

## TERAPIAS REGENERATIVAS ALTERNATIVAS: VERSATILIDAD DE USO, ALCANCES Y UTILIDAD EN TENDINOPATIAS EN LA PRACTICA CLINICA EQUINA.

Christian Tuemmers\* & Angélica Saldivia

Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Medicina Veterinaria, Casilla 15-D, Temuco, Chile.

\*Autor para correspondencia: ctuemmers@uct.cl

### Resumen.

A pesar de la alta actividad metabólica de los tenocitos y los esfuerzos terapéuticos vigentes, los tendones dañados se recuperan mediante la reparación en lugar de la regeneración, resultando en un tejido que no posee las mismas características del tendón original que permitan al equino retomar actividades competitivas. Frente a estos escenarios es que se han desarrollado numerosas terapias regenerativas, desde terapias autólogas que involucran la utilización de células mesenquimales y plasma rico en plaquetas, hasta diversas estrategias de ingeniería tisular y terapia génica. La recuperación organizada que mantiene la integridad del tejido original es extremadamente compleja, lo que se traduce en el inevitable proceso de reparación tisular con la utilización del tratamiento convencional, mientras que el uso de estas terapias regenerativas aumenta las posibilidades de lograr un tejido idéntico al original. No obstante, el uso de estas terapias no está exenta de limitantes relacionadas principalmente a las fallas terapéuticas y a la elección de la misma.

Palabras clave: terapias, tendones, equinos.

### Abstract

Despite the high metabolic activity of tenocytes and existing therapeutic efforts, damaged tendons recover by repairing instead of regeneration, resulting in a fabric that does not have the same characteristics of the original tendon that allow the horse to resume competitive activities. Against this scenario that have developed numerous regenerative therapies, since autologous therapies involving use of mesenchymal cells and platelet-rich plasma, to various tissue engineering strategies and gene therapy. however, recovery organized to keep the integrity of the original fabric is extremely complex, resulting in the inevitable process of tissue repair with the use of conventional therapy, while the use of these regenerative therapies increases the chances of achieving tissue identical to the original. However, the use of these therapies is not without limitations mainly related to therapeutic failures and choice thereof.

Keywords: therapy, tendons, horses.

### Introducción.

Las enfermedades musculo esqueléticas en el equino son afecciones comunes, que muchas veces incurren en trastornos debilitantes de tendones y ligamentos que conducen a cuadros de cojera persistente e incurable y a la necesidad del sacrificio (Halper et al., 2006), lo cual se traduce en reducción de la vida útil de los equinos de deporte y con ello importantes pérdidas económicas (Carmona et al., 2011). Existen estudios que señalan que estas pérdidas económicas alcanzan el 82% de los caballos de carreras, de los cuales 46% corresponden a lesiones tendinosas o ligamentosas y 53% a daños por sobre distensión de estas estructuras en equinos con aptitudes de carreras de vallas y saltos de obstáculos (Thorpe et al., 2010). Las lesiones tendinosas son una de las causas más comunes de invalidez en el caballo de alto rendimiento, siendo motivo más frecuente de la jubilación de los pura sangre, según el estudio epidemiológico de 12 años en base a los registros de la historia clínica del Hong Kong Jockey Club (Lam, 2013). La mayoría de estas lesiones se producen en las extremidades anteriores (97-99%), siendo el tendón flexor digital superficial (TFDS) a nivel de la región media del metacarpo, donde presenta su área más vulnerable (Tuemmers et al., 2005) y a su vez es la tendinopatía que presenta la más alta incidencia (75-93% de los casos) debido a la tensión desigual a la que se somete durante la locomoción (Thorpe et al., 2010), generando frecuentes tendinopatías cuya forma clínica es de tipo crónica y degenerativa (Denoix, 1999). Las estrategias de

tratamiento para lesiones tendinosas varían considerablemente (Kaneps, 2007) y muchos clínicos establecen el tratamiento basándose en experiencias clínicas previas (Paavola et al., 2002), de las cuales muchas no contemplan tratamientos racionales basado en conocimientos actuales (Roger & Michael, 2003), recurriendo a abordajes terapéuticos discontinuados, como lo son muchos procedimientos quirúrgicos (desmonotomía y escisión de cuerpos tendinosos) (Smith et al., 2002) y no justificados como las puntas de fuego (Carmona & López, 2011). Los tratamientos comúnmente utilizados no dan lugar a una cura definitiva del problema por lo que la mayoría de los pacientes presentan recaídas o no recuperan su capacidad atlética inicial (Denoix, 1999). Probablemente a causa de la inadecuada respuesta celular con respecto a la magnitud del daño inicial o al propio tejido de reparación el cual no posee una composición y organización adecuada ya que los tendones lesionados se recuperan mediante la reparación en lugar de la regeneración (Fortier & Smith, 2008).

El plasma rico en plaquetas surge como una alternativa terapéutica que tiene como objeto utilizar los factores de crecimiento intragranulares contenido en estos preparados. Estas concentraciones supra fisiológicas logran la regeneración de las estructuras tendíneas. La utilización de esta terapia de origen autólogo es una realidad estudiada desde la década de los 70 (Coloma et al., 2011) y se ha incrementado su utilización en medicina humana y en menor medida en medicina equina, lo que hace el tema interesante pero no claro y reivindica más investigaciones (Carmona et al., 2009).

#### Morfofisiología de tendones equinos.

En cada extremidad equina se pueden identificar tres partes anatómicas principales: Tendón flexor digital superficial y su ligamento accesorio, el tendón flexor digital profundo con sus respectivos ligamentos accesorios y el aparato suspensorio, compuesto por el tercer músculo interóseo, el escudo proximal, los ligamentos sesamoideos distales y la brida extensora (Carmona & López, 2011). La anatomía de estos tendones y ligamentos varían entre miembros anteriores y posteriores debido a la tensión desigual a la que se someten durante la locomoción (Thorpe et al., 2010). No obstante, las articulaciones interfalángicas distales son las más afectadas principalmente por la orientación y manipulación del casco por el herraje y recorte del mismo (Denoix, 1999).

Los tendones y ligamentos son estructuras muy parecidas desde el punto de vista ultraestructural (Carmona & López, 2011). Su principal función es transmitir la fuerza generada por el músculo a un hueso y así permitir la locomoción (Rigozzi, 2011), ya sea para posicionar la extremidad correctamente (Thorpe et al., 2010) o para almacenar energía de deformación elástica, devolviéndola por retroceso elástico como mecanismo de ahorro de energía de trabajo de contracción (Alexander, 1991). Macroscópicamente los tendones son estructuras muy parecidas entre sí, se presentan como macroestructuras de tejido conectivo denso que conectan el vientre muscular a un elemento esquelético distal, llamados unión miotendinosa y osteotendinosa respectivamente (Khan et al., 1999). La unión miotendinosa posee menor importancia clínica a causa de la baja incidencia de afecciones tendíneas en esa región, la cual es altamente especializada y en donde la tensión generada por las fibras musculares se transmite desde de las proteínas intracelulares contráctiles a las proteínas del tejido conectivo extracelular (fibrillas de colágeno) (Alexander, 1991). Por otra parte la unión osteotendinosa es un punto clave en muchas de las tendinopatías por sobre uso, es una región especializada en donde el tendón viscoelástico transmite la fuerza a una estructura ósea más rígida. En este punto de unión se distinguen cuatro zonas a la microscopía de luz las que comprenden al tendón, fibrocartilago, fibrocartilago mineralizado y tejido óseo (Khan et al., 1999). Microscópicamente se pueden distinguir los fascículos con sus respectivos septos interfasciculares, los cuales constituyen su "estructura de engarce" que permiten al tejido cierta flexibilidad, así como una rigidez a la compresión baja (Denoix, 1999). Los fascículos funcionan de manera independiente (Carmona & López, 2011), poseen un tamaño variable que va desde los 50 a 300  $\mu\text{m}$  (Thorpe et al., 2010) y están constituidos por fibras y fibrillas de colágeno de 20  $\mu\text{m}$  y 350 nm respectivamente, que a su vez están constituidos por subunidades de microfibrilla 10 nm que contienen unidades de tropocolágeno, una cadena de polipéptido de triple hélice de 1,4 nm, siendo esta la unidad básica de molécula de colágeno del tendón (figura1) (Khan et al., 1999). Todo el tendón está cubierto por el epitendón, una fina vaina de tejido conectivo laxo, que se extiende profundamente en el tendón entre los haces terciarias como endotendón.

