

UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS *IN VITRO* DE GEL RICO EN PLAQUETAS
AUTÓLOGO EN EXPLANTES DE CARTÍLAGO Y MEMBRANA SINOVIAL
DE CANINOS DESAFIADOS CON LIPOPOLISACARIDO**

MILLER GALLEGO MEJIA
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ORIENTADOR: Dr. Jorge Uriel Carmona Ramírez
COORIENTADORA: Dra. Catalina López Villegas

**TESIS PRESENTADA AL PROGRAMA
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
VETERINARIAS – ÁREA DE
CONCENTRACIÓN: MEDICINA
REGENERATIVA, COMO PARTE DE
LOS REQUISITOS PARA LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGISTER**

MANIZALES – CALDAS

2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme llevar a cabo esta experiencia de vida y hacer este recorrido de aprendizaje.

A mi madre por su apoyo incondicional, a mi familia que con su cuota de sacrificios personales me apoyó y acompañó siempre en este largo proceso.

Al Dr. Jorge Uriel Carmona y a la Dra. Catalina López y su grupo de investigación por su apoyo incondicional durante mi proceso de formación académica y a quienes agradezco toda su colaboración, su paciencia y enseñanzas, en especial durante los difíciles días de pandemia.

A los Colegas de la Unidad de Protección Animal Oscar Ernesto Rodas y Johanna Araque, sin cuya valiosa contribución, no habría sido posible la culminación de este aprendizaje.

A mis colegas y compañeros de Maestría: Juan Manuel Pérez, Etna Julieth Giraldo Pinzón y Miguel Alejandro Aguirre, por su acompañamiento y colaboración permanente durante mi trabajo de campo.

A mis estudiantes de noveno semestre de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que en aquel entonces fueron siempre un gran equipo de trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Animales	9
Extracción de sangre y procesamiento de los hemocomponentes	9
Obtención de plasma rico en plaquetas y plasma	9
Recolección de cartílago y membrana sinovial	10
Cultivo conjunto de explantes de tejido in vitro y diseño del estudio	10
Figura 1. Diseño y metodología del estudio. HA, ácido hialurónico; IL, interleucina; LPS, lipopolisacárido; PLT, plaqueta; PDGF-BB: isoforma BB del factor de crecimiento derivado de las plaquetas; PPP/PPGS: sobrenadante de plasma pobre en plaquetas/gel pobre en plaquetas; PRP/PRGS: sobrenadante de plasma rico en plaquetas/gel rico en plaquetas; TGFβ-1: factor de crecimiento transformante beta 1; WBC: glóbulos blancos.	12
Medición de citoquinas, ácido hialurónico y factores de crecimiento	12
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	14
Recuentos celulares en sangre total y hemoderivados	14
Figura 2. Concentraciones celulares en sangre total y hemoderivados. (a) Concentraciones medias (sd) de plaquetas en sangre total, PRP y PPP (b) Concentraciones medias (sd) de leucocitos en sangre total, PRP y PPP. a-c= diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas (P 0,05) entre los hemocomponentes para la concentración de plaquetas y leucocitos. Acrónimos como en la figura 1.	14
Concentraciones de factores de crecimiento, citocinas e ácido hialurónico en los sobrenadantes del gel rico en plaquetas y del gel pobre en plaquetas	14
Concentraciones de factores de crecimiento, citocinas e ácido hialurónico en los medios de cultivo a 1 y 48h	14
Figura 3. Concentraciones de biomoléculas en ambos hemocomponentes, el sobrenadante de gel pobre en plaquetas (PPGS) y el sobrenadante de gel rico en plaquetas (PRGS). (a) Concentraciones medias (± d.s.) de interleucina 1 beta (IL-1) en PPGS y PRGS (b) Concentraciones medias (± d.s.) de interleucina 10 (IL-1) en PPGS y PRGS. (c) Concentraciones medias (± d.s.) de hialuronano (HA) en PPGS y PRGS. (d) Media (± d.s.) de las concentraciones del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-1) en PPGS y PRGS. (e) Concentraciones medias (± d.s.) de la isoforma BB del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) en PPGS y PRGS. a= las letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas (P 0,05) entre los hemocomponentes para las biomoléculas. Acrónimos como en la figura 1.	15
(b)	17

Figura 4. Concentraciones de Citoquinas en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48 horas (a) (a) media (\pm s.d) concentraciones de IL-1 β (pg/ml) (b) Media (\pm s.d) Concentraciones de IL-10 (pg/ml). ^{a-c} = letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas (P< 0,01) entre los grupos de experimentación en cada momento independiente. ^{A-B} = las diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas (P<0,01) para el mismo grupo experimental en diferentes momentos. Acrónimos como en la figura 1.	17
Figura 5. Media (\pm s.d) de las concentraciones de HA (ng/ml) en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48h. Acrónimos como en la figura 1.....	17
Discusión	19
Figura 6. Concentración de Factores de Crecimiento en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48h (a) Media (\pm s.d) concentraciones de TGF- β 1 (pg/ml). (b) Media (\pm s.d) PDGF- $\beta\beta$ (pg/ml). ^{a-c} = letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas (P< 0,01) entre los grupos de experimentación en cada momento independiente. ^{A-B} = las diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas (P<0,01) para el mismo grupo experimental en diferentes momentos. Acrónimos como en la figura 1.....	20
Conclusiones	24
REFERENCIAS	25

LISTA DE ABREVIATURAS

No se encuentran entradas de índice.

Abstract

Background: There are few in vitro studies indicating the basic mechanisms by which platelet-rich plasma (PRP) is useful in the clinical treatment of dogs with naturally occurring OA. **Methods:** cartilage and synovial membrane explants from six dogs were challenged with LPS and cultured for 48 h with platelet-poor gel and platelet-rich gel supernatants (PPGS and PRGS) at concentrations of 25% and 50%, respectively. Tissue explants challenged with LPS were co-cultured for 48 h and culture media were sampled at 1 and 48 h for ELISA determination of IL-1, IL-10, hyaluronic acid, TGF-1 and PDGF-BB. **Results:** IL-1 concentrations were significantly higher in the groups of tissue explants cultured with PRGS at 50% and PPGS at 25% at 48 h compared to the rest of the experimental groups at any time. IL-10 and HA showed similar concentrations in all assessed groups at any one time. TGF-1 and PDGF-BB had higher concentrations in the culture media of tissue explants grown with PPGS and PRGS at 50%, which decreased over time. **Conclusions:** Both PPGS and PRGS at both concentrations showed a limited biological effect in cartilage and synovial membrane explants in co-culture with LPS and even PPGS at 25% and PRGS at 50% showed a pro-inflammatory effect on these tissues at 48h.

Keywords: Pure platelet-rich plasma; degenerative joint disease; growth factors, cytokines, hyaluronic acid, in vitro system.

