platelet-Rich Plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthop Trauma.* 2019;10(1). doi:10.1016/j.jcot.2018.09.017
76. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(11):632-644. doi:10.1038/NRRHEUM.2016.148

77. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249-257. doi:10.1016/J.BONE.2012.02.012
78. Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*. 2012;51(2):204-211. doi:10.1016/J.BONE.2011.10.010
79. B. Marcu K, Otero M, Olivotto E, Maria Borzi R, B. Goldring M. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 2010;11(5):599-613. doi:10.2174/138945010791011938
80. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42. doi:10.1038/NRRHEUM.2010.196
81. Krasnokutsky S, Belitskaya-Lévy I, Bencardino J, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evidence of synovial proliferation is associated with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(10):2983-2991. doi:10.1002/ART.30471
82. Radin EL, Paul IL, Rose RM. Pathogenesis of primary osteoarthritis. *Lancet*. 1972;1(7765):1395-1396. doi:10.1016/S0140-6736(72)91130-0
83. Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med*. 2013;19(6):704-712. doi:10.1038/NM.3143
84. Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, et al. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiol*. 2008;37(5):423-431. doi:10.1007/S00256-008-0446-3
85. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-1089. doi:10.1016/J.JOCA.2014.05.023
86. Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(3):315-323. doi:10.1016/J.BCP.2011.09.018
87. Harris Q, Seto J, O'Brien K, et al. Monocyte chemotactic protein-1 inhibits chondrogenesis of synovial mesenchymal progenitor cells: an in vitro study. *Stem Cells*. 2013;31(10):2253-2265. doi:10.1002/STEM.1477
88. Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, et al. Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(7):1648-1659. doi:10.1002/ART.39622
89. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(10):584-594. doi:10.1038/NRRHEUM.2013.109
90. Ganguly P, El-Jawhari JJ, Giannoudis P v., Burska AN, Ponchel F, Jones EA. Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplant*. 2017;26(9):1520-1529. doi:10.1177/0963689717721201

91. Evans IC, Barnes JL, Garner IM, et al. Epigenetic regulation of cyclooxygenase-2 by methylation of c8orf4 in pulmonary fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(8):575-586. doi:10.1042/CS20150697
92. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007;447(7146):869-874. doi:10.1038/NATURE05877
93. Usher KM, Zhu S, Mavropalias G, Carrino JA, Zhao J, Xu J. Pathological mechanisms and therapeutic outlooks for arthrofibrosis. *Bone Res*. 2019;7(1). doi:10.1038/S41413-019-0047-X
94. Fiz N, Delgado D, Garate A, et al. Intraosseous infiltrations of Platelet-Rich Plasma for severe hip osteoarthritis: A pilot study. *J Clin Orthop Trauma*. 2020;11. doi:10.1016/j.jcot.2019.12.012
95. Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al. *A New Approach to Treat Joint Injuries: Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma.*; 2018. doi:10.1007/978-3-319-63730-3_8
96. Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MAH, Heemskerk JWM, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis*. 2011;2(9). doi:10.1038/CDDIS.2011.94
97. Xu Z, Yin W, Zhang Y, et al. Comparative evaluation of leukocyte- and platelet-rich plasma and pure platelet-rich plasma for cartilage regeneration. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/SREP43301
98. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(10):1648-1652. doi:10.1249/01.MSS.0000089344.44434.50
99. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. Published online 1999.
100. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007;35(2):245-251. doi:10.1177/0363546506294078
101. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012;28(7):998-1009. doi:10.1016/J.ARTHRO.2012.04.148
102. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*. 2013;27(2):77-89. doi:10.1016/j.blre.2013.02.001
103. Metcalf KB, Mandelbaum BR, Mcllwraith CW. Application of Platelet-Rich Plasma to Disorders of the Knee Joint. *Cartilage*. 2013;4(4):295-312. doi:10.1177/1947603513487553
104. Castillo TN, Pouliot MA, Hyeon Joo Kim, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011;39(2):266-271. doi:10.1177/0363546510387517