Este contiene la inervación, el suministro vascular y linfático (Khan et al., 1999), estos últimos favorecen el transporte de nutrientes, enzimas proteolíticas (metaloproteinasas de la matriz), mediadores de la inflamación, entre otros (Bosch et al., 2011). Superficialmente, el epitendón está rodeado de un tejido conectivo laxo areolar llamado paratendón, el cual consta esencialmente de fibrillas de colágeno tipo I y tipo III, algunas fibrillas elásticas y un revestimiento interior de las células sinoviales. Juntos, el paratendón y epitendón se conocen como peritendón (Khan et al., 1999). Las células que forman los tendones son fibroblastos especializados llamados tenocitos, células cónicas planas distribuidas con moderación entre las fibrillas de colágeno, que cumplen la función de regular la formación del conjunto extracelular de procolágeno encolágeno maduro (Bosch et al., 2011). En mayor medida sintetizan la matriz extra celular sustancia fundamental (Carmona & López, 2011) compuesta por un gel amorfo que contiene de 65 a 70% de agua además de una pequeña porción (5 % de peso seco del tendón) de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales, los cuales juegan un importante papel en las interacciones célula-célula y célula-matriz, la fibrillogénesis, control del diámetro de las fibrillas de colágeno y la agregación de estas (Dahlgren, 2007). La porción fibrosa de la matriz extracelular está compuesta de colágeno y elastina. Esta última compone de 1 a 2% del peso seco del tendón, pero es importante para la elasticidad del mismo (Dahlgren, 2007).

#### Biomecánica del tendón equino.

Durante el periodo de crecimiento del tendón, con su respectiva madurez esquelética, el equino experimenta diversas microlesiones e injurias celulares provocadas por hipertermia a causa de la fatiga constante producida en su actividad atlética (Pool & Meagher 1990). Durante este periodo una proteína no colágena es particularmente abundante, la proteína oligomérica de la matriz del cartílago, la cual se correlaciona con la madurez esquelética ya que es un mediador importante en el crecimiento del tendón y su cantidad disminuye a medida que el animal envejece, por lo que bajos niveles de COMP en tendón durante el crecimiento o por pérdida inducida por el ejercicio indicaría caballos propensos a la lesión en el tendón (Crevier-Denoix et al., 1997). Además, se ha determinado que existen importantes variaciones en cuanto a la cantidad de esta proteína en las distintas poblaciones equinas lo que podría explicar el “amplio rango de variación en las propiedades mecánicas de los tendones entre individuos y razas de equinos” (Carmona y López 2011).

Los tendones poseen la capacidad de almacenar y devolver la energía de manera eficiente ya que devuelve la energía almacenada en un punto apropiado en el ciclo de la marcha (Rigozzi, 2011), protegiendo de esta manera las fibras musculares de las fuerzas de tensión (Thorpe et al., 2010). Este aparato elástico se encarga principalmente de dar soporte al menudillo, prevenir la hiperextensión del carpo, amortiguar la energía del impacto y sostener completamente el peso corporal durante la propulsión (Carmona & López, 2011). El tendón bajo carga de tracción presenta un comportamiento de tensión de formación típico que responde a deformaciones no lineales frente a la carga (Rigozzi, 2011), las cuales pueden generar una gran extensión en el tendón pudiendo llegar a un límite crítico (Thorpe et al., 2010). Si la carga sobrepasa este punto crítico, se produce el fenómeno llamado deformación plástica, que precede a la tendinopatía (Dowling, et al., 2000) y por el contrario, si la tensión de la carga no supera el límite crítico el tejido vuelve a su estado normal gracias a su naturaleza viscoelástica, eliminando parte de la energía almacenada en forma de calor (figura 3) (Carmona y López, 2011) pudiéndose alcanzar temperaturas intratendinosas de 45 ° C en el animal in vivo durante el galope sostenido (Goodship et al., 1994). Si bien la exposición a temperaturas sobre los parámetros fisiológicos provocan muerte celular en la mayoría de los tejidos (Thorpe, et al., 2010), se ha probado la resistencia de los tenocitos cultivados in vitro a temperaturas desde 42.5 ° C (Goodship, et al., 1994) hasta 48°C durante un período de 10 min (Birch, et al., 1997). Si bien se ha probado la supervivencia de los tenocitos a estas elevadas temperaturas (figura 2), se ha demostrado que por encima de 45 ° C (Wilson & Goodship, 1994) los tenocitos equinos liberancitoquinas pro-inflamatorias que aumentarían la actividad de enzimas degradantes de la matriz extracelular (Hosaka et al., 2002). La falta de riego sanguíneo en el tendón contribuye al aumento de la temperatura ya que el calor se disipa de forma relativamente lenta (Thorpe et al., 2010), fenómeno que acompañado del pobre suministro de sangre puede resultar en niveles bajos de oxígeno en el tendón, lo que a su vez compromete aún más el metabolismo celular que es un proceso fundamental para el mantenimiento de los componentes de la matriz (Birch et al., 1997). Los tenocitos obtienen su energía a través del metabolismo oxidativo por lo que su actividad de

síntesis y de degradación puede ser comprometido por los niveles bajos de oxígeno (Thorpe et al., 2010). Cabe destacar que repetidas microlesiones e injurias celulares provocadas por hipertermia pueden comprometer el metabolismo celular de los componentes de la matriz.

#### Opciones terapéuticas.

Las estrategias terapéuticas empleadas por los clínicos para lesiones tendíneas varían considerablemente (Kaneps, 2008), basando el tratamiento muchas veces solo en la experiencias clínicas previas (Paavola et al., 2002), muchas de las cuales no contemplan tratamientos racionales basados en conocimientos actuales (Roger & Michael, 2003), recurriendo a abordajes terapéuticos discontinuados y no justificados como las puntas de fuego (Carmona & López, 2011) y la utilización de muchos procedimientos quirúrgicos tales como desmotomía y escisión de cuerpos tendinosos (Smith et al., 2002). Los protocolos terapéuticos vigentes abarcan desde confinamiento con el fin de otorgar reposo, fisioterapia (hidroterapia fría, hielo, Ultrasonido, Laser, Campos magnéticos pulsátiles, electroterapia en general), kinesiología que contempla masajes, estiramientos, técnicas específicas como terapia de puntos de esfuerzo (Katelborn, Ciriak) (García Liñeiro, 2012), vendaje y control farmacológico de la inflamación para cuadros leves, programas de ejercicio controlado y controles ecográficos para cuadros más complejos (Dowling et al., 2000). Los antiinflamatorios esteroidales inyectables son bien tolerados y eficaces para la tendinitis en el corto plazo (Gaujoux-Viala et al., 2009) y constituyen una medida rápida para el alivio inmediato del dolor (Halper, et al., 2011), sin embargo, sus resultados son similares a tratamientos combinados que incluyen antiinflamatorios no esteroidales y no se demuestra ningún beneficio a largo plazo (Gaujoux-Viala et al., 2009). Se debe considerar que su uso debe limitarse dentro de las primeras 24 a 48 horas para evitar fibroplasia (Smith & Schramme, 2003).

Estos protocolos terapéuticos se acompañan de medidas preventivas basados en el conocimiento actual sobre los eventos fisiopatológicos en el tendón lesionado (Roger y Michael, 2003). A pesar de la alta actividad metabólica de células tendíneas y los esfuerzos terapéuticos mencionados anteriormente, los tendones lesionados se recuperan mediante la reparación en lugar de la regeneración (Fortier y Smith, 2008). Este tejido reparado no posee las mismas características del tejido original que permitan al equino retomar las actividades competitivas habituales (figuras 4 y 5), probablemente a causa de la inadecuada respuesta celular con respecto a la magnitud del daño inicial, o al propio tejido de Pronóstico de equinos de carreras del National Hunt gravedad vuelta al trabajo vuelta a carrera período de descanso: leve 100%- 63% 10-2 meses; moderado 50% 30% 11-3 meses; grave 30% 23% 18 meses.

Pronóstico según gravedad de la lesión en el tendón de una serie de 153 caballos de carreras Standardbred capaces de terminar su carrera deportiva sin recaída leve (n=24) 42%; moderado (n=28) 29%; grave (n=45) 11%; reparación, la cual no posee una composición y organización adecuada, que otorguen propiedades "mecánicas capaces de soportar las fuerzas de tracción necesarias para volver al nivel anterior de funcionamiento" (Dahlgren, 2007). Por lo anterior, el plasma rico en plaquetas surge como una alternativa terapéutica que tiene como objeto utilizar los factores de crecimiento intragranulares contenidos en preparados de concentraciones plaquetarias a dosis suprafisiológicas, para lograr la regeneración de las estructuras tendíneas (Carmona et al., 2009).

