cells

MDPI

Artículo
Efecto de un compuesto a base de colágeno sobre las propiedades morfofuncionales de tenocitos humanos cultivados

Filippo Randelli [1], Alessandra Menon [2], Alessio Giai Via [1], Manuel Giovanni Mazzoleni [1], Fabio Sciancalepore [2], Marco Brioschi [1] and Nicoletta Gagliano [3,*]

1 Centro di Chirurgia dell'Anca e Traumatologia, I.R.C.C.S Policlinico San Donato, 20097 San Donato Milanese, Italy; filippo.randelli@fastwebnet.it (F.R.); alessiogiaivia@hotmail.it (A.G.V.); manuelmazzoleni4@gmail.com (M.G.M.); marco.brioschi@unimi.it (M.B.)
2 Azienda Socio Sanitaria Territoriale Centro Specialistico Ortopedico Traumatologico Gaetano Pini-CTO, 1ˆ Clinica Ortopedica, 20122 Milan, Italy; ale.menon@me.com (A.M.); fabio.sciancalepore@unimi.it (F.S.)
3 Department of Biomedical Sciences for Health, Università degli Studi di Milano, 20133 Milan, Italy
* Correspondence: nicoletta.gagliano@unimi.it; Tel.: +39-02-50315374; Fax: +39-02-50315387

Recibido: 28 de noviembre de 2018; Aceptado: 4 de diciembre de 2018; Publicado: 6 de diciembre de 2018

Resumen: Antecedentes: El síndrome de dolor trocantérico mayor (GTPS) es una causa principal de dolor lateral de cadera persistente. La tendinopatía de los tendones del glúteo medio y menor desempeña un papel clave en este contexto. Se ha desarrollado un compuesto médico inyectable que contiene colágeno tipo I (MD-Tissue, Guna) con el objetivo de contrarrestar la degeneración fisiológica y patológica de los tendones. En este estudio se buscó caracterizar el efecto de este compuesto médico sobre tenocitos glúteos humanos cultivados, con foco en las vías de recambio del colágeno, para comprender cómo podría influir en la biología y reparación del tendón. Métodos: Los tenocitos se obtuvieron de fragmentos de tendón glúteo recolectados de ocho pacientes sin patología tendinosa glútea, sometidos a artroplastia total de cadera mediante abordaje anterior. La proliferación y migración celular se evaluaron mediante curvas de crecimiento y ensayo de cierre de herida, respectivamente. La expresión de genes y proteínas implicados en el recambio del colágeno se analizó mediante PCR en tiempo real, slot blot y SDS-zimografía. Resultados: Los tenocitos cultivados sobre MD-Tissue, en comparación con los controles, mostraron mayor tasa de proliferación y mayor potencial de migración. MD-Tissue indujo la secreción de colágeno tipo I (COL-I) y aumentó los niveles de ARNm del inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz-1 (TIMP-1). En cambio, la lisil hidroxilasa 2b y las metaloproteinasas de matriz (MMP)-1 y -2, implicadas respectivamente en la maduración y degradación del colágeno, no se vieron afectadas. Conclusiones: En conjunto, los resultados sugieren que MD-Tissue podría inducir en los tenocitos un fenotipo anabólico al estimular la proliferación y migración tenocitaria y la síntesis, maduración y secreción de COL-I, favoreciendo así la reparación tendinosa. En particular, por su efecto sobre los tenocitos glúteos, MD-Tissue podría ser útil en el tratamiento del GTPS, una condición de manejo clínico desafiante. Se requieren investigaciones clínicas rigurosas para comprender el potencial clínico real de este compuesto.

Palabras clave: tendinopatía; síndrome de dolor trocantérico mayor; tendón; recambio del colágeno; metaloproteinasas de matriz; citoesqueleto; adhesión focal

La tendinopatía es una condición crónica y dolorosa que afecta a los tendones, caracterizada por modificaciones histológicas como desorganización de las fibrillas de colágeno, aumento del contenido de proteoglucanos y glicosaminoglucanos, incremento de componentes no colágenos de la matriz extracelular, hipercelularidad y neovascularización [1]. El dolor asociado a la tendinopatía es una causa muy frecuente de discapacidad.

El dolor alrededor del trocánter mayor se atribuía antiguamente a bursitis trocantérica, pero distintos estudios ([2,3] y las referencias allí citadas) han sugerido que esta condición está determinada principalmente por una tendinopatía de los tendones del glúteo medio o menor, conocida como síndrome de dolor trocantérico mayor (GTPS). El GTPS se caracteriza clínicamente por dolor y sensibilidad en el trocánter mayor o alrededor de él, dolor durante actividades como caminar o subir escaleras, y dolor al recostarse por la noche sobre el lado afectado [4]. Aunque es una condición común, existen pocos tratamientos eficaces disponibles en la práctica clínica y a menudo son empíricos [5]. Por ello, durante la última década ha crecido el interés por terapias biológicas y regenerativas orientadas a mejorar la reparación tendinosa, como el plasma rico en plaquetas (PRP) o el ácido hialurónico [6].

El tratamiento de la tendinopatía, incluyendo el GTPS y otras localizaciones, sigue siendo un problema importante para los clínicos, porque su patogénesis aún no se comprende por completo y muchos tratamientos carecen de evidencia sólida. El manejo del GTPS es tradicionalmente conservador en primera instancia, e incluye reposo, aplicación de frío, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), fisioterapia e infiltraciones locales de corticosteroides. Sin embargo, estudios recientes encontraron poca evidencia que respalde la fisioterapia o los programas de ejercicio para la tendinopatía glútea [7]. Las infiltraciones con corticosteroides se utilizan ampliamente, pese a las controversias sobre el uso de glucocorticoides en tendinopatía. Una revisión sistemática reciente mostró que proporcionan alivio del dolor a corto plazo, pero sin beneficios a largo plazo [5,8]. No se han comunicado diferencias estadísticamente significativas al año en comparación con AINEs orales. Algunos autores han informado buenos resultados con la terapia extracorpórea por ondas de choque (ESWT) [9], pero la evidencia de la mayoría de estos estudios es baja y no existen estudios de nivel I publicados en la literatura. Por lo tanto, las terapias biológicas destinadas a mejorar la reparación del tendón resultan muy atractivas. El único estudio de nivel I sobre PRP mostró mejoría del dolor y del mHHS a las 12 semanas tras una única inyección de PRP, comparada con una única inyección de corticosteroides [10]. En una serie de casos reciente se reportaron resultados prometedores con inyección de tenocitos autólogos [11]. Aun así, la evidencia que respalda el uso de terapias biológicas para el tratamiento del GTPS sigue siendo limitada [12].