Resumen

Antecedentes: hay escasos estudios in vitro que indiquen los mecanismos básicos por los que el plasma rico en plaquetas (PRP) es útil en el tratamiento clínico de perros con OA de origen natural. **Métodos:** los explantes de cartílago y membrana sinovial de seis perros fueron desafiados con LPS y cultivados durante 48 h con gel pobre en plaquetas y sobrenadantes de gel rico en plaquetas (PPGS y PRGS) en concentraciones del 25% y 50%, respectivamente. Los explantes de tejido desafiados con LPS fueron co-cultivados durante 48 h y los medios de cultivo fueron muestreados a 1 y 48 h para la determinación, por ELISA, de IL-1, IL-10, ácido hialurónico, TGF-1 y PDGF-BB. **Resultados:** Las concentraciones de IL-1 fueron significativamente mayores en los grupos de explantes de tejido cultivados con PRGS al 50% y PPGS al 25% a las 48 h en comparación con el resto de los grupos experimentales en cualquier momento. La IL-10 y la HA presentaron concentraciones similares en todos los grupos valorados en cualquier momento. El TGF-1 y el PDGF-BB presentaron mayores concentraciones en los medios de cultivo de los explantes de tejido cultivados con PPGS y PRGS al 50%, que disminuyeron con el tiempo. **Conclusiones:** Tanto el PPGS como el PRGS a ambas concentraciones mostraron un efecto biológico limitado en los explantes de cartílago y membrana sinovial en co-cultivo con LPS e incluso el PPGS al 25% y el PRGS al 50% mostraron un efecto pro inflamatorio en estos tejidos a las 48h.

Palabras Clave: plasma puro rico en plaquetas; enfermedad articular degenerativa; factores de crecimiento, citoquinas, ácido hialurónico, sistemas in vitro.

INTRODUCCIÓN

La osteoartritis (OA) es la enfermedad panarticular más frecuentemente observada en seres humanos y animales, como los perros [1]. Esta enfermedad inflamatoria/degenerativa se caracteriza por daño progresivo del cartílago articular, remodelación del hueso subcondral, sinovitis y deterioro de los tejidos blandos intra y peri-articulares, acompañado en algunas ocasiones de la rotura de ligamentos, lo que induce un daño mecánico adicional secundario a la inestabilidad articular [2, 3].

La OA puede aparecer como una enfermedad primaria (espontánea) o estar asociada tanto a la laxitud de los ligamentos como a su rotura, produciendo inestabilidad e incongruencia articular [4]. Al igual que en los seres humanos, la OA en los perros está aumentando drásticamente debido al incremento en la expectativa de vida de las mascotas en todo el mundo. Estudios realizados en el Reino Unido y en los Estados Unidos han descubierto que la OA podría afectar entre el 6,6 y el 20% de los perros de más de un año de edad [1, 5, 6], lo que podría representar una población afectada de 15 millones de perros, sólo en los Estados Unidos [3].

Los principales signos clínicos relacionados con la OA son el derrame articular y la claudicación, siendo esta última indicativa de dolor. Esta condición produce pérdida de la función articular y de la calidad de vida de los pacientes. Por ello, el objetivo terapéutico para el manejo de esta enfermedad se centra en controlar el dolor y evitar el deterioro articular progresivo [3, 4].

A pesar de los avances en el conocimiento de la fisiopatología de la OA [2], esta enfermedad sigue siendo manejada con diversos tratamientos sintomáticos, como inyecciones sistémicas o intraarticulares de analgésicos y antiinflamatorios, nutracéuticos orales acompañados en algunas ocasiones de fisioterapia y cambios en el estilo de vida, que pueden incluir restricción de ejercicio y pérdida de peso [3, 7]. Sin embargo, esta enfermedad puede progresar en algunos casos y la sustitución quirúrgica de la articulación podría estar indicada como opción final, aunque la eutanasia también aparece como una decisión más drástica para muchos propietarios, ya sea por restricciones presupuestarias o incluso por preocupaciones sobre la calidad de vida de sus perros [3].

La medicina regenerativa está surgiendo como un nuevo enfoque terapéutico destinado, en la mayoría de los casos, a restaurar estructural y funcionalmente un órgano o tejido dañado por un traumatismo, una inflamación o un proceso degenerativo. Existen varias terapias regenerativas alentadoras, como las células madre [8-12] y el plasma rico en plaquetas (PRP) [13-17] para el tratamiento clínico de la OA en perros. Sin embargo, desde el punto de vista económico y técnico, el PRP es posiblemente un ortobiológico más universal y asequible que las células madre para el tratamiento de la OA, especialmente en los países del tercer mundo con acceso limitado a la tecnología de células madre.

Según lo revisado en la literatura, existen pocos estudios publicados que indiquen los mecanismos básicos por los que el PRP es útil en el tratamiento clínico de perros con OA de origen natural. En este sentido, se realizó un estudio en el que se evaluaron los efectos antiinflamatorios y anabólicos de dos hemocomponentes autólogos (sobrenadante de gel rico en plaquetas (PRGS) y sobrenadante de gel pobre en plaquetas (PPGS) en un sistema in vitro de osteoartritis canina, que incluía el co-cultivo de explantes de cartílago y membrana sinovial caninos desafiados con lipopolisacárido (LPS).

De esta manera, se midieron y compararon las concentraciones liberadas de los factores de crecimiento, antiinflamatorios y anabólicos, tales como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB (PDGF-BB), la citocina pro-inflamatoria, interleucina 1 beta (IL-1 β), el mediador antiinflamatorio, IL-10 y el indicador anabólico, ácido hialurónico (HA) en los medios de cultivo de un sistema in vitro de OA cultivado con PRGS y PPGS a dos concentraciones (25 y 50%) durante 48 h. La hipótesis de este estudio fue que el PRGS a cualquier concentración, disminuye la liberación de IL-1 e incrementa la liberación de IL-10 y HA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es el potencial terapéutico (Anabólico y antiinflamatorio) del sobrenadante autólogo de plaquetas en el tratamiento de la enfermedad articular degenerativa (DJD) en caninos?

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Caldas de acuerdo con las directrices internacionales de bienestar para la experimentación animal, el panel de eutanasia de la AVMA [18] y también, teniendo en cuenta las normas de la ley colombiana para perros peligrosos [19].

Animales

El material biológico (sangre, cartílago y membrana sinovial) utilizado en este estudio se obtuvo de 6 perros clínicamente sanos (4 hembras y 2 machos) de entre 1,5-3,5 años de edad, con un peso medio de 24,2 2,87 Kg. Todos los animales incluidos fueron considerados, según la ley colombiana, como perros peligrosos, lo cuales habían sido abandonados o decomisados a sus dueños. Los animales fueron sedados con xilacina y butorfanol y luego recibieron una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico [18].

Extracción de sangre y procesamiento de los hemocomponentes

Se recogió sangre completa de cada perro sedado antes de la eutanasia. Ampliamente, la sangre se obtuvo asépticamente por venopunción yugular y se depositó en una bolsa de transfusión de 450 ml que contenía CPDA-1 como anticoagulante. Se utilizó una muestra de sangre de 10 mil para realizar un recuento celular automatizado.

Obtención de plasma rico en plaquetas y plasma

Se depositaron asépticamente ocho muestras de sangre de 10 mil en tubos Falcon estériles de 15 mil. La mitad de los tubos Falcon se utilizó para el procesamiento de PRP y los otros 4 tubos para la obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP).

El PRP se obtuvo mediante un simple centrifugado de los 4 tubos Falcon a 191 g durante 6 minutos. Después de centrifugar cada tubo de sangre para diferenciar el volumen de células empaquetadas (40%) y el plasma (60%), se introdujo una pipeta estéril cerca de la capa leucocitaria y se aspiró suavemente el 50% del plasma para evitar la sobre aspiración (contaminación) de los glóbulos rojos (RBCs) y los glóbulos blancos

(WBCs), especialmente las células polimorfonucleares. Esta fracción se consideró como PRP, el cual se activó con gluconato de calcio durante 3 horas a 37 °C. Después de esto, el sobrenadante del gel rico en plaquetas (PRGS) se almacenó a -80 C para su posterior uso en el co-cultivo de tejido del explante in vitro y para la determinación basal de IL-1 β , IL-10, HA, TGF- β 1 y PDGF-BB.