#### Terapias regenerativas.

##### Ingeniería tisular.

Langer & Vacanti (1993) definen la ingeniería tisular como "un campo interdisciplinario, que aplica los principios de la ingeniería y ciencias de la vida, para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido", utilizando uno o varios métodos como soportes o biomateriales (scaffolds), factores de crecimiento y aportes de células madre o diferenciadas (Saxena, 2005). La ingeniería de tejidos ha desarrollado importantes avances terapéuticos como cultivos de tejido vesical y trasplante de tráquea cultivada in vitro en humanos, sin embargo los datos disponibles para la regeneración tendínea sigue siendo insuficiente para permitir una conclusión definitiva sobre su uso (Giuseppe Longo et al., 2012) y en el consecuente desarrollo de estrategias que darán lugar a un producto clínicamente eficaz y comercialmente exitoso (Shearn et al., 2011). Estos estudios se dificultan ante la imposibilidad de obtención de buenos modelos in-vivo e in-vitro que permitan el estudio de la diferenciación de células del tendón y los

insuficientes conocimientos sobre la biología del desarrollo del tendón en cuanto a la incidencia de la señalización celular en la formación y desarrollo de estos.

#### Utilización en tendinopatías.

Los biomateriales o scaffolds constituyen el soporte estructural sobre el cual se siembran las células permitiendo el desarrollo tridimensional del tejido. Su uso en tendones flexores no ha sido muy estudiado, pero se han combinado con tenocitos en un esfuerzo para diseñar un injerto de tendón autólogo (Cao et al., 2002). La justificación de su uso radica en la posibilidad de incrementar la mejora de la tasa y la calidad de la curación biológica. Sin embargo, el uso clínico de este método se complica a causa del deslizamiento del tendón y las consecuentes variaciones de su tamaño, además de la falta de espacio a reparar dentro de una vaina sinovial, por lo que en la actualidad existen numerosas preguntas relacionadas con la indicación, aplicación quirúrgica, seguridad, mecanismo de acción y eficacia que aún no se han aclarado o dirigido (Longo et al., 2012).

#### Terapia Génica.

La terapia génica consiste en la transferencia de genes terapéuticos específicos en el núcleo de la célula diana, donde el gen puede ser decodificado y producir proteína con actividad terapéutica. Para ello se utilizan vectores no virales (sintéticos), los cuales corresponden a moléculas sintéticas que facilitan la captación de ADN en células por condensación de este con lípidos, péptidos, proteínas, cristales de calcio fosfato, o microproyectiles recubiertos (Ronchera & González, SCM, 2002). Por otra parte, los vectores virales son frecuentemente utilizados, ya que poseen una mayor eficiencia de la entrega de genes que los vectores no virales. Si bien se han identificado muchos virus con potencial uso como vectores para esta terapia, los retrovirus y adenovirus han demostrado ser los más útiles; (Zanlungo et al., 1999). Los retrovirus integran su ADN (incluyendo una secuencia de gen de interés) en el cromosoma de las células diana, lo que permitiría la transferencia de genes a la progenie de las células diana (Ronchera & González, SCM, 2002). Sin embargo, la integración de este segmento de ADN que codifica un gen de interés no garantiza la expresión de dicho gen, por lo que los adenovirus son los vectores virales más prometedores para la transferencia génica en la práctica clínica ya que poseen una alta capacidad de transducción en células de alta y nula tasa de replicación. La principal y más común limitante de este vector es la corta duración de la expresión del transgen, debido principalmente a que la integración del ADN adenoviral se mantiene como un elemento episomal o extracromosómico (Frisbie & McIlwraith, 2001).

Una vez seleccionado el vector se opta por una de las dos metodologías básicas para la transferencia génica. La más usada en Medicina Veterinaria y humana, considera la recolección de células del paciente a tratar, las cuales se cultivan y se le transfieren los genes terapéuticos deseados. Una vez que se prueba el comportamiento y/o acción deseada se procede a reimplantar las células modificadas genéticamente al paciente.

El segundo método hace referencia a la transferencia directa del vector a los tejidos diana in vivo. Si bien este método no permite extensas pruebas de seguridad, representa una posibilidad de ampliar masivamente este campo terapéutico a la práctica clínica, debido a la gran utilidad y facilidad de aplicación. Para validar la utilización de esta terapia en patologías musculoesqueléticas se han realizado estudios que demuestran la expresión de la proteína IL-1ra en cultivos in vitro (Abellanet, 2009) y la efectividad de esta terapia en modelos de pacientes equinos con osteoartritis, los cuales demostraron reducción de la cojera y mejoras visibles al examen macroscópico de las articulaciones tratadas, consecuentes con la significativa mejoría en las estructuras histológicas y reducción de la efusión sinovial (Frisbie & McIlwraith, 2001).

Las principales limitaciones prácticas de esta terapia radican en la activación de la respuesta inmune del paciente frente al vector de origen viral que actúa como antígeno, lo que conlleva a problemas de intolerancia (Abellanet, 2009). A pesar de los estudios de otros vectores, aun no se logra establecer ningún estado de tolerancia inmunogénica (Kay et al., 1997) ni aplicar esta terapia a la regeneración tendinosa debido a que se precisa de un mayor conocimiento de los genes que intervienen en el metabolismo articular.

#### Células mesenquimales autólogas

En Medicina Equina la mayoría de los estudios se están realizando con células mesenquimales autólogas obtenidas a partir de aspirados de médula ósea, de tejido graso (Tuemmers et al., 2012) o de sangre periférica. Los dos primeros métodos son los más utilizados en medicina equina mientras que la obtención de células a partir de sangre periférica son estudios experimentales referidos solo a medicina

humana (Higuchi et al., 2008). Se pueden obtener grandes cantidades de células mesenquimales autólogas a partir de tejido adiposo obtenido principalmente de la denominada grasa coccígea, en la base de la cola, el cual constituye el sitio más accesible en equinos con musculatura desarrollada, pudiéndose extirpar quirúrgicamente usando sedantes y anestesia local (Tuemmers et al., 2012). Por otra parte, se utilizan frecuentemente las células mesenquimales autólogas de la medula ósea, las cuales corresponden a un subconjunto de células no hematopoyéticas, que tras ser aisladas poseen un elevado nivel de replicación sin alteraciones en su potencial diferenciación (Baghaban et al., 2009).

Estudios recientes hacen referencia a los buenos resultados obtenidos con el uso de esta terapia, logrando que un 80% de los equinos tratados volvieran a competición. En comparación con el 30% de los tratados tradicionalmente, reduciendo su tasa de recaída a la mitad (Godwin et al., 2011). Observaciones realizadas por Pacini et al., (2007) determinaron que la implantación de células estromales mesenquimales pueden diferenciarse en tenocitos. Estos logran la recuperación clínica sin el uso de biomateriales adicionales. En estas observaciones 9 de 11 caballos de carreras tratados, las etapas iniciales de la regeneración tendínea se iniciaron al primer mes de tratamiento y regeneración prácticamente completa a los 6 meses de tratamiento, logrando fibras colágenas orientadas correctamente sin deposición de tejido óseo ectópico. Estos parámetros fueron evaluados bajo análisis de ultrasonido y su capacidad de volver a la competición. Las fallas terapéuticas probablemente se generarían a causa de la demora en la implantación del tratamiento que deriva en un exceso de fibrosis. Existen otras limitantes como la imposibilidad de depositar el cultivo celular si la lesión no supera el 30% de la sección del tendón (Abellonet, 2009) y el riesgo de osificación, debido al agotamiento de componentes específicos de la matriz extracelular que afecta a la diferenciación de células madres progenitoras de tendón (Tuemmers et al., 2012).

#### Estructuras plaquetarias.

##### Membrana plaquetaria.

La unidad de membrana de plaquetas es similar (figura 7) a la membrana de otra célula sanguínea dado que es una bicapa lipídica rica en fosfolípidos que proporciona una separación fisicoquímica entre los procesos intracelulares y extracelulares (Boudreaux, 2010) que contienen bombas de aniones y cationes (Na / K-ATPasa), esenciales para el mantenimiento de los gradientes iónicos transmembrana. (Spencer & Becker, 1997).