Los tendones cumplen funciones clave en el sistema musculoesquelético al transferir al esqueleto las fuerzas generadas por la contracción muscular. Sus propiedades mecánicas se basan en la estructura y composición de la matriz extracelular (ECM), constituida principalmente por colágeno tipo I (COL-I) [13-15]. Los tenocitos son fibroblastos especializados del tendón, interpuestos entre las fibras de colágeno, responsables de la actividad metabólica y de la estructura tendinosa. Participan en las vías de recambio del colágeno y actúan como mecanosensores, con funciones clave en la modificación de la expresión génica de componentes de la ECM en respuesta a las fuerzas mecánicas que actúan sobre los tendones [14,16,17].

El objetivo de este estudio fue investigar in vitro el efecto de MD-Tissue®, un compuesto médico inyectable a base de colágeno con potencial terapéutico, registrado como dispositivo médico en distintos países y que contiene colágeno porcino como componente principal, sobre tenocitos humanos. Se puso especial atención en las vías de recambio del colágeno, para comprender los mecanismos moleculares activados por este compuesto y cómo podría favorecer la homeostasis y reparación del tendón. Dado el interés clínico en situaciones como el GTPS, se analizaron tenocitos glúteos.

El proceso de producción de MD-Tissue permite obtener un producto puro, con peso molecular estandarizado y características químico-físicas orientadas a garantizar la seguridad en el uso clínico. No se han observado efectos secundarios, reacciones alérgicas ni interacciones farmacológicas. Datos clínicos han informado que el tratamiento con MD-Knee, un compuesto médico a base de colágeno similar a MD-Tissue, durante hasta 6 meses fue generalmente bien tolerado y no se observaron eventos adversos sistémicos ni complicaciones sépticas [18,19]. La caracterización in vitro de los mecanismos moleculares activados por MD-Tissue será fundamental para planificar ensayos clínicos específicos.

Todos los sujetos entregaron su consentimiento informado antes de participar en el estudio. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético Local (Comité Ético del Hospital San Raffaele, Milán, Italia) de la institución coordinadora (IRCCS Policlinico San Donato, Milán, Italia) (63/INT/2017). Los criterios de inclusión y exclusión se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de elegibilidad.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Edad entre 18 y 70 años.	Pacientes diagnosticados con tendinopatía del trocánter mayor.
Indicación de artroplastia total de cadera.	Pacientes con trastornos genéticos del colágeno.
Pacientes que firmaron consentimiento informado escrito para la cirugía.	Pacientes diagnosticados con espondiloartritis con compromiso de la cadera afectada.
Pacientes capaces de comprender las condiciones del estudio y dispuestos a participar durante toda su duración.	Pacientes con artritis psoriásica.
	Drogadicción Alcoholismo Trastornos psiquiátricos Condiciones clínicas que pudieran comprometer los resultados del procedimiento quirúrgico o del seguimiento.
	Consentimiento informado no aceptado.
	Mujeres embarazadas o en lactancia.
	Pacientes con diabetes mellitus.
	Pacientes que hubieran recibido fluoroquinolonas dentro de los 30 días previos a la cirugía.

Se obtuvieron fragmentos de tendón glúteo humano de 8 pacientes (edad media 64,8 ± 7,2 años; 4 hombres y 4 mujeres) sin patología del tendón glúteo y sometidos a artroplastia total de cadera mediante abordaje anterior. En cada muestra se analizó la porción media del tendón recolectado, correspondiente a la región con la estructura típica del tejido conectivo denso regular.

2.2. Cultivos celulares

Los fragmentos tendinosos se lavaron inmediatamente en PBS estéril y se sembraron en matraces T25, incubados en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), antibióticos (100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina) y ácido ascórbico (200 µM), a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO2. Cuando los tenocitos crecieron a partir del explante, se tripsinizaron (0,025% tripsina-0,02% EDTA) para cultivos secundarios y se sembraron en matraces T75. La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de tripano. Para las evaluaciones, se utilizaron tenocitos humanos confluentes entre el cuarto y quinto pasaje. Para la SDS-zimografía, las células se cultivaron en DMEM sin suero. Los tenocitos derivados de cada paciente y los sobrenadantes celulares se prepararon por duplicado y se analizaron después de 24, 48 y 72 h.

2.3. Recubrimiento con MD-Tissue

MD-Tissue®, proporcionado amablemente por Guna (Milán, Italia), es un compuesto médico inyectable basado en colágeno porcino (100 µg/ampollas de 2 mL). Contiene ácido ascórbico, gluconato de magnesio, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, NaCl y agua como excipientes. El colágeno porcino es similar al colágeno humano y, por su alta biocompatibilidad y muy bajo riesgo de efectos adversos, se ha utilizado en diversos campos clínicos. MD-Tissue es un compuesto inyectable,

pero planteamos la hipótesis de que podría actuar como un andamiaje mecánico capaz de influir en el metabolismo de los tenocitos. Por ello, MD-Tissue se utilizó como sustrato para cultivos celulares. No obstante, como se demostró previamente [20], parte del colágeno empleado para el recubrimiento en los cultivos celulares se desprende y contribuye a la estimulación mecánica de los tenocitos.