105. Delgado D, Garate A, Vincent H, et al. Current concepts in intraosseous Platelet-Rich Plasma injections for knee osteoarthritis. *J Clin Orthop Trauma*. 2019;10(1):36-41. doi:10.1016/J.JCOT.2018.09.017
106. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):35-44. doi:10.1038/NRRHEUM.2014.162
107. Tohidnezhad M, Wruck CJ, Slowik A, et al. Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. *Bone*. 2014;65:9-17. doi:10.1016/J.BONE.2014.04.029
108. Sánchez M, Delgado D, Sánchez P, et al. Platelet rich plasma and knee surgery. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/890630
109. Hoggatt J, Kfoury Y, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016;11:555-581. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044414
110. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka P v., Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263. doi:10.1038/nature08099
111. Philippart P, Meuleman N, Stamatopoulos B, et al. In vivo production of mesenchymal stromal cells after injection of autologous platelet-rich plasma activated by recombinant human soluble tissue factor in the bone marrow of healthy volunteers. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(1-2):160-170. doi:10.1089/ten.tea.2013.0244
112. Sánchez M, Delgado D, Sánchez P, et al. Combination of Intra-Articular and Intraosseous Injections of Platelet Rich Plasma for Severe Knee Osteoarthritis: A Pilot Study. *Biomed Res Int*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/4868613
113. Giusti I, D'Ascenzo S, Mancò A, et al. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/630870
114. Xu Z, Yin W, Zhang Y, et al. Comparative evaluation of leukocyte- and platelet-rich plasma and pure platelet-rich plasma for cartilage regeneration. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/SREP43301
115. Kreuz PC, Krüger JP, Metzloff S, et al. Platelet-Rich Plasma Preparation Types Show Impact on Chondrogenic Differentiation, Migration, and Proliferation of Human Subchondral Mesenchymal Progenitor Cells. *Arthroscopy*. 2015;31(10):1951-1961. doi:10.1016/J.ARTHRO.2015.03.033
116. Chahla J, Cinque ME, Piuze NS, 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. doi:10.2106/JBJS.16.01374
117. Rodeo S. The Need for Minimum Reporting Standards for Studies of "Biologics" in Sports Medicine. *Am J Sports Med*. 2019;47(11):2531-2532. doi:10.1177/0363546519872219

118. Mautner K, Malanga GA, Smith J, 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. doi:10.1016/J.PMRJ.2015.02.005
119. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, 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). doi:10.1136/BMJSEM-2015-000060
120. Lana JFSD, Purita J, Paulus C, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma - proposal of a new classification: MARSPILL. *Regenerative Med*. 2017;12(5):565-574. doi:10.2217/RME-2017-0042
121. Kon E, di Matteo B, Delgado D, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(12). doi:10.1080/14712598.2020.1798925
122. Anitua E, Orive G. Endogenous regenerative technology using plasma- and platelet-derived growth factors. *J Control Release*. 2012;157(3):317-320. doi:10.1016/J.JCONREL.2011.11.011
123. Zehnder J L LLL. Development of antibodies to thrombin and facto V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombine. *Blood*. Published online 1990.
124. Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998;56(9):1116-1117. doi:10.1016/S0278-2391(98)90286-5
125. Diesen D L LJH. Bovine thrombin:history, use and risk in the surgical patient. *Vascular*. Published online 2008.
126. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-182. doi:10.1038/NRI1785
127. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2). doi:10.1152/AJPREGU.00454.2004
128. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, et al. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(5):423-429. doi:10.2106/JBJS.M.00726
129. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, et al. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(9):2690-2703. doi:10.1007/S00167-014-3113-3
130. 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. doi:10.1177/0363546514525593
131. Mishra AK, Skrepnik N v., Edwards SG, et al. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. *Am J Sports Med*. 2014;42(2):463-471. doi:10.1177/0363546513494359