La membrana de las plaquetas es un catalizador importante para la coagulación de fase líquida (Spencer & Becker, 1997). La zona periférica de la membrana se caracteriza por una bicapa de fosfolípidos que posee colesterol, esfingolípidos y en un menor número, moléculas de proteína (Boudreaux, 2010). En esta membrana se distinguen los siguientes componentes: revestimiento exterior, capa fosfolipídica y región submembranosa (Spencer & Becker, 1997).

##### Revestimiento exterior o glicocalix.

Corresponde a una capa de 15-20 nm de espesor que rodea la plaqueta (Spencer & Becker, 1997). Esta se compone de glucoproteínas, las cuales constituyen los antígenos de membrana de las plaquetas que a su vez se dividen en tres familias: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas (Carmona et al., 2011).

##### Región submembranosa.

Bajo la capa fosfolipídica se encuentra la región submembrana, la cual posee una red de micro filamentos que están asociados (anatómicamente y funcionalmente) con glicoproteínas y un extenso filamento citoplasmático (Spencer & Becker, 1997). Estos microfilamentos están conformados por microtúbulos, los que corresponden a estructuras cilíndricas huecas compuestas de protofilamentos formados por dímeros de alfa- beta tubulina. Estos son responsables del mantenimiento de la forma de disco de la plaqueta en circulación. En condiciones fisiológicas normales,  $\beta$  1 -tubulina se expresa como un componente de los microtúbulos dentro de los megacariocitos, desempeñando un importante papel en la fragmentación ordenada de las plaquetas desde estos (Radin & Wellman, 2010). Además de contribuir en la mantención de la forma discoide de las plaquetas en reposo y desempeñar un papel importante en la señalización transmembrana (Spencer y Becker, 1997).

##### Sistema canalicular abierto y sistema tubular denso.

Otra estructura de suma importancia para la liberación del contenido granular plaquetario es el sistema canalicular abierto, el cual está conectado a la superficie de la plaqueta y que se extiende en lo profundo de su citoplasma, es extremadamente tortuoso y actúa como un conducto para la captación de

partículas, las que provocan la activación plaquetaria y con ello la liberación de contenido de los gránulos intracitoplasmáticos (Morrell, 2011). Por otra parte, el sistema tubular denso es un remanente del retículo endoplásmico liso de los megacariocitos (Spencer & Becker, 1997) y a diferencia del sistema canalicular abierto, este no se comunica con plasma o membranas de los gránulos, por lo que su función se limita a la síntesis de prostaglandina (Boudreaux, 2010).

#### Gránulos intraplaquetarios:

Las plaquetas tienen tres tipos principales de gránulos de almacenamiento: gránulos alfa (Harrison, 2005), lisosomales y cuerpos densos (figura 6) (Spencer y Becker, 1997). Estos gránulos plaquetarios son capaces de contener y liberar factores de crecimiento concentrados principalmente en los gránulos alfa (Sundman et al., 2011), las cuales se distinguen como las más grandes y numerosas estructuras azurófilas contenidas al interior de las plaquetas vistas por microscopía de luz (Boudreaux, 2010). Contienen proteínas que son sintetizadas por los megacariocitos así como las proteínas que son endocitadas en circulación (Radin & Wellman, 2010). Dividiendo las proteínas de gránulos alfa en dos categorías, los provenientes de megacariocitos (tales como beta-tromboglobulina, factor de crecimiento transformante beta, el factor plaquetario 4) y las que son sintetizadas por otras células, pero que se concentraron dentro de los gránulos alfa de las plaquetas tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y algunas citoquinas (Boudreaux, 2010). El contenido de estos gránulos, así como las proteínas de sus membranas, se liberan a la superficie plaquetaria tras la fusión de los gránulos con el sistema canalicular abierto y la membrana externa.

Los cuerpos densos se denominan de esa manera a causa de su elevada electrodensidad al ser observadas al microscopio electrónico y sirven como sitios de almacenamiento para adenina, nucleótidos, serotonina, calcio y fosfatos inorgánicos. Estos componentes se mantienen firmemente unidos mediante fuerzas intermoleculares (Spencer & Becker, 1997). Las proteínas de estos gránulos cumplen funciones que incluyen la señalización celular, glicólisis y proteínas implicadas en la estructura del citoesqueleto. Sus membranas contienen varios receptores que se expresan tras la fusión del gránulo con la superficie plaquetaria durante su activación (Boudreaux, 2010). Por otra parte, los gránulos lisosomales contienen hidrolasas como glicosidasas, proteasas, lipasas las cuales forman parte de la activación y de granulación plaquetaria (Boudreaux, 2010).

#### Factores de crecimiento intraplaquetarios.

Existen muchos factores de crecimiento a los cuales se han atribuido diversas propiedades demostradas en estudios *in vitro* o *in vivo*, los principios de cada factor se describen a continuación:

##### Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Es un poderoso inductor de proliferación celular (Chen, et al., 2009) al estimular el crecimiento de células pluripotenciales (Coloma et al., 2011), angiogénesis, expresión de las metaloproteínas de matriz (MMP)-1 y su inhibidor tisular (TIMP-1) en la última fase de la remodelación (Carmona et al., 2011). También se han reportado estudios que confirman su capacidad de estimular la proliferación de células epiteliales y fibroblastos (Maciel et al., 2012). Además, estimulan la angiogénesis al contribuir en la estabilización de los vasos nacientes tras provocar la proliferación de las células murales (pericitos). (Zhang & Uludağ, 2009). Estudios experimentales en equinos demuestran que la utilización de este factor unido a nano partículas de sulfato de calcio mejora la regeneración de tejido óseo (Zhang & Uludağ, 2009).

##### Factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Induce la proliferación celular y promueve la reepitelización (Carmona et al., 2011). *In vitro* regula significativamente los procesos de condrogénesis (Chen et al., 2009) así como el cambio de colágeno tipo I (Coloma, et al., 2011).

##### Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

Es un factor anti-apoptosis que promueve la migración celular (Coloma, et al., 2011) y participa de procesos de neovascularización en los tejidos lesionados (Carmona et al., 2011), promoviendo el crecimiento y maduración de los vasos sanguíneos nacientes (Zhang & Uludağ, 2009). Tal es su importancia para la neovascularización (proceso vital para la regeneración tendínea) (Kaneps, 2008), que se realizan investigaciones enfocadas a epítomimetismo, esto quiere decir, la similitud entre los agentes infecciosos y

auto-proteínas, que eventualmente podrían inducir una respuesta autoinmune contra la auto-moléculas. Lo que sería una útil herramienta terapéutica contra procesos neoplásicos (Zhang & Uludağ, 2009).

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Este péptido tiene efectos angiogénicos, puesto que incrementa la expresión de VEGF (Carmona et al., 2011).

Factor plaquetario 4 (PF-4).

Es un importante mediador inmune que participa activamente de diversos procesos fisiopatológicos que provoca quimiotaxis de leucocitos y adhesión de neutrófilos a las células endoteliales (Morrell, 2011), además de ser un péptido antiangiogénico, ya que bloquea los receptores celulares de FGF o VEGF (Carmona et al., 2011)

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ).

Posee efectos antifibróticos, promueve la síntesis del factor de crecimiento de fibroblastos (Coloma et al., 2011), la diferenciación / activación celular y regula el crecimiento celular al inducir apoptosis (Carmona & López, 2011).

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Posee como célula diana los fibroblastos y células musculares lisas de los vasos sanguíneos (Coloma et al., 2011). Es un potente factor angiogénico e inhibe la síntesis del colágeno tipo I, controlando de esta manera los depósitos de matriz extracelular (Carmona et al., 2011).

Factor de crecimiento insulínico (IGF).

Produce proliferación celular (Chen, et al., 2009) al suscitar la síntesis de colágeno en conjunto con PDGF (Coloma et al., 2011).

Betatromboglobulina ( $\beta$ -TG).

Estas quimiocinas producen quimiotaxis de neutrófilos y de granulación plaquetaria. En el último estado de inflamación la betatromboglobulina desensibiliza la de granulación de neutrófilos y actúan como proteínas antiinflamatorias.

Métodos de extracción y concentración plaquetarias.