El PPP se obtuvo centrifugando los tubos Falcon a XX g durante 10 minutos. La fracción de plasma superior al 50% se utilizó para el experimento. Esta fracción se activó con gluconato de calcio durante 3 horas a 37 °C para obtener el sobrenadante de gel pobre en plaquetas (PPGS), que se gestionó de forma similar al PRGS.

Recolección de cartílago y membrana sinovial

Tras la eutanasia, se prepararon asépticamente las regiones femoro-tibiales de cada perro para la obtención del tejido articular. Tras la exposición quirúrgica de la rodilla, se obtuvieron con un bisturí varios cortes de cartílago, libres de su región calcificada, de los cóndilos lateral y medial. Además, se diseccionó la cápsula articular del cóndilo circundante para obtener explantes de membrana sinovial (SMEs). Se obtuvieron explantes de cartílago (CEs) y SMEs utilizando un punzón circular de biopsia de 4 mm. Para ello, los explantes de membrana sinovial se liberaron suavemente de los explantes de cápsula articular circular obtenidos previamente con el punzón de biopsia.

Cultivo conjunto de explantes de tejido in vitro y diseño del estudio

Tanto los CE (n= 12) como los SMEs (n= 12) de cada perro se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato y se estabilizaron en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), con alto contenido en glucosa, 4500 mg/L), L-glutamina y bicarbonato sódico y libre de piruvato sódico (DMEM, Lonza Group Ltd, Basilea, Suiza) y complementado con estreptomina (100 μ g/ml) y penicilina (100 μ g/ml) sin añadir suero.

Los cultivos se incubaron en una atmósfera saturada de CO₂ al 5% y agua durante 24 h y luego se sustituyeron por medios de cultivo frescos. En este momento, una parte de los CEs y de las SMEs fue desafiada con 100 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich, St Louis,

MO, USA) para inducir un daño inflamatorio/catabólico de estos tejidos, tal como se ha descrito en otros estudios [20, 21].

Se incluyeron seis grupos experimentales, cada uno con 2 CEs y 2 SMEs en co-cultivo. Los explantes de tejido en co-cultivo se incubaron en placas de 6 pozos (Corning, Costar, TC-Treated Multiple Well Plates, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) con un volumen total de 3 mil por pozo considerando la concentración final de los PRGS y PPGS ensayados en los medios de cultivo. El diseño del estudio incluyó la evaluación de 2 grupos de control de explantes de tejido co-cultivados (1 con adición de LPS y 1 sin LPS) sin adición de ningún hemoderivado y 4 grupos de explantes de tejido co-cultivados con LPS cultivados con PRGS y PPGS a 2 concentraciones, 25% y 50%. Todos los grupos de explantes tisulares fueron co-cultivados durante 48 h. Se obtuvieron muestras del medio de cultivo (0,5 mil) a las 1 h y a las 48 h. Estas muestras se obtuvieron, se alicuotaron y se congelaron a -80 °C para la posterior determinación de IL-1 β , IL-10, HA, TGF- β 1 y PDGF-BB. La figura 1 resume el diseño y la metodología del estudio.

curva de concentraciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 450 nm.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar el ajuste del conjunto de datos a una distribución normal (bondad del ajuste). Todos los parámetros evaluados demostraron una distribución normal ($P > 0,05$), excepto los recuentos de WBC en ambos hemocomponentes. Los recuentos de plaquetas en sangre total, PRP y PPP se compararon con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Los recuentos de glóbulos blancos se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba U-Mann-Whitney. Los factores de crecimiento, citocinas y HA contenidos en los PPGS y PRGS se compararon mediante una prueba t para muestras no apareadas.

Para comparar las concentraciones de biomoléculas en los medios de cultivo de cada grupo experimental a 1 h y 48 h, se utilizó un análisis univariante de modelo lineal general (GLM seguido (cuando fue necesario) de una prueba de Games-Howell. El modelo estadístico evaluó las interacciones entre el tiempo con dos niveles: 1 h y 48 h, y el grupo experimental con seis niveles: grupo de control, grupo de control más LPS, 25% y 50% de PPGS, y 25% y 50% de PRGS. Se aceptó un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo para todas las pruebas.

RESULTADOS

Recuentos celulares en sangre total y hemoderivados

Los recuentos de plaquetas fueron significativamente diferentes en la sangre total, en el PRP y en el PPP, con los recuentos más altos para el PRP, seguido de la sangre total y el PPP (Figura 2a). Se observó un hallazgo significativo similar para los recuentos de glóbulos blancos en la sangre total y en ambos hemoderivados. Sin embargo, la sangre total mostró las mayores concentraciones de glóbulos blancos, seguida del PRP y el PPP (Figura 2b).

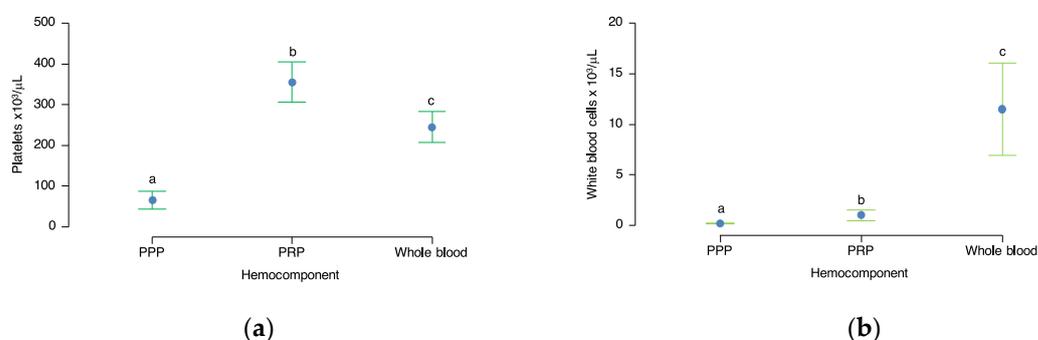


Figura 2. Concentraciones celulares en sangre total y hemoderivados. (a) Concentraciones medias (sd) de plaquetas en sangre total, PRP y PPP (b) Concentraciones medias (sd) de leucocitos en sangre total, PRP y PPP. a-c= diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas (P 0,05) entre los hemocomponentes para la concentración de plaquetas y leucocitos. Acrónimos como en la figura 1.

Concentraciones de factores de crecimiento, citocinas e ácido hialurónico en los sobrenadantes del gel rico en plaquetas y del gel pobre en plaquetas

Las concentraciones basales de IL-1 β (Figura 3a), IL-10 (Figura 3b) y HA (Figura 3c) fueron similares entre el PPGS y el PRGS (Figura 3a-c), mientras que las concentraciones de TGF- β 1 (Figura 3d) y PDGF-BB (Figura 3b) fueron significativamente diferentes entre ambos hemocomponentes, siendo las concentraciones más altas para el PRGS.

Concentraciones de factores de crecimiento, citocinas e ácido hialurónico en los medios de cultivo a 1 y 48h

Las concentraciones de IL-1 β se vieron afectadas significativamente (P< 0,001) por el tiempo, el grupo experimental y su interacción. Los grupos experimentales tratados con PPGS al 25% y PRGS al 50% mostraron un aumento significativo de las concentraciones de esta biomolécula pro-inflamatoria en comparación con los mismos grupos a 1 y 48 h.

Las concentraciones de IL-1 β fueron significativamente mayores en los grupos de explantes de tejido cultivados con PRGS al 50% y PPGS al 25% a las 48 h en comparación con el resto de los grupos experimentales en cualquier momento.