132. Anitua E, Prado R, Azkargorta M, et al. High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):E1-E12. doi:10.1002/TERM.1721
133. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105 Suppl 1(SUPPL. 1):13-33. doi:10.1160/THS10-11-0720
134. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-689. doi:10.1016/J.CELL.2006.06.044
135. Martino MM, Briquez PS, Güç E, et al. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science*. 2014;343(6173):885-888. doi:10.1126/SCIENCE.1247663
136. Anitua E, Zalduendo MM, Prado R, Alkhraisat MH, Orive G. Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(3):1011-1020. doi:10.1002/JBM.A.35244
137. Sánchez M, Fiz N, Guadilla J, et al. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthrosc Tech*. 2014;3(6). doi:10.1016/j.eats.2014.09.006
138. Baker J, Nederveen JP, Ibrahim G, Ivankovic V, Joannis S, Parise G. Exercise training differentially alters axial and appendicular marrow cellularity in old mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018;43(5):523-527. doi:10.1139/APNM-2017-0259
139. Li J, Liu X, Zuo B, Zhang L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging Dis*. 2015;7(4):514-525. doi:10.14336/AD.2015.1206
140. Costa S, Fairfield H, Reagan MR. Inverse correlation between trabecular bone volume and bone marrow adipose tissue in rats treated with osteoanabolic agents. *Bone*. 2019;123:211-223. doi:10.1016/J.BONE.2019.03.038
141. HARTSOCK RJ, SMITH EB, PETTY CS. NORMAL VARIATIONS WITH AGING OF THE AMOUNT OF HEMATOPOIETIC TISSUE IN BONE MARROW FROM THE ANTERIOR ILIAC CREST. A STUDY MADE FROM 177 CASES OF SUDDEN DEATH EXAMINED BY NECROPSY. *Am J Clin Pathol*. 1965;43:326-331. doi:10.1093/AJCP/43.4.326
142. Meunier P, Aaron J, Edouard C, Vignon G. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop Relat Res*. 1971;80:147-154. doi:10.1097/00003086-197110000-00021
143. Zhang HW, Ding J, Jin JL, et al. Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25(3):640-652. doi:10.1359/JBMR.090812

144. Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, et al. The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain. *Neurobiol Aging*. 2012;33(5):921-932. doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.08.008
145. Florea C, Malo MKH, Rautiainen J, et al. Alterations in subchondral bone plate, trabecular bone and articular cartilage properties of rabbit femoral condyles at 4 weeks after anterior cruciate ligament transection. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(3):414-422. doi:10.1016/J.JOCA.2014.11.023
146. Botter SM, van Osch GJVM, Waarsing JH, et al. Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(4):506-514. doi:10.1016/J.JOCA.2007.08.005
147. Sniekers YH, Intema F, Lafeber FPJG, et al. A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9. doi:10.1186/1471-2474-9-20
148. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):16-21. doi:10.1016/J.JOCA.2012.11.012
149. Jaswal AP, Bandyopadhyay A. Re-examining osteoarthritis therapy from a developmental biologist's perspective. *Biochem Pharmacol*. 2019;165:17-23. doi:10.1016/J.BCP.2019.03.020
150. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(3-4):572-581. doi:10.1089/ARS.2006.8.572
151. Xu Z, Yin W, Zhang Y, et al. Comparative evaluation of leukocyte- and platelet-rich plasma and pure platelet-rich plasma for cartilage regeneration. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/SREP43301
152. Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J Biol Chem*. 2014;289(24):16699-16710. doi:10.1074/JBC.M114.547919
153. Lee J, Park C, Kim HJ, et al. Stimulation of osteoclast migration and bone resorption by C-C chemokine ligands 19 and 21. *Exp Mol Med*. 2017;49(7). doi:10.1038/EMM.2017.100
154. Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, 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. doi:10.1002/JCP.22274
155. Garcia TA, Camargo RCT, Koike TE, Ozaki GAT, Castoldi RC, Camargo Filho JCS. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. *Braz J Phys Ther*. 2017;21(6):425-433. doi:10.1016/J.BJPT.2017.06.007
156. Evanson R, Kelly Guyton M, Oliver AL, et al. Gender and age differences in growth factor concentrations from platelet-rich plasma in adults. *Mil Med*. 2014;179(7):799-805. doi:10.7205/MILMED-D-13-00336