Para obtener un recubrimiento fino, se añadió MD-Tissue (50 µg/mL) a placas multipocillo o matraces T25 (3 mL por matraz T25 y placa de 6 pocillos, y 500 µL por placa de 24 pocillos). Tras una incubación mínima de 3-4 h a temperatura ambiente para asegurar la adhesión del colágeno al plástico, se retiró el exceso de líquido y la superficie recubierta se secó durante al menos 2 h bajo campana de flujo laminar. El plástico recubierto se utilizó inmediatamente o se almacenó a 4 °C. Las células cultivadas sobre plástico de cultivo sin recubrimiento (NC) se utilizaron como controles no tratados.

2.4. Curvas de crecimiento

El crecimiento celular se evaluó mediante curvas de crecimiento. Los tenocitos se sembraron por triplicado en placas multipocillo de 6 pocillos con la misma densidad celular (100.000 células/pocillo). El número de células se determinó con cámara de Neubauer después de 24, 48 y 72 h en tenocitos en fase proliferativa.

Para microscopía de fluorescencia, los tenocitos se cultivaron sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro, sin recubrimiento (NC) o recubiertos con MD-Tissue, colocados en placas de cultivo de 24 pocillos, como se describió previamente [21]. Para el análisis del citoesqueleto de actina, las células se incubaron con rodamina-faloidina 50 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para la detección de vinculina, las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal de conejo anti-vinculina (1:600 en PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El anticuerpo secundario fue anti-conejo/Alexa488 (1:500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las células se fotografiaron con una cámara digital conectada a un microscopio Nikon Eclipse 80i.

2.6. PCR en tiempo real

La expresión génica se analizó mediante RT-PCR en tiempo real, como se informó previamente, en muestras procesadas por triplicado [22]. GAPDH se utilizó como control endógeno para normalizar las diferencias en la cantidad de ARN total de cada muestra. Las secuencias de los cebadores fueron: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): sentido CCCTTCATTGACCTCAACTACATG, antisentido TGGGATTTCCATTGATGACAAGC; lisil hidroxilasa 2 larga (LH2b): sentido CCGGAAACATTCCAAATGCTCAG, antisentido GCCAGAGGTCATTGTTATAATGGG; inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz-1 (TIMP-1): sentido GGCTTCTGGCATCCTGTTGTTG, antisentido AAGGTGGTCTGGTTGACTTCTGG; vinculina: sentido GGAGGTGATTAACCAGCCAAT, antisentido AATGATGTCATTGCCCTTGC; quinasa de adhesión focal (FAK): sentido GTCTGCCTTCGCTTCACG, antisentido GAATTTGTAACTGGAAGATGCAAG; Nanog: sentido CCCCAGCCTTTACTCTTCCTA, antisentido CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC. Cada muestra se analizó por triplicado en un termociclador Bioer LineGene 9600 (Bioer, Hangzhou, China) tras 40 ciclos. Se determinó el umbral de ciclo (Ct) y se calcularon los niveles de expresión génica relativos a GAPDH. Para confirmar la fiabilidad de los resultados, los niveles de ARNm de genes diana se normalizaron respecto de un segundo gen constitutivo, el ARN ribosomal 18s. El patrón obtenido fue similar (datos no mostrados).

Los niveles de proteínas de colágeno tipo I y III (COL-I, COL-III) y de metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1) secretadas por los tenocitos se evaluaron por duplicado mediante slot blot en medio de cultivo sin suero, como se detalló previamente [21]. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal para COL-I (1:1000 en TBST) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia), COL-III (1:2000 en TBST) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) y MMP-1 (1 µg/mL en TBST) (Millipore, Milán, Italia).

Las bandas inmunorreactivas, reveladas por el sustrato Amplified Opti-4CN (Amplified Opti-4CN, Bio Rad, Italia), se analizaron densitométricamente (UVBand, Eppendorf, Italia).

La SDS-zimografía se utilizó para analizar la actividad de MMP-2 de la proteína secretada en el medio de cultivo celular, como se describió previamente [21]. La actividad gelatinolítica de MMP, detectada tras teñir los geles con azul brillante de Coomassie R250 como bandas claras sobre fondo azul, se cuantificó mediante análisis densitométrico (UVBand, Eppendorf, Italia).

La migración celular de tenocitos adultos y envejecidos se analizó mediante ensayo de cierre de herida en placas multipocillo de 6 pocillos sin recubrimiento (NC) y recubiertas con MD-Tissue [22]. La ?herida? o ?scratch? se creó en tenocitos confluentes utilizando una punta de pipeta p200. Tras eliminar los restos celulares mediante lavado con DMEM, las placas se incubaron a 37 °C y se observaron bajo microscopio invertido en diferentes tiempos. Se capturaron imágenes digitales a las 0 y 24 h, y el tamaño del ?scratch? se midió para determinar el potencial de migración.

El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism v 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA 92108, USA). Los datos se obtuvieron de dos experimentos replicados para cada línea celular derivada de pacientes, cultivada por duplicado, y se expresaron como media ± desviación estándar (DE). La comparación entre grupos se calculó mediante prueba t de Student para muestras independientes, bilateral. Las diferencias asociadas con valores de p inferiores al 5%, con un nivel de confianza del 95%, se consideraron significativas.

3. Resultados

3.1. Crecimiento celular

La proliferación celular evaluada mediante curvas de crecimiento mostró que los tenocitos cultivados en placas de 6 pocillos sin recubrimiento (NC) o recubiertas con MD-Tissue tuvieron la misma tasa de proliferación después de 24 y 48 h. En contraste, la proliferación celular aumentó significativamente en los tenocitos cultivados sobre MD-Tissue después de 72 h ($p < 0,05$ frente a 72 h NC) (Figura 1).