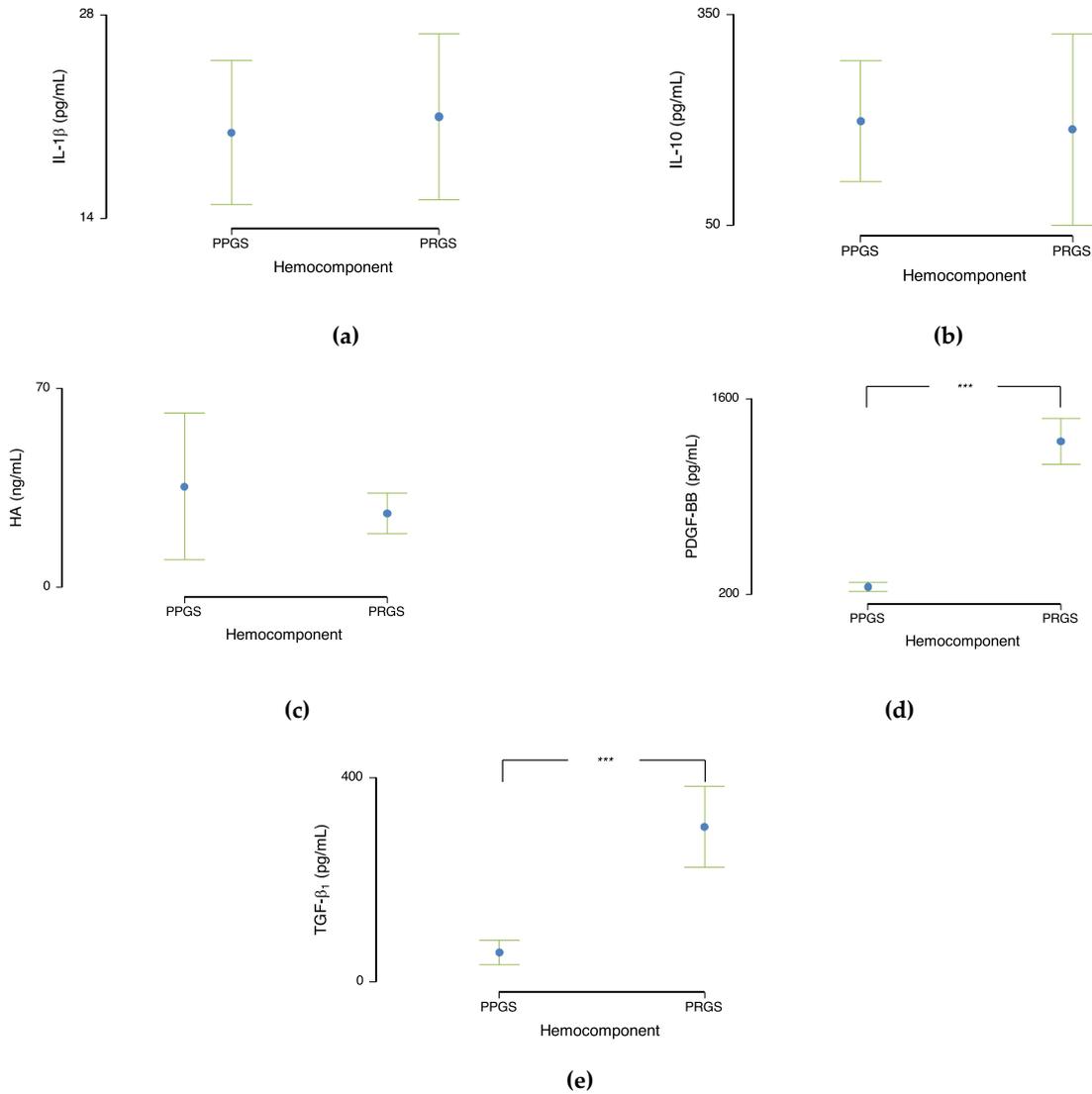
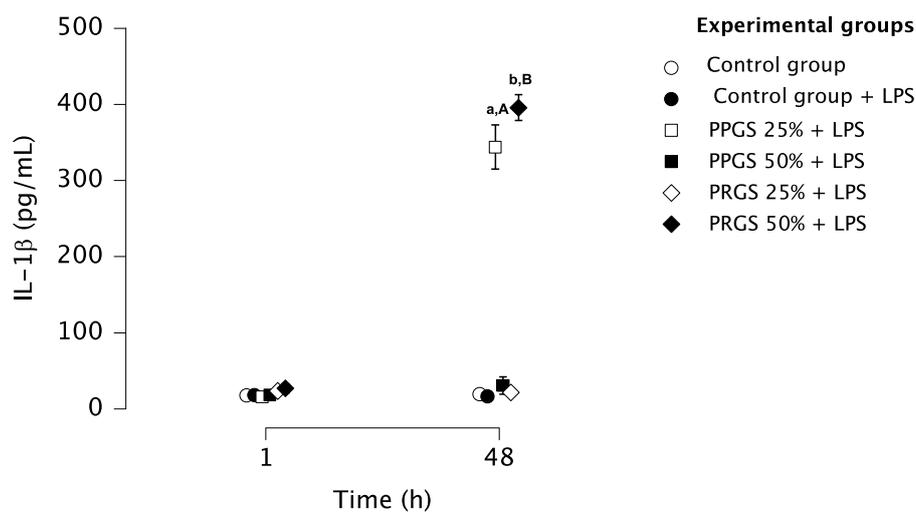


Figura 3. Concentraciones de biomoléculas en ambos hemocomponentes, el sobrenadante de gel pobre en plaquetas (PPGS) y el sobrenadante de gel rico en plaquetas (PRGS). (a) Concentraciones medias (\pm d.s.) de interleucina 1 beta (IL-1) en PPGS y PRGS (b) Concentraciones medias (\pm d.s.) de interleucina 10 (IL-1) en PPGS y PRGS. (c) Concentraciones medias (\pm d.s.) de hialuronano (HA) en PPGS y PRGS. (d) Media (\pm d.s.) de las concentraciones del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-1) en PPGS y PRGS. (e) Concentraciones medias (\pm d.s.) de la isoforma BB del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) en PPGS y PRGS. a= las letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas (P 0,05) entre los hemocomponentes para las biomoléculas. Acrónimos como en la figura 1.

Los grupos experimentales tratados con PPGS al 25% y PRGS al 50% mostraron un aumento significativo de las concentraciones de estas biomoléculas proinflamatorias en comparación con los mismos grupos a las 1 y 48 h. Las concentraciones de IL-1 fueron significativamente mayores en los grupos de explantes de tejido cultivados con PRGS al 50% y PPGS al 25% a las 48 h en comparación con los restantes grupos experimentales en cualquier momento.

Cabe destacar que las concentraciones de esta molécula catabólica fueron significativamente más altas en los explantes de tejido cultivados con PRGS al 50% a las 48h que en los medios de cultivo de los explantes de tejido cultivados con PPGS al 25% al mismo tiempo (Figura 4a).

Las concentraciones de IL-10 se vieron afectadas significativamente ($P < 0,001$) por el tiempo, el grupo experimental y su interacción. Todos los grupos experimentales, excluyendo los explantes de tejido cultivados con PPGS al 25%, presentaron concentraciones similares de esta biomolécula antiinflamatoria en cualquier momento. Sin embargo, los explantes de membrana sinovial y cartílago co-cultivados con PRGS al 25% presentaron concentraciones de IL-10 significativamente ($P < 0,001$) más elevadas a 1 hora en comparación con los grupos experimentales cultivados tanto con PPGS como con PRGS al 50% y, a continuación, disminuyeron significativamente ($P < 0,001$) a las 48h (Figura 4b).