Varios estudios demuestran diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos celulares de sangre entera y plasma rico en plaquetas obtenido a través de distintos métodos y de varias especies (Silva et al., 2011). El gel de plasma rico en plaquetas se ha utilizado en cirugía maxilofacial en pacientes humanos (Whitman et al., 1997). Posteriormente se realizaron estudios experimentales de esta terapia enfocado a la cicatrización de heridas tegumentarias (Carter et al., 2003) y tratamiento de quemaduras en pacientes equinos (Maciel et al., 2012). En ambos estudios, la preparación del gel de plasma rico en plaquetas se llevó a cabo tras la obtención de sangre entera la cual se centrifugó y agregó trombina para inducir la degranulación de las plaquetaria y así liberar los factores de crecimiento intragranulares, que en presencia de ácido ascórbico o calcio resulta en un gel. A través de estos trabajos se comprobó que el gel de plasma rico en plaquetas acelera la diferenciación epitelial y producción de tejidos organizados en heridas tegumentarias, reparación, fibrosis inducida y probablemente cierta actividad antibacteriana en caballos con quemaduras de segundo grado profundas (Carter et al., 2003), siendo la principal limitante de esta terapia, su restringido uso tópico.

Sistemas semiautomatizados de extracción y concentración plaquetaria.

Existen sistemas de extracción y concentración plaquetarias semiautomatizados, que reducen significativamente el riesgo de contaminación bacteriana respecto al método del tubo (Vasconcelos et al., 2006). Sistemas llamados Curasan y PCCS poseen la capacidad de aumentar la concentración plaquetaria, respecto a sistemas de centrifugación de laboratorio. Ambos difieren significativamente en cuanto a recuento trombocitarios (Weibrich & Kleis, 2002). El sistema PCCS es el que reporta la ganancia absoluta más alta en el recuento plaquetario, su concentración plaquetaria no supera las 5,0 veces en comparación con la sangre venosa mientras que con el sistema Curasan se obtiene la más alta concentración de plaquetas por micro L, esto es hasta 11,7 veces en comparación a la concentración plaquetaria en sangre venosa (Appel et al., 2002).

Posteriormente se desarrollaron sistemas semiautomatizados para la preparación de plasma rico en plaquetas en pacientes equinos denominado Secquire (PPAI Medical, Fort Myers, FL), este kit permite la recolección aséptica y aplicación intralesional inmediata a través de los aplicadores que dispone (Waselau et al., 2008) y SmartPreP2system (Harvest Technologies, Plymouth, MA) a través de este sistema se puede

obtener 10 ml de plasma rico en plaquetas y 20 ml de plasma pobre en plaquetas por cada 60 ml de sangre venosa (Schnabel et al., 2006), tras una centrifugación de la sangre entera recolectada junto a ácido citrato dextrosa (1000 rpm durante 14 min) (Prochazka, et al., 2012). El principal inconveniente de estos métodos son los costos y disponibilidad de los kits requeridos y centrífugas especializadas.

Sistema automatizado de extracción y concentración plaquetaria: Aféresis.

La contaminación bacteriana de productos plaquetarios y los cambios deletéreos en la estructura y su función que se refiere han restringido la vida útil de plaquetas a 5 días. El deterioro de la calidad de las plaquetas almacenadas a 22 °C es un proceso conocido como lesión de almacenamiento de plaquetas provocado principalmente por la activación plaquetaria, el metabolismo celular / función y la senescencia (apoptosis) (Shrivastava, 2009). Frente a estos fenómenos y ante la seguridad terapéutica de la técnica, es que el método de la aféresis cobra importancia, ofreciendo concentraciones plaquetarias que alcanzan valores de 8,9 veces (Sutter et al., 2004) hasta 14 veces mayor (Kaneps, 2008) en comparación con la sangre entera, además se han determinado las concentraciones comparativas de ciertos factores como la concentración de TGF-1 en el concentrado de plaquetas el cual está presente 2,8 veces más con el método de bufficoat y 4,3 veces mayor con el método de aféresis respecto a la sangre entera (Kaneps, 2008) y TGF-beta2 el cual es 3,6 veces mayor en concentrados plaquetarios obtenidos a través de aféresis, en comparación con la sangre entera (Sutter et al., 2004). El principal inconveniente de este método en la práctica clínica equina es el costo y disponibilidad de estos equipos, por lo que el método manual del tubo es la alternativa más usada para obtener concentrados plaquetarios en Latinoamérica y en algunos países de Europa continental (Carmona et al., 2011).

Método manual del tubo (simple y doble).

Método consistente en la centrifugación simple o doble de la sangre. En una primera instancia y tras la recolección de sangre entera con tubos que contienen citrato de sodio, se realiza una centrifugación (a 720 x g por 5 minutos.), de la cual se extrae el 50 % de plasma más cercano a la capa leucocitaria (Carmona et al., 2009) de la forma masa séptica posible (se recomienda estilete de un catéter intravenoso N° 14G de 6 cm). Para realizar el método de centrifugado doble en tubo se debe centrifugar nuevamente la colección realizada a través del método de centrifugado simple en tubo (720 x g por 5 minutos) (figura 8) (Álvarez et al., 2010), cabe destacar el método de centrifugado simple es capaz de producir una cantidad suficiente de plaquetas para el uso clínico (Mazzocca et al., 2012).

Estudios realizados en humanos determinan diferencias en el recuento de plaquetas de este método considerando su número de centrifugados, estas diferencias son de 336% y 227%, comprobando que el método de doble centrifugación es capaz de alcanzar concentraciones de plaquetas más altas que el sistema de una sola centrifugación. Sin embargo, el sistema de doble centrifugación provoca alteraciones en la ultraestructura del plasma rico en plaquetas, y a su vez es más sensible a pequeños errores durante la preparación (Tamimi et al., 2007).

Contaminación plaquetaria en el método tubo.

Diversas y recientes investigaciones indican las posibles propiedades antibióticas (Álvarez et al., 2010) y bacteriostáticas (Álvarez et al., 2011) del gel de plaquetas humano y equino in vitro, esto se debe a que las plaquetas de los mamíferos al ser activadas por trombina o microorganismos infecciosos son capaces de mediar la quimiotaxis de macrófagos (principalmente por factor plaquetario 4) y liberar proteínas microbicidas altamente eficaces contra microorganismos que comúnmente ingresan al torrente sanguíneo, tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Yount et al., 2004). A pesar de estas propiedades plaquetarias las reacciones sépticas son más comunes en las transfusiones de plaquetas en comparación con las de eritrocitos (Canellini et al., 2010), tal diferencia puede llegar a ser del 50 %, esto se debe a las diferencias en la cinética del crecimiento bacteriano, en función al tipo de componente sanguíneo. Los concentrados plaquetarios almacenados a 22°C parecen ser más propensos a la multiplicación bacteriana que los concentrados de glóbulos rojos (Störmer et al., 2007), es entonces que se debe considerar la contaminación bacteriana como la principal complicación, la cual se podría acrecentar debido al consumo o la desnaturalización de componentes del plasma con efectos humorales antibacterianos (Álvarez et al., 2011).

El principal problema para la detección de bacterias es la baja concentración inicial de estos microorganismos al momento de la extracción de sangre e inicios de la preparación del concentrado, razón

por la cual se deben conocer las características de crecimiento de los potenciales agentes bacterianos contaminantes (Störmer et al., 2007), ya que el riesgo de administrar un concentrado plaquetario contaminado con bacterias puede ser 1.000 veces mayor que la de la transmisión de patógenos virales (Ortolano et al., 2003).