157. Delgado D, Garate A, Sánchez P, et al. Biological and structural effects after intraosseous infiltrations of age-dependent platelet-rich plasma: An in vivo study. *J Orthop Res.* 2020;38(9):1931-1941. doi:10.1002/JOR.24646
158. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015;30(1):35-44. doi:10.3803/ENM.2015.30.1.35
159. Sundaram K, Rao DS, Ries WL, Reddy S v. CXCL5 stimulation of RANK ligand expression in Paget's disease of bone. *Lab Invest.* 2013;93(4):472-479. doi:10.1038/LABINVEST.2013.5
160. Yin WJ, Xu HT, Sheng JG, et al. Advantages of Pure Platelet-Rich Plasma Compared with Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Treating Rabbit Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit.* 2016;22:1280-1290. doi:10.12659/MSM.898218
161. Kizil C, Kyritsis N, Brand M. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO Rep.* 2015;16(4):416-426. doi:10.15252/EMBR.201439702
162. Covacu R, Brundin L. Effects of Neuroinflammation on Neural Stem Cells. *Neuroscientist.* 2017;23(1):27-39. doi:10.1177/1073858415616559
163. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 2009;108(6):1343-1359. doi:10.1111/J.1471-4159.2009.05886.X
164. Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, et al. Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem.* 2001;78(2):265-275. doi:10.1046/J.1471-4159.2001.00395.X
165. Qian Y, Han Q, Chen W, et al. Platelet-Rich Plasma Derived Growth Factors Contribute to Stem Cell Differentiation in Musculoskeletal Regeneration. *Front Chem.* 2017;5. doi:10.3389/FCHEM.2017.00089
166. Li H, Han Z, Liu D, Zhao P, Liang S, Xu K. Autologous platelet-rich plasma promotes neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. *Int J Neurosci.* 2013;123(3):184-190. doi:10.3109/00207454.2012.742077
167. Li J, Xiang L, Guan C, et al. Effects of Platelet-Rich Plasma on Proliferation, Viability, and Odontogenic Differentiation of Neural Crest Stem-Like Cells Derived from Human Dental Apical Papilla. *Biomed Res Int.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/4671989
168. Moussa M, Lajeunesse D, Hilal G, et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res.* 2017;352(1):146-156. doi:10.1016/J.YEXCR.2017.02.012
169. Mo W, Wu J, Qiu Q, et al. Platelet-rich plasma inhibits osteoblast apoptosis and actin cytoskeleton disruption induced by gingipains through

- upregulating integrin $\beta 1$. *Cell Biol Int*. 2020;44(10):2120-2130. doi:10.1002/CBIN.11420
170. Tsai WC, Yu TY, Chang GJ, Lin LP, Lin MS, Pang JHS. Platelet-Rich Plasma Releasate Promotes Regeneration and Decreases Inflammation and Apoptosis of Injured Skeletal Muscle. *Am J Sports Med*. 2018;46(8):1980-1986. doi:10.1177/0363546518771076
171. McMahan SS, Dockery P, McDermott KW. Estimation of nuclear volume as an indicator of maturation of glial precursor cells in the developing rat spinal cord: a stereological approach. *J Anat*. 2003;203(3):339-344. doi:10.1046/J.1469-7580.2003.00215.X
172. Grosch M, Ittermann S, Rusha E, et al. Nucleus size and DNA accessibility are linked to the regulation of paraspeckle formation in cellular differentiation. *BMC Biol*. 2020;18(1). doi:10.1186/S12915-020-00770-Y
173. Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*. 2001;31(1):115-130. doi:10.1016/S0896-6273(01)00339-7
174. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011;477(7362):90-96. doi:10.1038/NATURE10357
175. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*. 2014;20(6):659-663. doi:10.1038/nm.3569
176. Augustin H, McGourty K, Steinert JR, et al. Myostatin-like proteins regulate synaptic function and neuronal morphology. *Development*. 2017;144(13):2445-2455. doi:10.1242/DEV.152975
177. Tian J, Lei XX, Xuan L, Tang JB, Cheng B. The effects of aging, diabetes mellitus, and antiplatelet drugs on growth factors and anti-aging proteins in platelet-rich plasma. *Platelets*. 2019;30(6):773-792. doi:10.1080/09537104.2018.1514110
178. Anitua E, Pascual C, Pérez-Gonzalez R, et al. Intranasal delivery of plasma and platelet growth factors using PRGF-Endoret system enhances neurogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0073118
179. Sominsky L, de Luca S, Spencer SJ. Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;94:56-60. doi:10.1016/J.BIOCEL.2017.11.012
180. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, et al. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*. 2018;12. doi:10.3389/FNCEL.2018.00488
181. Chen NF, Sung CS, Wen ZH, et al. Therapeutic Effect of Platelet-Rich Plasma in Rat Spinal Cord Injuries. *Front Neurosci*. 2018;12(APR). doi:10.3389/FNINS.2018.00252