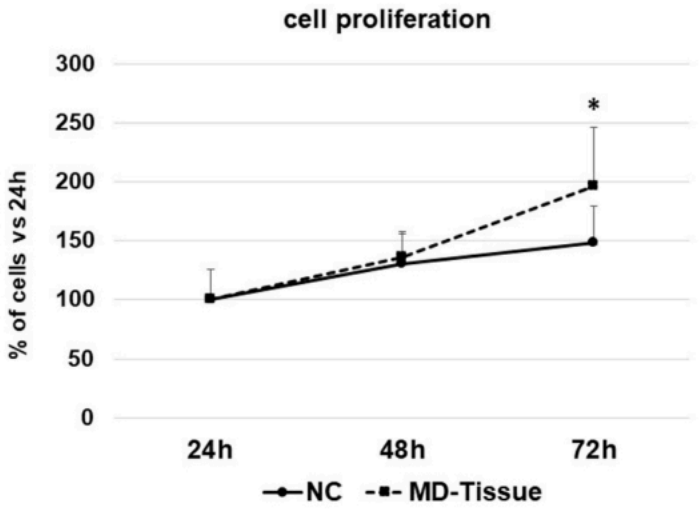


Figura 1. Curvas de crecimiento de tenocitos cultivados sin recubrimiento (NC) o sobre MD-Tissue en los tiempos indicados. Los datos se expresan como porcentaje frente al punto temporal T24 y como media + DE. * $p < 0,05$ frente a 72 h NC.

Dado que se ha demostrado que, al utilizar diferentes métodos para aislar tenocitos a partir de fragmentos tendinosos, la población celular obtenida puede ser una mezcla de tenocitos terminalmente diferenciados y células progenitoras [23], primero se caracterizaron las células determinando la expresión de Nanog, uno de los principales marcadores de células madre mesenquimales [24]. Las células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs), proporcionadas amablemente por la Dra. Anna Brini (Universidad de Milán), se utilizaron como control positivo. Se observó que Nanog fue casi indetectable en todos los cultivos celulares obtenidos de fragmentos tendinosos, mientras que se expresó de forma elevada en ASCs (Figura 2), lo que indica que las células utilizadas en este estudio eran predominantemente tenocitos diferenciados.

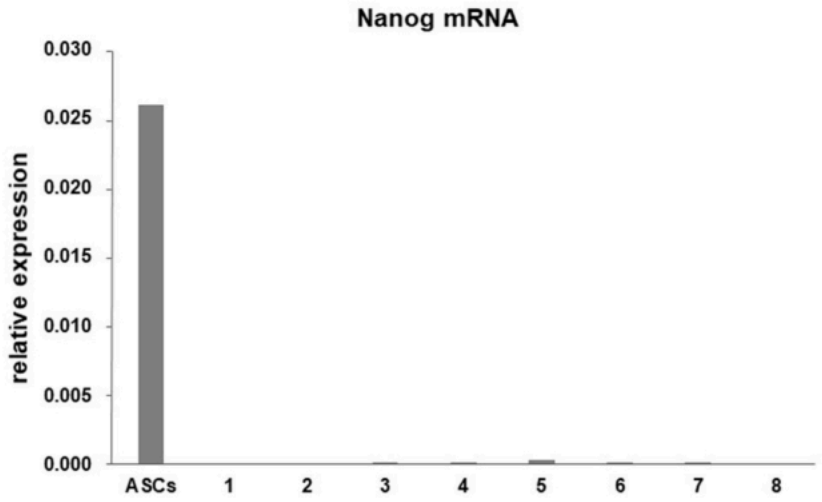


Figura 2. Gráficos de barras que muestran los niveles de ARNm de Nanog en células madre derivadas de tejido adiposo (ASCs) y en los ocho cultivos celulares de tenocitos, evaluados mediante PCR en tiempo real. Los datos se normalizaron según la expresión génica de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

La maduración del colágeno se evaluó analizando por PCR en tiempo real la expresión génica de LH2b, implicada en el entrecruzamiento del colágeno recién sintetizado. Los niveles de ARNm de LH2b no fueron modificados por MD-Tissue en ninguno de los tiempos considerados (Figura 3). El análisis por slot blot reveló que los niveles de proteína COL-I secretada en el medio de cultivo por los tenocitos cultivados sobre MD-Tissue aumentaron (+25%, +19% y +18%, respectivamente, para COL frente a NC después de 24, 48 y 72 h). Este incremento fue estadísticamente significativo en las células cultivadas sobre COL, en comparación con NC, en todos los tiempos considerados ($p < 0,005$, $p < 0,05$ y $p < 0,05$ para MD-Tissue frente a CT, respectivamente, a las 24, 48 y 72 h) (Figura 4A,B). Para demostrar que la expresión de colágeno detectada por slot blot provenía de los tenocitos y no del recubrimiento, se preparó un slot blot para analizar la expresión de COL-I en el mismo volumen (100 µL) de medio de cultivo de tenocitos, DMEM de un pocillo recubierto con MD-Tissue, DMEM solo y tampón TBS. El resultado mostró una banda inmunorreactiva solo en tenocitos, demostrando que el colágeno se originaba únicamente en las células y no en el recubrimiento (Figura 3C). En contraste, los niveles de proteína COL-III fueron secretados de manera similar por tenocitos NC y MD-Tissue (datos no mostrados).

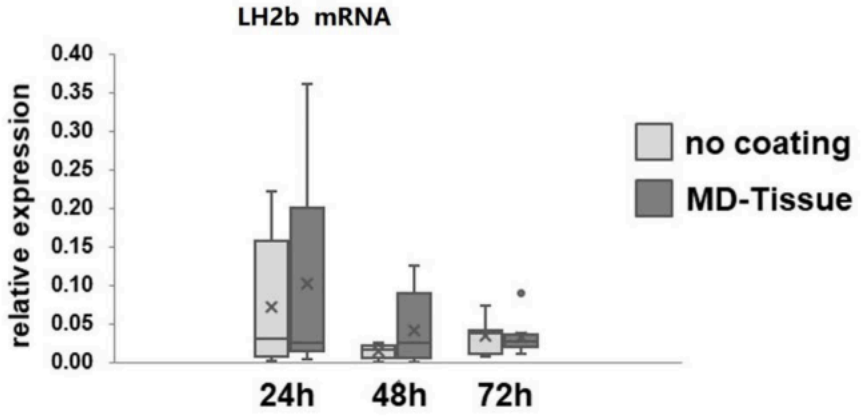


Figura 3. Gráficos de barras que muestran los niveles de ARNm de lisil hidroxilasa 2 larga (LH2b) en tenocitos NC y tenocitos cultivados sobre MD-Tissue (COL), evaluados mediante PCR en tiempo real. Los datos se normalizaron según la expresión génica de GAPDH y se expresan como media ± DE para al menos dos experimentos independientes de las ocho muestras analizadas por duplicado. ×: media; ?: muestra atípica.