Frente a este escenario es que se han desarrollado distintos métodos para la detección de patógenos bacterianos como cultivos bacterianos en placas cuantitativas, tinción gram en frotis, medición del pH y glucosa en los concentrados plaquetarios (Rahimkhani et al., 2008) y otros métodos más avanzados como la detección de bacterias a través de métodos genéticos y moleculares (Störmer et al., 2007), pero a pesar de estos considerables adelantos en la seguridad de los componentes de la sangre, la infección bacteriana asociada a la transfusión sigue siendo un problema sin resolver. Hasta el momento no existen metodologías de detección/prevenición y eliminación de unidades contaminadas perfectas (Seghatchian, 2001). Si bien el método del tubo es la técnica más utilizada, es a su vez la más expuesta a ser infectada. Se puede lograr un concentrado plaquetario libre de contaminación si se toman ciertos resguardos, ya que independiente del método utilizado para la obtención del concentrado plaquetario se debe considerar que las potenciales fuentes de contaminación bacteriana provienen de las manos y garganta del operario, la micropoblación saprofita del tegumento equino y los contaminantes ambientales (Álvarez et al., 2010), siendo el punto crítico la preparación de la piel en el sitio de la venopunción (Wenke et al., 2006), sobre la cual se recomienda una desinfección con una solución de povidona yodada y alcohol al 70% que no requiere previa tricotomía (Hague et al., 1997). Aún no se ha desarrollado un método o dispositivo ideal para concentrar plaquetas y factores de crecimiento, ya que todas presentan ventajas e inconvenientes (Carmona et al., 2011) al mismo tiempo que no se ha desarrollado ningún método de prevención para la detección perfecta que permita la eliminación de unidades contaminadas (Canellini et al., 2010). Una prueba de esterilidad bacteriana ideal debe ser rápida, asequible, suficientemente sensible, específica y fácil de realizar. Mientras este método se desarrolla el clínico debe utilizar diferentes y limitadas soluciones que al menos mejor en parcialmente la seguridad y esterilidad bacteriana de los componentes sanguíneos (Zimmermann et al., 2003). Cabe destacar que la posible acción antibacteriana de los concentrados ricos en plaquetas no se ha establecido (Maciel et al., 2012). Sin embargo, se cree que la concentración de un gran número de glóbulos blancos en los concentrados plaquetarios podría ser perjudicial para los tejidos tratados (Zimmermann et al., 2003).

Experiencias clínicas del uso de plasma rico en plaquetas en pacientes equinos.

Si bien existe información científica sobre los efectos positivos del plasma rico en plaquetas en lesiones de tejidos blandos de seres humanos, referidos a tendinopatías (Sánchez et al., 2007), esto no ocurre en medicina equina por lo que se requiere de investigaciones experimentales y clínicas estrictamente planificadas. Carmona et al., (2009) realizaron un estudio clínico piloto en el cual se obtuvo, mediante el método del tubo, el plasma rico en plaquetas que se administró a pacientes equinos con tendinopatías de distintos grados en cual se observaron mejorías en los parámetros clínico/ecográfico al final del estudio y una mejora en la apariencia cosmética del área lesionada después de la primera inyección. Pero esta investigación incluyó un bajo número de pacientes (n = 5) y no había un grupo control. Sin embargo, se estableció el tratamiento como seguro, ya que las inyecciones de plasma rico en plaquetas no indujeron reacciones adversas en los caballos tratados. En el mismo año Abellanet (2009) analizó el uso de plasma rico en plaquetas en 72 equinos que presentaban tendinopatía del tendón flexor digital superficial, los cuales presentaron una mejoría clínica del 80% v/s 45% con respecto al grupo control (n = 9), evidenciando recaída solo un 22% de los casos. En el mismo estudio se observó que los 10 equinos con distintos grados de afección del tendón flexor digital profundo presentaron una mejoría clínica y ecográfica del 100% en comparación con el 0% del grupo control (n=4) y una recidiva del 17% en los caballos tratados.

#### DISCUSIÓN.

Los diferentes procesos de regeneración/repación celular se consideran un punto crítico y determinante en la orientación terapéutica de las diferentes tendinopatías, dado que involucra tenocitos, una compleja regulación en la formación del conjunto extracelular de procolágeno en colágeno maduro dentro de una compleja estructura histológica y una matriz extracelular altamente especializada. A pesar de los esfuerzos que comprende el tratamiento convencional de la tendinitis que involucra manejo farmacológico, kinesioterápico y fisioterápico en un esfuerzo combinado y complementario para optimizar

los resultados (García-Liñeiro, 2012), estos son insatisfactorios, debido a la alta incidencia en la recurrencia de los casos, la cual varía desde el 20% a partir de 2 ó más carreras después de la lesión hasta 70 % después de 5 ó más episodios de esfuerzos físicos en equinos de deporte (Smith y Schramme, 2003).

Existen diversos estudios que justifican el uso de células mesenquimales autólogas, ya que los mismos hacen referencia a los buenos resultados obtenidos con el uso de esta terapia, logrando que hasta un 85,8% de los equinos tratados volvieran a competición (VetCells, 2007). Si bien esta terapia presenta una baja tasa de recaída que varía de un 35% (Lacitignola, et al., 2008) hasta 50% (Gutierrez Nibeyro, 2011), respecto al 43% a 93% tasa de recaída en pacientes tratados con el tratamiento convencional de 43% a 93% (Dahlgren, 2007), ésta se atribuye principalmente a la demora en la implantación del tratamiento que deriva en un exceso de fibrosis. Además, se han descrito procesos de osificación, debido al agotamiento de componentes específicos de la matriz extracelular que afecta a la diferenciación de células madre progenitoras de tendón y la imposibilidad de depositar el cultivo celular de células progenitoras si la lesión no supera el 30% de la sección del tendón (Abellanet, 2009).

El uso de otras terapias regenerativas como ingeniería tisular en la regeneración tendínea no ha sido estudiado, no obstante, se han combinado biomateriales con tenocitos en un esfuerzo para diseñar un injerto de tendón autólogo (Cao et al., 2002). La justificación de su uso radica en la posibilidad de incrementar la mejora de la tasa y la calidad de la curación biológica. Sin embargo, el uso clínico de este método se complica a causa del deslizamiento del tendón y las consecuentes variaciones de su tamaño (Abellanet, 2009), además de la falta de espacio a reparar dentro de una vaina sinovial (Thorpe, et al., 2010), por lo que en la actualidad existen numerosas preguntas relacionadas con la indicación, aplicación quirúrgica, seguridad, mecanismo de acción y eficacia que aún no se han aclarado o dirigido (Longo et al., 2012). Por otra parte el uso de la terapia génica en tendinopatías es extremadamente limitado debido a que se precisa de un mayor conocimiento de los genes que intervienen en el metabolismo articular y la imposibilidad de lograr un estado de tolerancia inmunogénica a pesar de los diversos tipos de vectores estudiados (Kay et al., 1997). El plasma rico en plaquetas tiene como objetivo utilizar en los factores de crecimiento intra-granulares contenido en las plaquetas en concentraciones suprafisiológicas, para lograr la regeneración de las estructuras tendíneas (Carmona & López, 2011). Estos factores de crecimiento favorecen la proliferación celular, expresión de proteínas específicas y angiogénesis (Coloma et al., 2011), siendo este último un proceso fundamental para la regeneración tisular ya que la falta de riego sanguíneo en el tendón contribuye al aumento de la temperatura, porque el calor se disipa de forma relativamente lenta (Thorpe et al., 2010), fenómeno que acompañado del pobre suministro de sangre puede resultar en niveles bajos de oxígeno en el tendón lo que a su vez compromete aún más el metabolismo oxidativo de los tenocitos, proceso fundamental para el mantenimiento de los componentes de la matriz (Birch et al., 1997).

Se han publicado diversos reportes clínicos que avalan el uso del plasma rico en plaquetas, los cuales coinciden en las mejoras de los parámetros clínico/ecográfico de la lesión tendínea y los bajos índices de recaídas, las cuales alcanzaron valores del 22% de los casos tratados con esta terapia (Carter et al., 2003), respecto al 50% de recidiva en los que se utilizó células mesenquimales autólogas (Gutierrez Nibeyro, 2011). El método del tubo es la técnica más utilizada ya que ha demostrado ser la opción más versátil, práctica y de bajo costo para concentrar y activar plaquetas, sin embargo y a pesar de las posibles propiedades bacteriostática/bactericida de estos preparados, el uso de este método implica el riesgo más alto de contaminación con la consecuente reacción séptica del paciente (Yount et al., 2004), debido a la composición plaquetaria del concentrado, el cual favorece la multiplicación bacteriana respecto a otros componentes sanguíneos y a procedimientos de preparación que requieren de alta esterilidad (Álvarez et al., 2011), condiciones que comúnmente no se consiguen en la práctica clínica. Frente a este riesgo de contaminación del plasma rico en plaquetas y la posterior reacción séptica del paciente es que se han desarrollado diversos sistemas de extracción y concentración plaquetarios en distintos grados de sistematización, los cuales reducen significativamente el riesgo de contaminación bacteriana. La utilización de estos se ve limitada por sus costes y su disponibilidad en el territorio nacional, lo que reduce drásticamente la versatilidad de estos dispositivos en la práctica clínica.