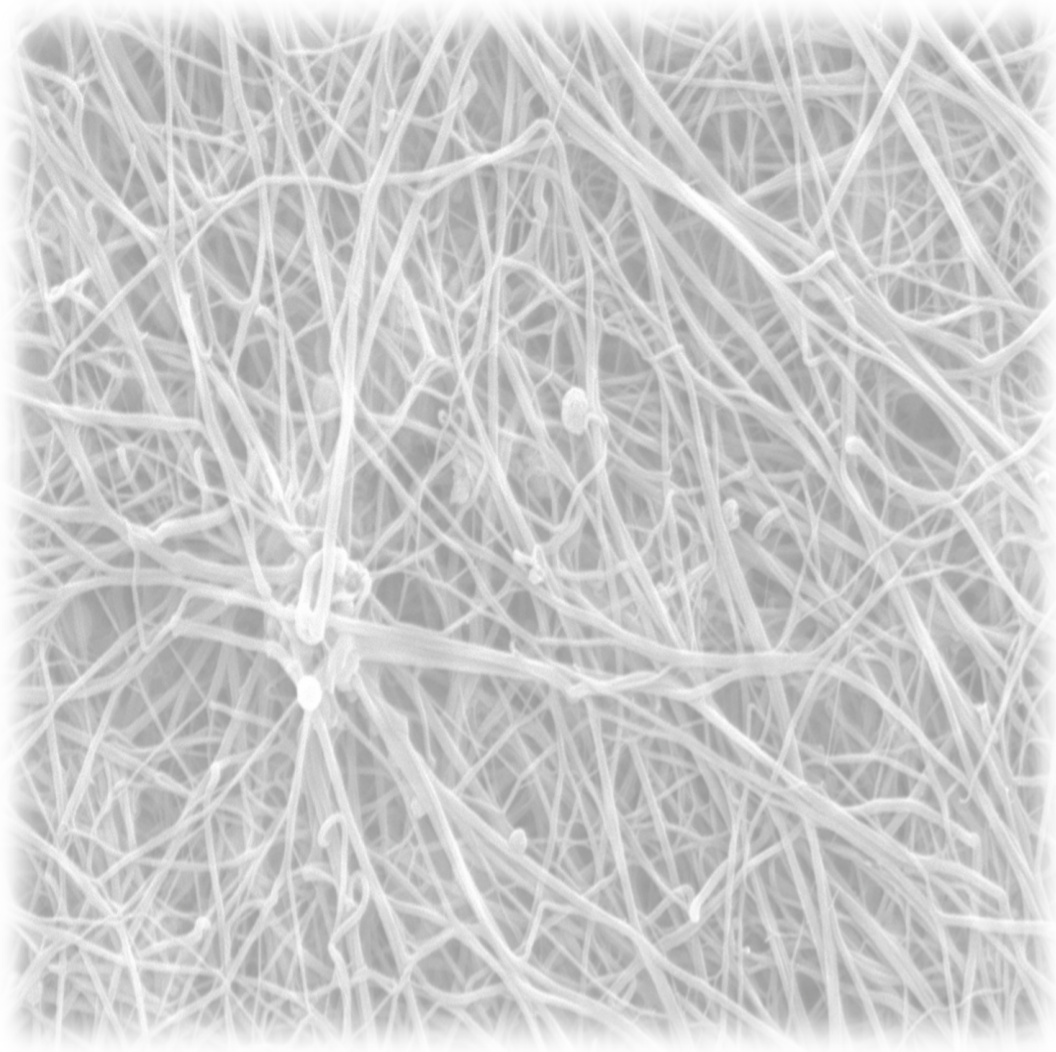
182. Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R. Effects of insulin-like growth factor-I on cytokine-induced sickness behavior in mice. *Brain Behav Immun.* 2006;20(1):57-63. doi:10.1016/J.BBI.2005.02.003
183. Lee DC, Ruiz CR, Lebson L, et al. Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system. *Neurobiol Aging.* 2013;34(6):1610-1620. doi:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2012.12.014
184. Noh MY, Lim SM, Oh KW, et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF- β Secretion. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(11):1538-1549. doi:10.5966/SCTM.2015-0217
185. Bottegoni C, Dei Giudici L, Salvemini S, Chiurazzi E, Bencivenga R, Gigante A. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(2):35-41. doi:10.1177/1759720X16631188
186. Vaquerizo V, Plasencia MÁ, Arribas I, 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. doi:10.1016/J.ARTHRO.2013.07.264
187. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single-versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(10):2082-2091. doi:10.1007/S00167-011-1837-X
188. Sánchez M, Fiz N, Azofra J, 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 - Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* 2012;28(8). doi:10.1016/j.arthro.2012.05.011
189. 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(3):495-505. doi:10.1016/J.ARTHRO.2015.08.005
190. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Fahmi H, Tardif G, Pelletier JP. New thoughts on the pathophysiology of osteoarthritis: one more step toward new therapeutic targets. *Curr Rheumatol Rep.* 2006;8(1):30-36. doi:10.1007/S11926-006-0022-6
191. Sanchez M AEAJAJAI. Intra-articular injections of an autologous preparation rich growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26(5):910-913.
192. 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. doi:10.1177/0363546512471299