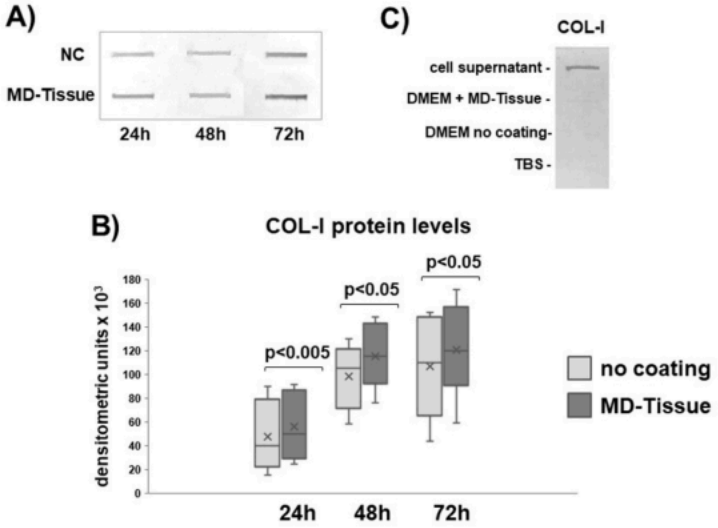


Figura 4. Análisis representativo por slot blot de la expresión de colágeno tipo I (COL-I): (A) expresión en el medio de cultivo celular de tenocitos cultivados sin recubrimiento (NC) o sobre MD-Tissue. (B) Gráficos de barras que muestran los niveles de proteína COL-I mediante análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas del panel A. Los datos se expresan como media ± DE para las 8 muestras. (C) Análisis por slot blot para COL-I que muestra que la expresión de COL-I se origina en los tenocitos. ×: media.

El análisis de degradación del colágeno reveló que los niveles de MMP-1 (Figura 5A,B) y la actividad de MMP-2 (Figura 5C,D) fueron similares en tenocitos cultivados sin recubrimiento (NC) o sobre MD-Tissue. En contraste, la expresión génica de TIMP-1, principal inhibidor de MMP-1, fue claramente afectada por MD-Tissue. La expresión génica aumentó significativamente después de 24 h ($p < 0,05$) y mostró una tendencia a la regulación al alza después de 72 h ($p = 0,056$) (Figura 6). Se observaron diferencias interindividuales en la expresión de MMPs y en los niveles de ARNm de TIMP-1, con niveles sin cambios, aumentados o disminuidos. Sin embargo, se observó una fuerte correlación ($p = 0,056$) entre los niveles de proteína MMP-1 y la expresión génica de TIMP-1 en tenocitos cultivados sobre MD-Tissue a las 72 h.

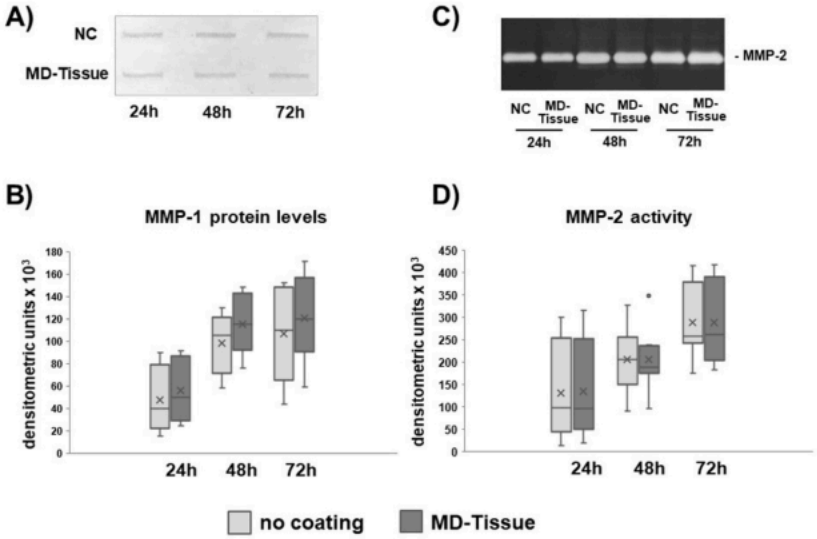


Figura 5. Slot blot representativo para los niveles de metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1) (A) y SDS-zimografía representativa que muestra la actividad de MMP-2 en sobrenadantes celulares libres de suero de tenocitos NC y MD-Tissue. Gráficos de barras que muestran los niveles de proteína MMP-1 (C) y la actividad de MMP-2 (D) tras el análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas y líticas, respectivamente. Los datos obtenidos de las ocho muestras se expresan como porcentaje de unidades densitométricas frente a NC y como ± DE. NC: sin recubrimiento. ×: media; ?: muestra atípica.

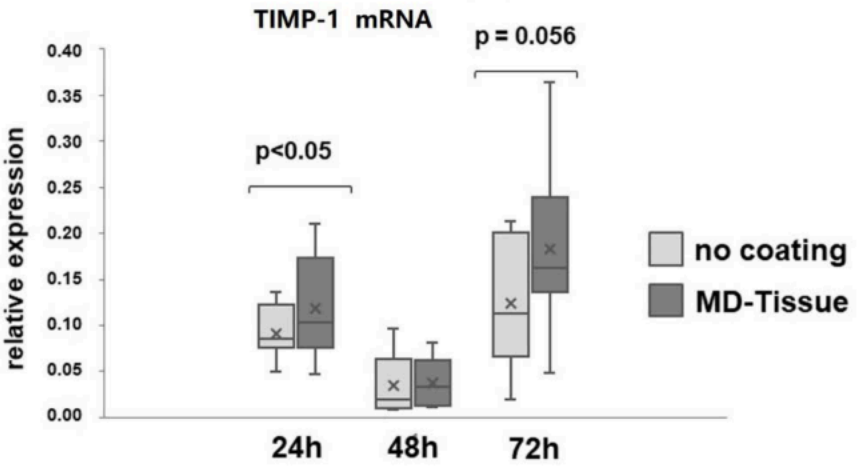


Figura 6. Gráficos de barras que muestran la expresión génica del inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz-1 (TIMP-1) tras la normalización según los niveles de ARNm de GAPDH. Los datos obtenidos de las ocho muestras se expresan como media ± DE. ×: media.