(a)

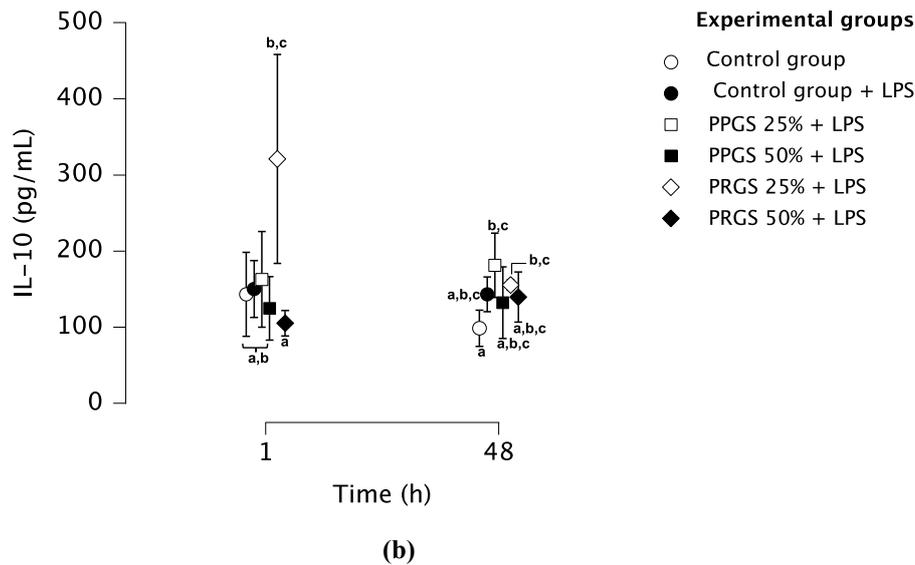


Figura 4. Concentraciones de Citoquinas en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48 horas **(a)** media (\pm s.d) concentraciones de IL-1 β (pg/ml) **(b)** Media (\pm s.d) Concentraciones de IL-10 (pg/ml). ^{a-c=} letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los grupos de experimentación en cada momento independiente. ^{A-B=} las diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ($P < 0,01$) para el mismo grupo experimental en diferentes momentos. Acrónimos como en la figura 1.

Las concentraciones de ácido hialurónico en los medios de cultivo de los grupos experimentales sólo se vieron afectadas significativamente ($P < 0,001$) por el tiempo y por la interacción de éste con el factor grupo experimental ($P = 0,031$). En general, las concentraciones de esta biomolécula anabólica tendieron a disminuir a las 48h en comparación con las concentraciones obtenidas en los grupos experimentales similares a 1h (Figura 5).

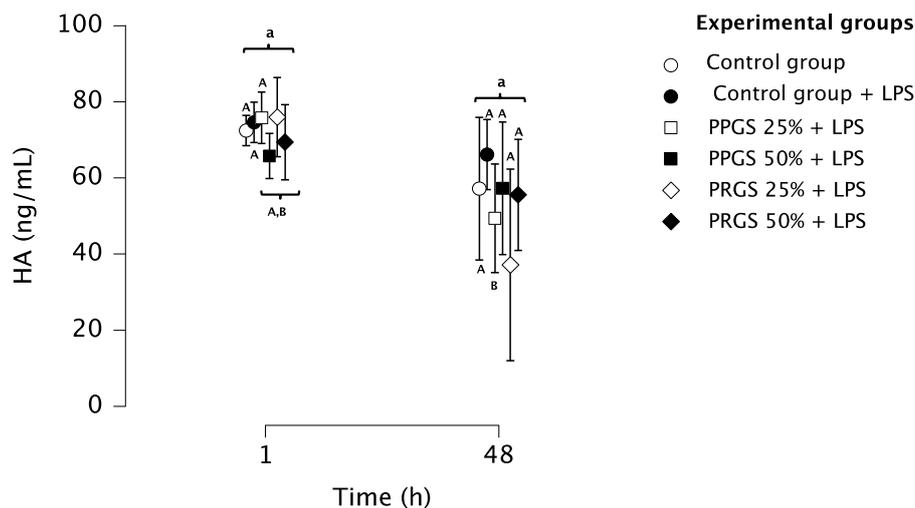


Figura 5. Media (\pm s.d) de las concentraciones de HA (ng/ml) en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48h. Acrónimos como en la figura 1.

Las concentraciones de TGF- β 1 y PDGF-BB se vieron afectadas significativamente ($P < 0,001$) por los factores grupo experimental, tiempo y su interacción. Las concentraciones de TGF- β 1 a 1 h fueron significativamente ($P < 0,001$) diferentes entre los medios de cultivo de ambos grupos de control, ambos grupos cultivados con PPGS al 25% y al 50% y, ambos grupos cultivados con PRGS al 25% y al 50%. Se observó un patrón de concentración similar para este factor de crecimiento a las 48h; sin embargo, aunque no fue significativo, hubo una disminución de las concentraciones de TGF- β 1 en los medios de cultivo de los grupos de explantes de tejido cultivados con ambas concentraciones de PRGS y un ligero aumento de las concentraciones de este GF en los medios de cultivo de los explantes de tejido de ambos grupos de control y los cultivados con PPGS a ambas concentraciones (Figura 6a). Por otro lado, a 1 h las concentraciones de PDGF-BB fueron significativamente mayores en los medios de cultivo de los grupos experimentales cultivados con ambos PRGS en comparación con el resto de los grupos experimentales. Sin embargo, a las 48h las concentraciones de este GF disminuyeron en los medios de cultivo de los explantes de tejido cultivados con ambos PRGS, particularmente al 50%, aunque las concentraciones de PDGF-BB se mantuvieron significativamente más altas en comparación con el resto de los grupos experimentales (Figura 6b).

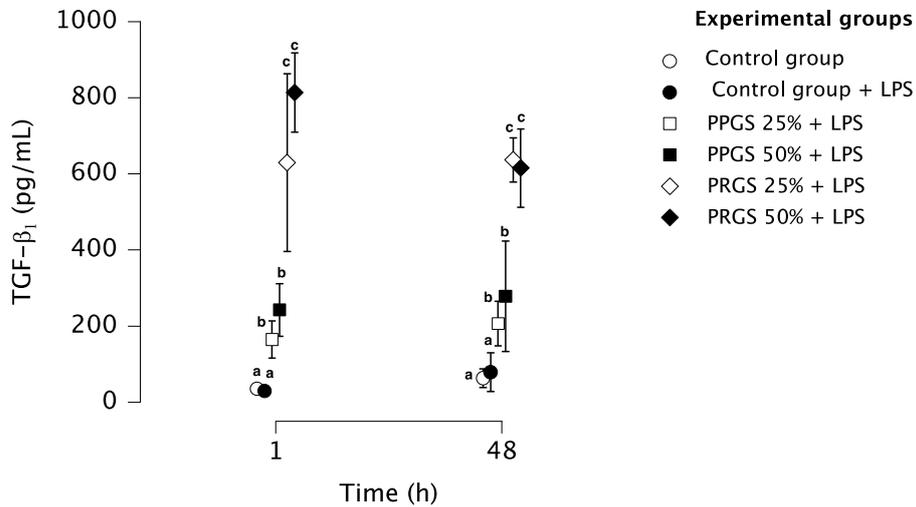
Discusión

Desde una perspectiva mecanicista, se ha considerado que la OA es una enfermedad desencadenada por un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos que mantienen la homeostasis articular. Así, cuando predominan los factores catabólicos, la enfermedad se hace más evidente clínicamente [26-28]. Hay varias biomoléculas implicadas en el mantenimiento de un entorno articular saludable, mientras que otras se producen en exceso una vez que se desencadena el proceso de OA [29]. Teniendo esto en cuenta, seleccionamos biomoléculas clave, como las citocinas (IL-1 e IL-10), los FG (TGF-1 y PDGF-BB) y el mediador anabólico HA, que están implicados en la homeostasis y la enfermedad articular, para evaluar los efectos de dos hemocomponentes relacionados con las plaquetas (PPRGS y PRGS) en cierta medida a dos concentraciones durante un corto periodo de tiempo (48 h) en un sistema in vitro que incluía el cocultivo de PYMES y CEs desafiadas con LPS.