Considerando su eficacia y versatilidad se podría pensar que la inyección de plasma rico en plaquetas podría ser una nueva alternativa terapéutica promisoriosa para el tratamiento de las tendinopatías en el caballo, pero se requieren muchos más estudios al respecto, ya que debido a un bajo número de

pacientes en estudio, no se alcanzan diferencias estadísticas significativas, por lo que se requiere de nuevas investigaciones experimentales y clínicas estrictamente planificadas.

La recuperación organizada que mantenga la integridad del tejido original es compleja lo que se traduce en el inevitable proceso de reparación tisular con el tratamiento convencional, mientras que el uso de terapias regenerativas aumenta las posibilidades de lograr un tejido idéntico al original (Smith et al., 2003). Sin embargo, el uso de estas terapias no está exenta de limitantes relacionadas principalmente a las fallas terapéuticas y a la elección de la misma.

El plasma rico en plaquetas se presenta como una alternativa terapéutica regenerativa prometedora para el tratamiento de las tendinopatías en el caballo, siendo el método del tubo la técnica más versátil y de bajo costo para concentrar y activar plaquetas que, independiente de las posibles propiedades bacteriostáticas/bactericidas de estos preparados, el riesgo de contaminación con la consecuente reacción séptica del paciente, es extremadamente alto si se utiliza este método como técnica para conseguir el concentrado plaquetario (Álvarez et al., 2011). A pesar de la versatilidad de esta terapia se requieren muchos más estudios al respecto ya que debido a un bajo número de pacientes en estudio, no se alcanzan diferencias estadísticas significativas, por lo que se requiere de nuevas investigaciones experimentales y clínicas estrictamente planificadas.

El uso de otras terapias regenerativas como ingeniería tisular y terapia génica en la regeneración tendínea no han sido suficientemente estudiadas, por lo que en la actualidad existen numerosas preguntas relacionadas con la indicación, seguridad, mecanismo de acción y eficacia que aún no se han aclarado o dirigido. Por otra parte, se han registrado buenos resultados que mencionan la alta tasa de recuperación competitiva y mínima recaída en pacientes equinos de aptitud deportiva usando células mesenquimales autólogas que a diferencia del concentrado plaquetario, posee más limitantes y reacciones adversas, tal como el riesgo de osificación que complicaría aún más el cuadro clínico, debido al agotamiento de componentes específicos de la matriz extracelular que afecta a la diferenciación de células madre progenitoras de tendón “por lo que se requiere un enfoque alternativo que logre diferenciar completamente las células hacia el linaje de células deseado antes de su trasplante” (Tuemmers et al., 2012).

#### Bibliografía

- Abellonet, I. 2009. La terapia de lesiones de tejidos blandos y articulaciones con plasma rico en plaquetas en caballos de deporte: evidencia clínica y bioquímica que valida su utilización. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Alexander, R. M. 1991. Energy-saving mechanisms in walking and running. *Journal of Experimental Biology* 55-69.
- Álvarez, ME, Giraldo, CE, & Carmona, JU. 2010. Contaminación bacteriana en concentrados de plaquetas de caballos. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), 49-56.
- Álvarez, ME, López, C, Giraldo, CE, Samudio, I, & Carmona, JU. 2011 In vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(2), 155-161
- Appel, T., B. Pöttsch, J. Müller, J. von Lindern, S. Bergé & R. Reich. 2002. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clinical Oral Implants Research* 522-528.
- Baghaban, E., L. Taghiyar, M. Dehghan, F. Falahi & M. Kazemi. 2009. Equine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, differentiation and culture optimization. *Iranian Journal of Veterinary Research* 1-11.
- Birch, H., A. Wilson & A. Goodship. 1997. The effect of exercise-induced localized hyperthermia on tendon cell survival. *The Journal of Experimental Biology* 1703-1708.
- Bosch, G., M. Moleman, A. Barneveld, P. van Weeren & H. van Schie. 2011. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scandinavian Journal of Medicine & Science In Sports* 554-561.
- Boudreaux, M. K. 2010. Platelet Structure. En D. J. Weiss, & K. J. Wardrop, *Schalm's Veterinary Hematology*. Blackwell. Ames, Iowa, Usa. p. 561-568.

- Canellini, G., S. Waldvogel, K. Anderegg & J.D. Tissot. 2010. Bacterial Contamination of Platelet Concentrates: Perspectives for the Future. *Labmedicine -Service Régional Vaudois De Transfusion Sanguine. Epalinges, Switzerland.* p. 301-305.
- Cao, Y., Y. Liu, W. Liu, Q. Shan, S. Buonocore & L. Cui. 2002. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1280-1289.
- Carmona, JU, & López, C. 2011. Tendinopatía del tendón flexor digital superficial y desmopatía del ligamento suspensorio en caballos: fisiopatología y terapias regenerativas. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(3), 203-214.
- Carmona, JU, Prades, M, & Argüelles, D. 2009. Concentrados autólogos de plaquetas como tratamiento de lesiones de tejidos blandos del aparato locomotor en caballos. *Archivos de medicina veterinaria*, 41(1), 77-82.
- Carmona, JU, López, C, & Giraldo, CE. 2011. Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. *Archivos de medicina veterinaria*, 43(1), 1-10.
- Carter, C. A., D. G. Jolly, C. E. Worden, D. G. Hendren & C. J. Kaneb. 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology* 244-255.
- Chen, W.-H., H.-Y. Liu, W.-C. Lo, S.-C. Wu, C.-H. Chi, H.-Y. Chang y otros. 2009. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 5523-5533.
- Coloma, E. S., A. U. Rolon & M. A. Khoury. 2011. La actualidad del plasma rico en plaquetas en traumatología del deporte. *Asociacion Argentina De Traumatologia Del Deporte* 30-43.
- Crevier-Denoix, N., C. Collobert, P. Pourcelot, J. Denoix, M. Sanaa, D. Geiger y otros. 1997. Mechanical properties of pathological equine superficial digital flexor tendons. *Equine Veterinary Journal Supplement* 23-26.
- Dahlgren, L. A. 2007. Pathobiology of Tendon and Ligament Injuries. *Clinical Techniques In Equine Practice* 6: 168-173.
- Denoix, J. M. 1999. Functional Anatomy of the Equine Interphalangeal Joints. *Proceedings of The Annual Convention of The Aaep* 45: 174-177.
- Dowling, B., A. Dart, D. Hodgson & R. Smith. 2000. Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Veterinary Journal* 369-378.
- Fortier, L. A., & R. K. Smith. 2008. Regenerative Medicine for Tendinous and Ligamentous Injuries of Sport Horses. (Elsevier, Ed.) *Veterinary Clinics Equine Practice* 191-201.
- Frisbie, D. D. & C. W. McIlwraith. 2001. Gene Therapy: Future Therapies in Osteoarthritis. *Aaep Proceedings* 211-216.
- García Liñero, J. A. 2012. *Rehabilitacion Deportiva Del Atleta Equino* 1-8. Buenos Aires, Argentina.
- Gaujoux-Viala, C., M. Dougados & L. Gossec. 2009. Efficacy and safety of steroid injections for shoulder and elbow tendonitis: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis* 1843-1849.
- Giuseppe Longo, U., A. Lamberti, S. Petrillo, N. Maffulli y V. Denaro. 2012. Scaffolds in Tendon Tissue Engineering. *Stem Cells International* 1-8.
- Godwin, E. E., N. J. Young, J. Dudhia, I. C. Beamish & R. K. Smith. 2011. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal* 44:25-32.
- Goodship, A., H. Birch & A. Wilson. 1994. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 323-349.
- Gutierrez Nibeyro, S. D. 2011. Commercial cell-based therapies for musculoskeletal injuries in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27: 363-371.
- Hague, B., C. Honnas, R. Simpson, & J. Peloso. 1997. Evaluation of skin bacterial flora before and after aseptic preparation of clipped and non clipped arthrocentesis sites in horses. *Veterinary Surgery* 121-125.
- Halper, J., A. Khan, & E. Mueller. 2011. Degenerative Suspensory Ligament Desmitis – A New Reality. *Pakistan Veterinary Journal* 1-8.