El análisis por microscopía fluorescente de F-actina (Figura 7A,B) reveló que los filamentos de actina parecen no verse afectados por MD-Tissue. En ambas condiciones experimentales, se observaron largos y orientados mayoritariamente de forma longitudinal en el citoplasma.

Para investigar si MD-Tissue influye en la capacidad de los tenocitos para formar adhesiones focales necesarias para la migración celular, se analizó la expresión génica de vinculina (VCN) y quinasa de adhesión focal (FAK), proteínas clave en la formación de la placa de adhesión. Los niveles de ARNm de VCN y FAK, aunque con algunas diferencias interindividuales, no se modificaron por MD-Tissue (Figura 7C,D). El análisis de inmunofluorescencia para VCN mostró que la proteína se colocaliza con actina en correspondencia con la formación de adhesiones focales sobre el sustrato, y se observaron numerosas adhesiones focales en tenocitos cultivados tanto en NC como en MD-Tissue. Con frecuencia, la región correspondiente

a la presencia de adhesión focal pareció mayor en los tenocitos cultivados sobre MD-Tissue que en los tenocitos NC (véanse las flechas en la Figura 7B).

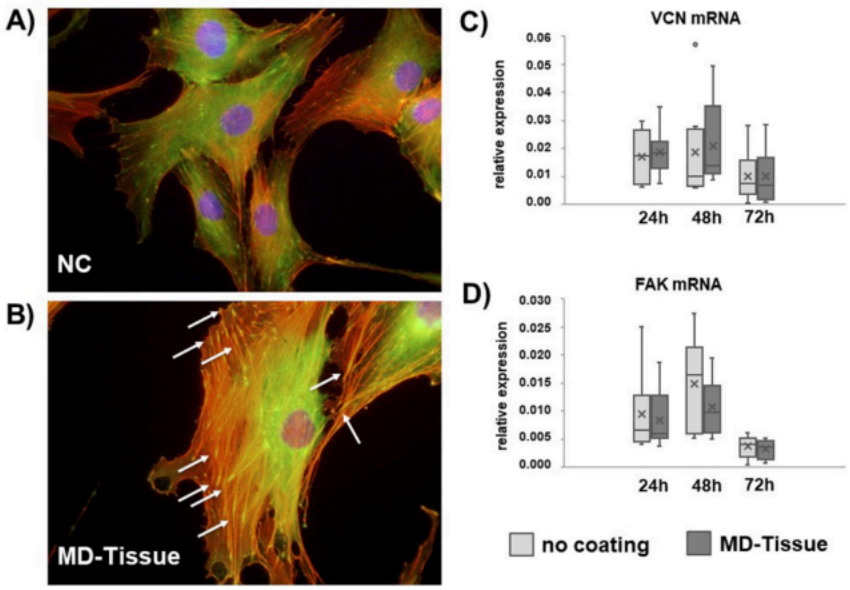


Figura 7. Análisis de inmunofluorescencia para vinculina (verde) en tenocitos control (NC) (A) y tenocitos cultivados sobre MD-Tissue (B). Los filamentos de actina se tiñeron mediante marcaje con rodamina-faloidina. Los núcleos se tiñeron en azul con DAPI. Aumento original: 60×. Los gráficos de barras muestran la expresión génica de VCN (C) y FAK (D) relativa a los niveles de ARNm de GAPDH en tenocitos NC y MD-Tissue (COL). Los datos obtenidos de las ocho muestras se expresan como media ± DE. ×: media; ?: muestra atípica.

El ensayo de cierre de herida se utilizó para analizar la migración de los tenocitos cultivados sobre MD-Tissue. La comparación del tamaño del ?scratch? reveló que la migración celular aumentó significativamente por MD-Tissue ($p < 0,05$ frente a NC) (Figura 8).

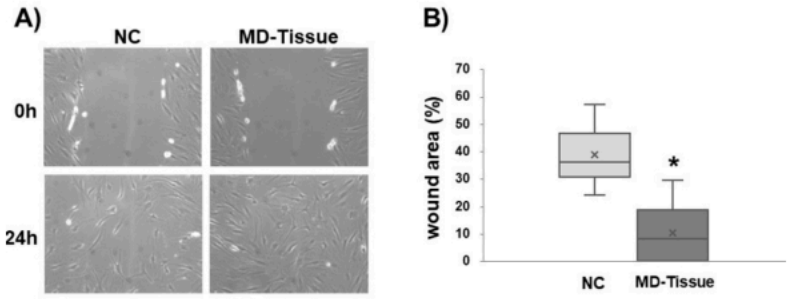


Figura 8. (A) Micrografías representativas del ensayo de cierre de herida en tenocitos control (NC) y tenocitos cultivados sobre MD-Tissue a 0 y 24 h después del raspado. Aumento original: 10×. (B) Gráfico de barras que muestra el área de cierre de la herida, expresada como porcentaje del área a 0 h, en tenocitos cultivados en ambas condiciones experimentales 24 h después del raspado. * $p < 0,005$ frente a NC. ×: media.

El tratamiento de la tendinopatía, incluyendo el síndrome de dolor trocantérico mayor y otras localizaciones, sigue siendo un problema importante para los clínicos, porque su patogénesis aún no se comprende por completo y muchos tratamientos carecen de evidencia sólida. En este estudio se buscó caracterizar in vitro los mecanismos moleculares activados en tenocitos humanos por MD-Tissue®, y los principales hallazgos revelan que este compuesto médico inyectable basado en colágeno podría favorecer

la reparación tendinosa al inducir la proliferación y migración de tenocitos, y al estimular la síntesis, secreción y maduración de COL-I.