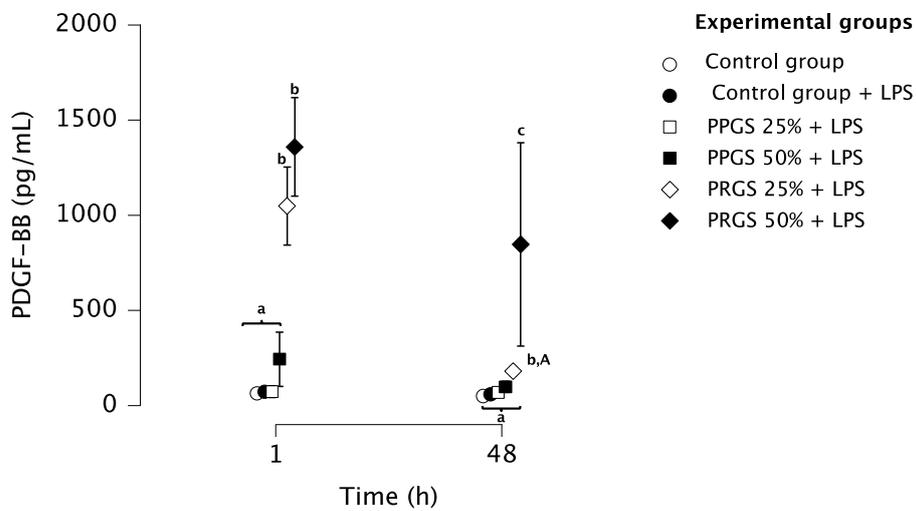
Se seleccionó la IL-1 β porque esta citoquina proinflamatoria y catabólica ha sido implicada como uno de los principales mediadores responsables de la inflamación articular, la erosión del cartílago y la apoptosis aberrante de los condrocitos [27, 30, 31]. Así, se ha propuesto que el bloqueo de esta citoquina catabólica podría ser una diana terapéutica para controlar o mejorar la OA [31, 32]. Sin embargo, también es importante tener en cuenta que, en condiciones fisiológicas, esta citoquina es importante para mantener la homeostasis articular mediante la regulación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) [30]. La IL-10 se incluyó en el presente estudio debido a sus efectos condroprotectores en los tejidos de la OA al aumentar la síntesis de colágeno de tipo II y aggrecan y regular a la baja la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 y el TNF- α . Además, esta citoquina antiinflamatoria inhibe la apoptosis de los condrocitos y la regulación a la baja de las MMP [27].

Se eligió el AH para el presente estudio porque este glicosaminoglicano no sulfatado, producido por los fibroblastos sinoviales y los condrocitos de tipo B, tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la lubricación y la viscoelasticidad de las articulaciones y en la mejora de las propiedades de rigidez compresiva del cartílago [33]. Así, la producción de AH podría considerarse un biomarcador potencial para evaluar los efectos de los hemocomponentes evaluados en la presente investigación. Además, también incluimos la evaluación de las concentraciones de TGF-1 y PDGF-BB -que son

biomoléculas anabólicas y antiinflamatorias con efectos positivos en los tejidos de la OA- y por qué están contenidas en concentraciones supra fisiológicas en los productos relacionados con las plaquetas [17, 25].



(a)



(b)

Figura 6. Concentración de Factores de Crecimiento en los medios de cultivo de los grupos experimentales a la hora y a las 48h (a) Media (\pm s.d) concentraciones de TGF- β 1 (pg/ml). (b) Media (\pm s.d) PDGF- β β (pg/ml). ^{a-c} letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los grupos de experimentación en cada momento independiente. ^{A-B} las diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ($P < 0,01$) para el mismo grupo experimental en diferentes momentos. Acrónimos como en la figura 1.

Por ejemplo, el TGF-1 desempeña varias funciones en el cartílago normal y durante el proceso de OA. En condiciones normales, este FG es vital para el recambio de la matriz extracelular (MEC) al aumentar la síntesis de colágeno tipo II, aggrecan y los inhibidores tisulares de las MMP (TIMP). Esta biomolécula tiene acciones antagónicas en la degradación del cartílago frente a las citoquinas catabólicas, como la IL-1 y el TNF-[28]. Por otro lado, el PDGF-BB es una biomolécula mitógena y anabólica para el cartílago. Promueve la migración de las células madre alrededor de los defectos del cartílago y aumenta la proliferación y diferenciación de los condrocitos, así como la síntesis de proteoglicanos. Además, este FG puede suprimir los efectos catabólicos del cartílago de la IL-1 al regular a la baja la señalización del factor nuclear kappa B (NFB) [31].

El sistema in vitro de daño al cartílago (OA) inducido por LPS en el presente estudio es un método común y ampliamente validado para dilucidar los mecanismos patogénicos en el proceso de OA [34] o para investigar el efecto de varias sustancias terapéuticas [35-38], incluidos los productos relacionados con las plaquetas [39, 40]. En general, el LPS puede interactuar con los receptores tipo Toll (TLR) en los fibroblastos sinoviales o en los condrocitos (por ejemplo, TLR4 y TLR-IL-1) para como ocurre con las citocinas pro inflamatorias inducir la activación de la transcripción del NFB, que induce la regulación ascendente de la IL-1 y el TNF con los consiguientes estímulos pro inflamatorios [20, 34, 41].

El producto relacionado con el PRP (PRGS) evaluado en el presente estudio es un subproducto derivado de un concentrado de plaquetas clasificado como PRP puro, que se caracteriza por una concentración de glóbulos blancos muy baja o insignificante [42]. En particular, estos tipos de productos de PRP son más eficaces en el tratamiento de las artropatías en comparación con los preparados de PRP ricos en leucocitos [15, 16, 43], que se conocen como PRP leucocitario (L-PRP) [42]. Sin embargo, un estudio experimental en perros no encontró diferencias entre ambos productos de PRP en cuanto a la reparación del cartílago articular [44]. Por otra parte, el PRP evaluado en este estudio presentaba recuentos de PLT inferiores a los reportados por estudios clínicos previos en perros con OA [15-17]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los liberados del tipo de concentrado de plaquetas evaluado en el presente estudio presentaron una concentración significativa de mediadores con el potencial de inducir respuestas fisiológicas en los tejidos tratados.

Según la bibliografía revisada, no hay estudios publicados que evalúen el efecto de los productos PRP en el cartílago, los SMEs, los condrocitos aislados o los fibroblastos sinoviales en perros. Este hecho nos llevó a comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con experimentos *in vitro* realizados en diferentes especies animales, como los caballos [39, 40] y los humanos [45]. De acuerdo con esto, las concentraciones de IL-1 a 1 h en los medios de cultivo de todos los grupos evaluados se mantuvieron más bajas y aumentaron abruptamente a las 48 h en aquellos explantes de tejido cultivados con PPGS al 25% y PRGS al 50%. Los resultados del presente estudio difieren de los obtenidos por Sundman et al. [45], que no detectaron concentraciones significativas de IL-1 en los medios de cultivo de cartílago y sinovia humanos de OA co-cultivados con un producto P-PRP a las 96h. El LPS añadido a los medios de cultivo de los grupos experimentales en la presente investigación puede haber dado lugar a una respuesta inflamatoria más robusta, que se vio exacerbada en los grupos de explantes de tejido cultivados con PPGS al 25% y, en particular, con PRGS al 50%.