- Halper, J., B. Kim, A. Khan, J. Yoon & P. Mueller. 2006. Degenerative suspensory Ligament desmitis as a systemic disorder characterized by proteoglycan accumulation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 409-424.
- Harrison, P. 2005. Platelet function analysis. Haemophilia Centre & Thrombosis Unit. Oxford: ELSEVIER. 111-123.
- Higuchi, A., M. Sekiya, Y. Gomei, M. Sakurai, W. Chen, S. Egashira y otros. 2008. Separation of hematopoietic stem cells from human peripheral blood through modified polyurethane foaming membranes. *Journal of Biomedical Materials Research* 853-861.
- Hosaka, Y., R. Kirisawa, E. Yamamoto, H. Ueda, H. Iwai & K. Takehana. 2002. Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse. *Journal of Veterinary Medical Science* 945-947.
- Kaneps, A. 2008. Platelet-Rich Plasma: A New Treatment for Tendon and Ligament Injuries in Horses. *New England Equine Medical and Surgical Center* 1-4.
- Kay, M. A., L. Meuse, A. M. Gown, P. Linsley, D. Hollenbaugh, A. Aruffo, y otros. 1997. Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4lg enhances persistence and secondary adenovirus mediated. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 4686-4691.
- Khan, K. M., J. L. Cook, F. Bonar y P. Harcourt. 1999. Histopathology of common tendinopathies. *Sports Medicine*, 393-408.
- Lam, K. 2013. Descriptive Analysis of Retirement of Thoroughbred Racehorses Due to Tendon Injuries in Hong Kong (1992 to 2004). En K. Lam, *Past and Future Vision of Veterinary Research: Study of Factors Affecting Racehorse Performance in Hong Kong*. Cambridge Scholars Publishing 15-19. Newcastle.
- Langer, R. & J. Vacanti. 1993. Tissue engineering. *Science* 920-926.
- Longo, U., A. Lamberti, G. Rizzello, N. Maffulli & V. Denaro. 2012. Synthetic augmentation in massive rotator cuff tears. *Journal of Sports Science and Medicine* 168-177.
- López, C, Giraldo, CE, & Carmona, JU. 2012. Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(2), 109-115
- Maciel, F.B., R. De Rossi, T.J. Módolo, R.C. Pagliosa, C.R. Leal, & A.A. Delben. 2012. Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns* 1-8.
- Mazzocca, A.D., M.B. McCarthy, D.M. Chowaniec, M.P. Cote, A.A. Romeo, J.P. Bradley, y otros. 2012. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. *Journal of Bone and Joint Surgery* 308-318.
- Morrell, C. N. 2011. Immunomodulatory Mediators in Platelet Transfusion Reactions. *American Society of Hematology* 470-474.
- Ortolano, G., L. Freundlich, S. Holme, R. Russell, M. Cortus, K. Wilkins y otros. 2003. Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. *Transfusion* 1276-1285.
- Paavola, M., P. Kannus, T. Järvinen, K. Khan, L. Józsa & M. Järvinen. 2002. Achilles tendinopathy. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2062-2076.
- Pacini, S., S. Spinabella, L. Trombi, R. Fazzi, S. Galimberti, F. Dini y otros. 2007. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering* 13(12): 2949-2955.
- Pool, R. & D. Meagher. 1990. Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1-30.
- Prochazka, V., H. Klosova & G. Lakka Klement. 2012. Methods and materials for treating burn injuries. *Related U'S' Apphcation Data*. United States.
- Radin, J. M. & M. L. Wellman. 2010. Granulopoiesis. En D. J. Weiss, & K. J. Wardrop, *Schalm's Veterinary Hematology* 43-49. Blackwell. Ames, Iowa, USA.
- Rahimkhani, M., S. Z. Alizadeh Mohammad & Y. Erfani. 2008. Microbial contamination detection methods in platelet concentrates. *Blood Transfus Organ* 265-274.
- Rigozzi, S. 2011. Structure and function in tendon: experimental studies on the ultrastructural determinants of tendon biomechanical function. A Dissertation Submitted to The ETH Zürich for The Degree of Doctor Of Sciences 1-138.

- Roger, S., & S. Michael. 2003. Tendon injury in the horse: current theories and therapies. *JOURNAL OF THE BRITISH VETERINARY ASSOCIATION* , 529-539.
- Ronchera, C. L. & J. M. González. 2002. Terapia Génica. En J. Bonal de Falgás, & M. C. Gamundi Planas, *Farmacia Hospitalaria* 919-927.
- Sánchez, M., E. Anitua, J. Azofra, I. Andía, S. Padilla & I. Mujika. 2007. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *The American Journal of Sports Medicine* 245-251.
- Saxena, A. K. 2005. Tissue engineering: Present concepts and strategies. *Journal Of Indian Association of Pediatric Surgeons* 14-19.
- Seghatchian, J. 2001. Bacterial contamination of blood components. *Transfusion And Apheresis Science* 147-150.
- Shearn, J., K. Kinneberg, N. Dymont, M. Galloway, K. Kenter, C. Wylie, y otros. 2011. Tendon tissue engineering: progress, challenges, and translation to the clinic. *Journal Of Musculoskeletal And Neuronal Interactions* 163-173.
- Shrivastava, M. 2009. The platelet storage lesion. *Transfusion And Apheresis Science* 105–113.
- Silva, R., C. Rezende, F. Paes-Leme & J. Carmona. 2011. Evaluación del método del tubo para concentrar plaquetas felinas: estudio celular.
- Smith, Korda, Blunn, & Goodship. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal* 99-102.
- Smith, R. & M. Schramme. 2003. Tendon injury in the horse: current theories and therapies. *Equine Practice* 529-539.
- Smith, R., M. Gerard, B. Dowling, A. Dart, H. Birch & A. Goodship. 2002. Correlation of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in equine tendon with mechanical properties: a proposed role for COMP in determining function-specific mechanical characteristics of locomotor tendons. *Equine Veterinary Journal Supplement* 241-244.
- Spencer, F. A. & R. C. Becker. 1997. Platelets: Structure, Function, and their Fundamental Contribution to Hemostasis and Pathologic Thrombosis. En R. C. Becker, *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis* 31-49. Norwell: Kluwer Academic Publishers.
- Störmer, M., U. Cassens, K. Kleesiek & J. Dreier. 2007. Detection of bacteria in platelet concentrates prepared from spiked single donations using cultural and molecular genetic methods. *Transfusion Medicine* 61-70.
- Sundman, E. A., B. J. Cole, & L. A. Fortier. 2011. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. *The American Journal of Sports Medicine*, XX 10:1-6.
- Sutter, W., A. Kaneps & A. Bertone. 2004. Comparison of hematologic values and transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *American Journal of Veterinary Research* 924-930.
- Tamimi, F., S. Montalvo, I. Tresguerres & J. L. Blanco. 2007. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery* 1084-1093.
- Thorpe, C. T., P. D. Clegg & H. L. Birch. 2010. A review of tendon injury: Why is the equine superficial digital flexor tendon most at risk? *Equine Veterinary Journal* 174-180.
- Tuermers, C, Rebolledo, N, & Aguilera, R. 2012. Effect of the application of stem cells for tendon injuries in sporting horses. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(3), 207-215
- Vasconcelos, E., A. Figueiredo & J. Seghatchian. 2006. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. *Transfusion and Apheresis Science* 13-16.
- Waselau, M., W. W. Sutter, R. L. Genovese & A. L. Bertone. 2008. Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232:1515-1520.
- Weibrich, G., & W. K. Kleis. 2002. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of plateletrich plasma. *Clinic For Oral And Maxillofacial Surgery* 437–443.

- Wenke G., R. Doerner, T. Montag, O. Greiss, B. Hornei, R. Knels y otros. 2006. Bacterial contamination of platelet concentrates prepared by different methods: results of standardized sterility testing in Germany. *Vox Sanguinis* 177-182.
- Whitman, D., R. Berry & D. Green. 1997. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1294-1299.
- Wilson, A. & A. Goodship 1994. Exercise-induced hyperthermia as a possible mechanism for tendon degeneration. *Journal of Biomechanics* 899-905.
- Yount, N. Y., K. D. Gank, Y. Q. Xiong, A. S. Bayer, P. Thomas, W. H. Welch y otros. 2004. Platelet Microbicidal Protein 1: Structural Themes of a Multifunctional Antimicrobial Peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 4395-4404.
- Zanlungo, S., M. Arrese y A. Rigotti. 1999. Medicina molecular: Presente y futuro. *Revista Médica De Chile* 982-988.
- Zhang, S. & H. Uludağ. 2009. Nanoparticulate Systems for Growth Factor Delivery. *Pharmaceutical Research* 26(7):1561-1580.
- Zimmermann, R., D. Arnold, E. Strasser, J. Ringwald, A. Schlegel, J. Wiltfang y otros. 2003. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 283-289.