193. Filardo G, di Matteo B, di Martino A, et al. Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2015;43(7):1575-1582. doi:10.1177/0363546515582027
194. 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. doi:10.1177/0363546516665809
195. Filardo G, Kon E, di Martino 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. doi:10.1186/1471-2474-13-229
196. Spaková T, Rosocha J, Lacko M, Harvanová D, Gharaibeh A. Treatment of knee joint osteoarthritis with autologous platelet-rich plasma in comparison with hyaluronic acid. *Am J Phys Med Rehabil.* 2012;91(5):411-417. doi:10.1097/PHM.0B013E3182AAB72
197. Riboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, Fortier L, Cole BJ. 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. doi:10.1177/0363546515580787
198. Mariani E, Canella V, Cattini L, 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). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0156137
199. Jang SJ, Kim J do, Cha SS. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2013;23(5):573-580. doi:10.1007/S00590-012-1037-5
200. Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, et al. Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(7):1648-1659. doi:10.1002/ART.39622
201. Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone.* 2012;51(2):204-211. doi:10.1016/J.BONE.2011.10.010
202. Dieppe P. Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7(3):325-326. doi:10.1053/JOCA.1998.0182
203. 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. doi:10.1016/J.ARTHRO.2014.05.021
204. Guadilla J, Fiz N, Andia I, Sánchez M. Arthroscopic management and platelet-rich plasma therapy for avascular necrosis of the hip. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(2):393-398. doi:10.1007/S00167-011-1587-9