Desde un punto de vista mecanicista, el aumento de la concentración de esta citoquina pro inflamatoria en los medios de cultivo de ambos grupos experimentales a las 48 h podría estar relacionada con diferentes formas de respuesta celular mediadas por la concentración específica de biomoléculas contenidas en ambos hemocomponentes. Sin embargo, desgraciadamente, en este sistema *in vitro* de OA canina medimos un número limitado de mediadores que podrían ser útiles para establecer si las mayores concentraciones de IL-1 se incrementaron paralelamente con otras biomoléculas pro o antiinflamatorias, como el TNF-, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y la IL-4, entre otros.

En consonancia con esto, dos estudios *in vitro* equinos [39, 40], que evaluaron de forma independiente el efecto de hemocomponentes similares en explantes de membrana sinovial y cartílago desafiados con LPS presentaron concentraciones similares de TNF- en los medios de cultivo a las 48 h; sin embargo, aquellos explantes de tejido cultivados con un hemocomponente rico en plaquetas (PRGS) mostraron un mejor perfil antiinflamatorio con concentraciones mayores de IL-1ra e IL-4 que el producido por el hemocomponente pobre en plaquetas (PPGS). Además, observamos un patrón de respuesta pro inflamatoria similar en explantes de ligamentos de caballos desafiados con LPS y cultivados con hemocomponentes similares, con una respuesta bifásica caracterizada por un aumento significativo de IL-1 durante las primeras 48 h, seguido de

un descenso drástico a las 96 h [46]. Por lo tanto, se espera que el PRGS al 50% pueda inducir una respuesta tisular pro inflamatoria inicial robusta que esté mediada principalmente por concentraciones más altas de PDGF-BB. Lamentablemente, el período de evaluación del presente estudio se limitó a 48 horas.

Observamos que los medios de cultivo de los explantes tisulares en co-cultivo presentaban concentraciones de IL-10 muy similares a 1 y 48 h, con la excepción del grupo de explantes tisulares tratados con PRGS al 25%, que presentaba una mayor concentración de esta biomolécula durante la primera hora y luego disminuía drásticamente a las 48 h. Es posible que la concentración específica de mediadores contenida en este hemocomponente al 25% haya inducido una liberación más robusta de esta citoquina antiinflamatoria a lo largo de la primera hora que el resto de los hemocomponentes evaluados a diferentes concentraciones, quizás mediada por receptores celulares sensibles a la concentración de un mediador específico para estimular la producción de IL-10. Sin embargo, parece ser que a pesar de que la producción de esta citoquina fue estimulada por el PRGS al 25% a lo largo de la primera hora existen mecanismos compensatorios que inducen el consumo de desnaturalización de la misma a lo largo de un tiempo más prolongado para mantenerla en una concentración óptima como los observados para las cito-cinas antiinflamatorias, como la IL-4 [39, 40]. Esta última hipótesis podría indicar la razón por la que las inyecciones de PRP en rodillas humanas con OA no afectaron a las concentraciones de IL-10 en el líquido sinovial a lo largo del tiempo [47].

Por otra parte, observamos que todos los grupos de explantes de tejido produjeron HA en el co-cultivo. En general, la producción de este mediador puede haber sido estimulada principalmente por el LPS a las 1 h. Sin embargo, a las 48 h, los explantes tisulares co-cultivados con PPGS al 25% presentaron una concentración de HA significativamente menor en comparación con ambos grupos de control y con el mismo hemocomponente a las 1 h, lo que podría indicar que esta sustancia al 25% fue incapaz de revertir el efecto catabólico del LPS a las 48 h. Cabe destacar que el patrón de liberación de HA de nuestro estudio se evaluó durante un corto período de tiempo (sólo 48 h). Este hecho podría limitar la interpretación de nuestros resultados, ya que la respuesta más robusta en la producción de AH en explantes de tejido articular equino se ha observado a las 96 h [20, 39]. Por lo tanto, es necesario realizar nuevos estudios que evalúen los efectos de este tipo de hemoderivados en los tejidos articulares caninos durante un período más largo.

Observamos que las concentraciones de TGF-1 en el cultivo de todos los grupos de explantes de tejido co-cultivados tratados con ambos hemocomponentes a cualquier concentración presentaban concentraciones elevadas de GF a 1 h, seguidas de una disminución significativa a las 48 h. Sin embargo, las concentraciones de PDGF-BB, particularmente en el PRGS al 25%, disminuyeron drásticamente a las 48 h. En general, se han observado patrones de concentración similares para estos mediadores en otros estudios realizados por nuestro grupo en explantes de cartílago y membrana sinovial equinos cultivados independientemente [39, 40].

El presente estudio tiene varias limitaciones que deben reconocerse para mejorar la comprensión de los lectores. En primer lugar, se trata de un estudio *in vitro* sobre un sistema biológico que incluye algunas piezas del gran rompecabezas que representa un paciente o una articulación afectada por la OA. En particular, proporciona información útil para informar sobre futuros estudios más racionales de modelos animales de OA y de pacientes con OA. En general, los resultados del presente estudio fueron inesperados porque todos los hemocomponentes evaluados produjeron efectos antiinflamatorios limitados y algunos de ellos (PPGS al 25% y PPRGS al 50%) fueron incluso marcadamente proinflamatorios. La razón de estos resultados controvertidos podría estar relacionada con la corta duración (sólo 48 h) del estudio, que podría haber limitado el proceso biológico implicado en la producción de las biomoléculas evaluadas. Por lo tanto, los estudios futuros deberían realizarse durante períodos más largos.