Los tendones cumplen funciones clave en el sistema musculoesquelético al transferir al esqueleto las fuerzas generadas por la contracción muscular. Sus propiedades mecánicas se basan en la estructura y composición de la matriz extracelular (ECM), constituida principalmente por colágeno tipo I (COL-I), que representa aproximadamente el 60-85% de la masa seca del tendón y alrededor del 95% del colágeno total, además de elastina, que constituye entre 1-2% [13-15]. El colágeno y la elastina se encuentran inmersos en una sustancia fundamental rica en proteoglucanos, glicosaminoglucanos, glicoproteínas estructurales y diversas moléculas pequeñas con capacidad de unión al agua, contribuyendo a la estabilización de toda la estructura tendinosa. La estructura y composición únicas de los tendones les confieren su estabilidad mecánica característica, y el COL-I representa el factor más importante para la resistencia mecánica del tendón.

Los tenocitos son fibroblastos especializados del tendón, interpuestos entre haces de fibras de colágeno y alineados a lo largo del eje longitudinal del tendón. Son responsables de la síntesis y degradación del colágeno y de todos los componentes de la ECM. Actúan como mecanosensores, con funciones clave en la respuesta adaptativa del tendón, y modifican sus actividades metabólicas en respuesta a fuerzas mecánicas, cambiando la expresión génica de componentes de la ECM y afectando, en consecuencia, las propiedades mecánicas del tendón [14,16,17].

Las propiedades mecánicas del tendón dependen de su estructura y composición, lo que permite la adaptación tisular frente a fuerzas mecánicas. Los tenocitos convierten estímulos mecánicos en señales bioquímicas que finalmente conducen a cambios fisiológicos o patológicos adaptativos del tendón. Las cargas mecánicas fisiológicas suelen ser beneficiosas para los tendones, al mejorar sus propiedades mecánicas [25-27] y aumentar la síntesis de colágeno [28]. Por ello, las cargas adecuadas inducen adaptación tendinosa y tienen efectos anabólicos, mejorando la resistencia y la calidad de reparación tras una lesión.

El colágeno es el principal componente de la ECM del tendón; su recambio está controlado por los tenocitos a nivel de síntesis, maduración y degradación, determinando la capacidad del tendón para resistir fuerzas mecánicas y repararse ante una lesión [14]. Nuestros datos muestran que la secreción de COL-I fue inducida significativamente por MD-Tissue® en todos los tiempos considerados, lo que sugiere que este compuesto médico puede estimular un fenotipo anabólico de los tenocitos. El colágeno recién sintetizado experimenta entrecruzamiento, requisito importante para su maduración, estabilidad de las fibrillas y mayor resistencia a la tracción del tendón [29,30]. Además, los datos muestran que este compuesto no afectó la expresión génica de LH2b, necesaria para el entrecruzamiento durante la maduración del colágeno, sugiriendo que la estabilidad del colágeno no se altera.

Dado que el contenido de colágeno resulta de un equilibrio dinámico entre síntesis y degradación mediada por MMPs, la resistencia tendinosa depende fuertemente de las vías degradativas. La degradación de COL es realizada por MMP-1, capaz de escindir la triple hélice intacta del colágeno, seguida por otras proteasas [31,32]. El papel de MMP-1 se refuerza por la correlación inversa previamente demostrada entre la expresión génica/proteica de MMP-1 y la amplitud de carga tensil sobre los tendones, lo que sugiere que niveles bajos de MMP-1 conducen a una estructura tendinosa más estable y menos susceptible al daño [33]. La activación y actividad de las MMPs están reguladas por TIMPs [34,35], y TIMP-1 es el principal inhibidor de MMP-1. En este estudio, MMP-1 y MMP-2 no fueron modificadas por MD-Tissue®, pero se observó un aumento significativo de la expresión génica de TIMP-1 tras 24 h y una tendencia a regulación al alza a las 72 h. Este resultado sugiere que MD-Tissue puede estimular la secreción de COL por los tenocitos, aumentar el contenido de COL en tendones y favorecer dicho aumento mediante inhibición de su degradación.

Se observaron algunas diferencias interindividuales en líneas celulares de fibroblastos, especialmente en ARNm de LH2b, MMPs y TIMP-1. En algunos tenocitos, la expresión permaneció sin cambios, aumentó o disminuyó. Estas diferencias ya se habían descrito en fibroblastos gingivales, apoyando la teoría de subpoblaciones celulares [36], según la cual distintas subpoblaciones responden de manera diferente a estímulos externos o endógenos.

La heterogeneidad de los fibroblastos también se describió recientemente [37]. De acuerdo con esta teoría, puede plantearse que también es válida para fibroblastos derivados de otros tejidos, como los tenocitos.

La homeostasis de la ECM está influida por las fuerzas mecánicas que actúan sobre los tendones, y los tenocitos son efectores clave en la remodelación de la ECM tendinosa y en la adaptación a la carga mecánica experimentada. Son células mecanoresponsivas capaces de convertir señales mecánicas en eventos biológicos, como expresión génica y proliferación celular [38,39]. Los tenocitos perciben cambios en su entorno mecánico mediante un sistema de mecanotransducción basado en el citoesqueleto de actina, y responden modificando su actividad [33]. Dado que la organización e integridad del citoesqueleto de actina constituyen un aparato clave de mecanotransducción que influye en la homeostasis tensional y en la mecanorespuesta necesaria para mantener el equilibrio de la ECM [40,41], investigamos si MD-Tissue® afectaba el citoesqueleto de actina. Los datos muestran que los filamentos de actina se marcaron intensamente y se dispusieron longitudinalmente en tenocitos cultivados sobre plástico (NC) o sobre MD-Tissue®, con organización similar en ambas condiciones, sugiriendo que este componente del aparato mecanoresponsivo no es modificado por el compuesto médico.