205. Kyllönen L, D'Este M, Alini M, Eglin D. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta Biomater.* 2015;11(1):412-434. doi:10.1016/J.ACTBIO.2014.09.006
206. Sanchez M, Anitua E, Cugat R, et al. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *J Orthop Trauma.* 2009;23(1):52-59. doi:10.1097/BOT.0b013e31818faded
207. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(2):213-232. doi:10.1517/14712598.2016.1118458
208. Roffi A, di Matteo B, Krishnakumar GS, Kon E, Filardo G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *Int Orthop.* 2017;41(2):221-237. doi:10.1007/S00264-016-3342-9
209. Zhen G, Wen C, Jia X, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* 2013;19(6):704-712. doi:10.1038/NM.3143
210. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al. Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2012;30(6):943-949. doi:10.1002/JOR.22029
211. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(8):1077-1089. doi:10.1016/J.JOCA.2014.05.023
212. Seidel MF, Herguijuela M, Forkert R, Otten U. Nerve growth factor in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;40(2):109-126. doi:10.1016/J.SEMARTHRT.2009.03.002
213. Muiños-López E, Delgado D, Sánchez P, et al. Modulation of Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells by Intra-Articular and Intraosseous Platelet Rich Plasma Administration. *Stem Cells Int.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/1247950
214. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* 2012;51(2):249-257. doi:10.1016/J.BONE.2012.02.012
215. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(11):625-635. doi:10.1038/NRRHEUM.2010.159
216. Toh WS, Brittberg M, Farr J, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop.* 2016;87(sup363):6-14. doi:10.1080/17453674.2016.1235087
217. Moussa M, Lajeunesse D, Hilal G, et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res.* 2017;352(1):146-156. doi:10.1016/J.YEXCR.2017.02.012
218. Descalzi F, Ulivi V, Cancedda R, et al. Platelet-rich plasma exerts antinociceptive activity by a peripheral endocannabinoid-related

- mechanism. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(19-20):2120-2129.
doi:10.1089/TEN.TEA.2012.0557
219. Richardson D, Pearson RG, Kurian N, et al. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2).
doi:10.1186/AR2401
220. Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJB, Shintani N. An educational review of cartilage repair: precepts & practice--myths & misconceptions--progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(3):334-350.
doi:10.1016/J.JOCA.2014.12.011
221. Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, et al. An In Vitro Investigation of Platelet-Rich Plasma-Gel as a Cell and Growth Factor Delivery Vehicle for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(1):49-58.
doi:10.1089/TEN.TEC.2015.0223
222. Altman RD, Devji T, Bhandari M, Fierlinger A, Niazi F, Christensen R. Clinical benefit of intra-articular saline as a comparator in clinical trials of knee osteoarthritis treatments: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;46(2):151-159.
doi:10.1016/J.SEMARTHRT.2016.04.003
223. Bannuru RR, Schmid CH, Kent DM, Vaysbrot EE, Wong JB, McAlindon TE. Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2015;162(1):46-54. doi:10.7326/M14-1231
224. Hunziker EB, Quinn TM, Häuselmann HJ. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(7):564-572. doi:10.1053/joca.2002.0814
225. Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: Combination of intra-articular and intraosseous injections of Platelet Rich Plasma. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(5):627-643. doi:10.1517/14712598.2016.1157162

SECCIÓN II



7. CONCLUSIONES

1. Las infiltraciones intraóseas de PRP previenen *in vivo* la adipogénesis y la osteoclastogénesis de la médula ósea asociadas al envejecimiento y diversas patologías, manteniendo una estructura ósea más sana.
2. El efecto biológico *in vivo* de las infiltraciones intraóseas de PRP en la médula ósea es mayor cuando procede de donante joven, el cual muestra además una composición molecular de perfil menos proinflamatorio que el PRP obtenido de donantes de edad avanzado.
3. En cultivos celulares, el PRP, actúa como procesos de modulación para las células del SNC, reduciendo la apoptosis de las células progenitoras neurales, estabilizar las sinapsis neuronales y disminuir la inflamación de la microglía.
4. El efecto del PRP de donante joven tiene un mayor efecto sobre los cultivos del SNC, posiblemente debido a una composición molecular diferente, presentado el PRP de donantes de edad avanzada niveles más altos de moléculas inherentes al envejecimiento, la inflamación y condiciones patológicas crónicas. Por lo tanto, la composición molecular del PRP, condicionada por la edad del donante, afecta a la magnitud de la respuesta biológica.
5. En el estudio clínico, las infiltraciones intraarticulares de PRP en la artrosis de rodilla severa no mejoraron la sintomatología del paciente, La combinación de infiltraciones intraarticulares e intraóseas de PRP no fue clínicamente superior a las intraarticulares a los 2 meses.
6. Las infiltraciones combinadas intraarticulares e intraóseas de PRP mostraron una mayor reducción del dolor y una mejoría en la funcionalidad articular a los 6 y 12 meses.