Conclusiones

Tanto el PPGS como el PRGS en ambas concentraciones mostraron un efecto biológico limitado en los explantes de cartílago y membrana sinovial en co-cultivo con LPS e incluso el PPGS al 25% y el PRGS al 50% mostraron un efecto pro-inflamatorio en estos tejidos a las 48h. Los resultados sugieren que se deberían realizar más estudios para evaluar el efecto de ambos hemoderivados en un lapso de tiempo más prolongado.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Anderson, K.L., et al., *Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 5641.
2. Mehana, E.E., A.F. Khafaga, and S.S. El-Blehi, *The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: An updated review*. *Life Sci*, 2019. **234**: p. 116786.
3. Cimino Brown, D., *What can we learn from osteoarthritis pain in companion animals?* *Clin Exp Rheumatol*, 2017. **35 Suppl 107**(5): p. 53-58.
4. Johnston, S.A., *Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1997. **27**(4): p. 699-723.
5. DG, O.N., et al., *Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90501.
6. Clements, D.N., et al., *Genetic basis of secondary osteoarthritis in dogs with joint dysplasia*. *Am J Vet Res*, 2006. **67**(5): p. 909-18.
7. Bhathal, A., et al., *Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review*. *Open Vet J*, 2017. **7**(1): p. 36-49.
8. Black, L.L., et al., *Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs*. *Vet Ther*, 2008. **9**(3): p. 192-200.
9. Kim, S.E., et al., *Intra-Articular Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy for Chronic Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Double-Blinded, Placebo-Controlled Clinical Trial*. *Front Vet Sci*, 2019. **6**: p. 474.
10. Maki, C.B., et al., *Intra-articular Administration of Allogeneic Adipose Derived MSCs Reduces Pain and Lameness in Dogs With Hip Osteoarthritis: A Double Blinded, Randomized, Placebo Controlled Pilot Study*. *Front Vet Sci*, 2020. **7**: p. 570.
11. Pavarotti, G.S., et al., *Evaluation of a Single Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue for the Treatment of Osteoarthritis: A Prospective Clinical Study in Dogs*. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2020. **33**(4): p. 258-266.
12. Srzentić Dražilov, S., et al., *The use of canine mesenchymal stem cells for the autologous treatment of osteoarthritis*. *Acta Vet Hung*, 2018. **66**(3): p. 376-389.
13. Catarino, J., et al., *Treatment of canine osteoarthritis with allogeneic platelet-rich plasma: review of five cases*. *Open Vet J*, 2020. **10**(2): p. 226-231.
14. Cuervo, B., et al., *Objective Comparison between Platelet Rich Plasma Alone and in Combination with Physical Therapy in Dogs with Osteoarthritis Caused by Hip Dysplasia*. *Animals (Basel)*, 2020. **10**(2).
15. Venator, K.P., et al., *Assessment of a Single Intra-Articular Stifle Injection of Pure Platelet Rich Plasma on Symmetry Indices in Dogs with Unilateral or Bilateral Stifle Osteoarthritis from Long-Term Medically Managed Cranial Cruciate Ligament Disease*. *Vet Med (Auckl)*, 2020. **11**: p. 31-38.
16. Vilar, J.M., et al., *Effect of leukocyte-reduced platelet-rich plasma on osteoarthritis caused by cranial cruciate ligament rupture: A canine gait analysis model*. *PLoS One*, 2018. **13**(3): p. e0194752.
17. Silva, R.F., J.U. Carmona, and C.M. Rezende, *Intra-articular injections of autologous platelet concentrates in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture: a pilot study*. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2013. **26**(4): p. 285-90.
18. *2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia*. *J Am Vet Med Assoc*, 2001. **218**(5): p. 669-96.
19. Congress, C., *Law by which the possession and registration of potentially dangerous dogs is regulated.*, in *Official Bulletin of the State*, C. Congress, Editor. 2002: Bogotá D.C. p. 4.
20. Carmona, J.U., et al., *In vitro effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine*

- cartilage explants challenged with lipopolysaccharide*. BMC Vet Res, 2016. **12**(1): p. 135.
21. Carmona, J.U., et al., *Proinflammatory and Anabolic Gene Expression Effects of Platelet-Rich Gel Supernatants on Equine Synovial Membrane Explants Challenged with Lipopolysaccharide*. Vet Med Int, 2017. **2017**: p. 6059485.
 22. Moreira, M.L., et al., *Cross-reactivity of commercially available anti-human monoclonal antibodies with canine cytokines: establishment of a reliable panel to detect the functional profile of peripheral blood lymphocytes by intracytoplasmic staining*. Acta Vet Scand, 2015. **57**(1): p. 51.
 23. Manning, A.M., et al., *Cloning of a canine cDNA homologous to the human transforming growth factor-beta 1-encoding gene*. Gene, 1995. **155**(2): p. 307-8.
 24. Franklin, S.P., et al., *Influence of Cellular Composition and Exogenous Activation on Growth Factor and Cytokine Concentrations in Canine Platelet-Rich Plasmas*. Front Vet Sci, 2017. **4**: p. 40.
 25. Silva, R.F., J.U. Carmona, and C.M. Rezende, *Comparison of the effect of calcium gluconate and batroxobin on the release of transforming growth factor beta 1 in canine platelet concentrates*. BMC Vet Res, 2012. **8**: p. 121.
 26. Gossan, N., R. Boot-Handford, and Q.J. Meng, *Ageing and osteoarthritis: a circadian rhythm connection*. Biogerontology, 2015. **16**(2): p. 209-19.
 27. Wojdasiewicz, P., A. Poniatowski Ł, and D. Szukiewicz, *The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 561459.
 28. Finsson, K.W., et al., *TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis*. Front Biosci (Schol Ed), 2012. **4**: p. 251-68.
 29. Martel-Pelletier, J., et al., *Osteoarthritis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16072.
 30. Wang, T. and C. He, *Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **44**: p. 38-50.
 31. Montaseri, A., et al., *IGF-1 and PDGF-bb suppress IL-1 β -induced cartilage degradation through down-regulation of NF- κ B signaling: involvement of Src/PI-3K/AKT pathway*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28663.
 32. Conaghan, P.G., et al., *Therapeutic options for targeting inflammatory osteoarthritis pain*. Nat Rev Rheumatol, 2019. **15**(6): p. 355-363.
 33. Kuroki, K., J.L. Cook, and J.M. Kreeger, *Mechanisms of action and potential uses of hyaluronan in dogs with osteoarthritis*. J Am Vet Med Assoc, 2002. **221**(7): p. 944-50.
 34. Barreto, G., et al., *Lumican is upregulated in osteoarthritis and contributes to TLR4-induced pro-inflammatory activation of cartilage degradation and macrophage polarization*. Osteoarthritis Cartilage, 2020. **28**(1): p. 92-101.
 35. Li, X., et al., *Tougu Xiaotong capsules may inhibit p38 MAPK pathway-mediated inflammation: In vivo and in vitro verification*. J Ethnopharmacol, 2020. **249**: p. 112390.
 36. Li, Y., et al., *Piperine mediates LPS induced inflammatory and catabolic effects in rat intervertebral disc*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(6): p. 6203-13.
 37. Hartog, A., et al., *The multicomponent phytopharmaceutical SKI306X inhibits in vitro cartilage degradation and the production of inflammatory mediators*. Phytomedicine, 2008. **15**(5): p. 313-20.
 38. Hu, H., et al., *Ginkgolide B exerts anti-inflammatory and chondroprotective activity in LPS-induced chondrocytes*. Adv Clin Exp Med, 2018. **27**(7): p. 913-920.
 39. Ríos, D.L., et al., *Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide*. BMC Musculoskelet Disord, 2015. **16**: p. 153.
 40. Ríos, D.L., C. López, and J.U. Carmona, *Evaluation of the anti-inflammatory effects of two platelet-rich gel supernatants in an in vitro system of cartilage inflammation*. Cytokine, 2015. **76**(2): p. 505-513.
 41. Zeddou, M., *Osteoarthritis Is a Low-Grade Inflammatory Disease: Obesity's Involvement and Herbal Treatment*. Evid Based Complement Alternat Med, 2019. **2019**: p. 2037484.

42. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives*. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2014. **4**(1): p. 3-9.
43. Araya, N., et al., *Intra-articular Injection of Pure Platelet-Rich Plasma Is the Most Effective Treatment for Joint Pain by Modulating Synovial Inflammation and Calcitonin Gene-Related Peptide Expression in a Rat Arthritis Model*. *Am J Sports Med*, 2020. **48**(8): p. 2004-2012.
44. Kazemi, D. and A. Fakhrou, *Leukocyte and Platelet Rich Plasma (L-PRP) Versus Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) For Articular Cartilage Repair of the Knee: A Comparative Evaluation in an Animal Model*. *Iran Red Crescent Med J*, 2015. **17**(10): p. e19594.
45. Sundman, E.A., et al., *The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis*. *Am J Sports Med*, 2014. **42**(1): p. 35-41.
46. Castillo-Franz, C., et al., *Anti-inflammatory effects of two platelet-rich gel supernatants in an in vitro system of ligament desmitis*. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2019. **9**(4): p. 506-516.
47. Mariani, E., 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): p. e0156137.