El citoesqueleto de actina participa activamente en la migración celular, proceso dinámico mediado por un ciclo repetido de adhesión a la ECM, generación de fuerzas citoesqueléticas de propulsión y posterior desprendimiento de la célula de la matriz. La adhesión celular a la ECM está mediada por integrinas, proteínas transmembrana que actúan como puente para transmitir fuerzas entre el interior y exterior celular. El dominio extracelular de la integrina se une a componentes de la ECM, mientras que su dominio citoplásmico se vincula con proteínas intracelulares situadas entre los filamentos de actina y la integrina, formando complejos de adhesión focal en el borde de avance celular [42]. Las adhesiones focales no solo transmiten señales mecánicas desde la ECM hacia la célula para modular la remodelación de la ECM, sino que también generan la tracción necesaria para la migración celular [42].

Utilizamos un ensayo de cierre de herida para evaluar si la motilidad de los tenocitos se veía afectada por MD-Tissue®, ya que esta prueba es adecuada para estudiar los efectos de las interacciones célula-matriz sobre la migración celular, simulando la migración in vivo [21]. Se observó que este compuesto aumentó significativamente la migración celular. No se detectaron diferencias en el citoesqueleto de actina entre tenocitos NC y MD-Tissue, y la expresión génica de FAK y VCN, dos componentes principales del complejo de adhesión focal, fue similar en ambas condiciones, respaldando una capacidad semejante para formar adhesiones focales. Sin embargo, el análisis de inmunofluorescencia de VCN mostró adhesiones focales que parecen más evidentes en tenocitos cultivados sobre MD-Tissue, lo que sugiere que MD-Tissue® podría actuar como un andamiaje mecánico que mejora la adhesión focal, permite una mecanorrespuesta y migración más eficientes, y ayuda a mantener la homeostasis de la ECM ante distintas cargas mecánicas. Dado que la reparación y regeneración tendinosa dependen de la migración de tenocitos [43], MD-Tissue® podría favorecer la curación del tendón en tendinopatías, aunque se requieren ensayos clínicos para confirmar esta hipótesis.

Una limitación del estudio es la falta de análisis dirigidos a caracterizar la permanencia y las propiedades reológicas y viscoelásticas de MD-Tissue; sin embargo, existen estudios clínicos que demuestran que los compuestos médicos basados en colágeno son eficaces en patologías osteoarticulares [18,19]. MD-Tissue podría ofrecer ventajas frente a otros agentes biológicos, al poder administrarse solo o asociado con otros agentes terapéuticos y por su menor costo en comparación con ácido hialurónico de bajo o alto peso molecular, lo que permitiría un uso más amplio y una reducción del consumo de AINEs.

Considerados en conjunto, estos hallazgos in vitro sugieren un mecanismo por el cual MD-Tissue podría actuar como un andamiaje mecánico capaz de inducir un fenotipo anabólico en los tenocitos, favoreciendo la homeostasis y la reparación del tendón. De forma interesante, se demostró [20] que la adición de colágeno tipo I soluble en ácido a

fibroblastos cultivados sobre plástico también afectó los mecanismos de recambio del colágeno, ya que parte del colágeno sale de la solución y precipita sobre las superficies celulares, produciendo aún efectos no mediados por una interacción célula-sustrato. Esto sugiere que una pequeña resistencia mecánica es suficiente para activar receptores celulares, influir en el recambio del colágeno y, probablemente, en otras actividades biológicas de los tenocitos. Puede plantearse que el efecto de MD-Tissue también esté mediado por este mecanismo alternativo. Nuestros resultados sugieren que MD-Tissue® podría representar un enfoque terapéutico novedoso y estimular nuevos ensayos clínicos para investigar sus efectos en patologías tendinosas difíciles. Con base en los hallazgos in vitro obtenidos en tenocitos glúteos, se realizará en el futuro un ensayo clínico para demostrar su utilidad en GTPS.

Author Contributions: Conceptualization, N.G.; F.R; Methodology, N.G; Investigation, N.G., F.R, A.G.V., A.M, M.G.M., M.B., and F.S; Data Curation, N.G.; Writing—Original Draft Preparation, N.G.; Writing—Review and Editing, N.G., F.R, A.G.V., A.M, M.G.M., M.B., and F.S.

Funding: This study was partially supported by Guna S.p.a. The funder had no role in the design or conduct of the study, in analysis and interpretation of data, or in the preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We thank Anna Brini (Department of Biomedical, Surgical and Dental Sciences, University of Milan) for providing ASCs cells, and Lorenzo Castagnoli (Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan) for providing primers for Nanog analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare that the manuscript is free of conflict of interest. This study was partially supported by Guna S.p.a. The sponsor had no role in the design or conduct of the study, in analysis and interpretation of data, or in preparation of the manuscript.

References

1. Giai Via, A.; Papa, G.; Oliva, F.; Maffulli, N. Tendinopathy. *Curr. Phys. Med. Rehabil. Rep.* **2016**, *4*, 50–55. [CrossRef]
2. Ejnisman, L.; Safran, M.R. Biologics in hip preservation. *Ann. Joint* **2018**, *3*, 50. [CrossRef]
3. Karpinski, M.R.; Piggott, H. Greater trochanteric pain syndrome. A. report of 15 cases. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1985**, *67*, 762–763. [CrossRef] [PubMed]
4. Fearon, A.M.; Scarvell, J.M.; Neeman, T.; Cook, J.L.; Cormick, W.; Smith, P.N. Greater trochanteric pain syndrome: Defining the clinical syndrome. *Br. J. Sports Med.* **2013**, *47*, 649–653. [CrossRef]
5. Frizziero, A.; Vittadini, F.; Pignataro, A.; Gasparre, G.; Biz, C.; Ruggieri, P.; Masiero, S. Conservative management of tendinopathies around hip. *Muscles, Ligaments Tendons J.* **2016**, *6*, 281–292. [CrossRef] [PubMed]
6. Reid, D. The management of greater trochanteric pain syndrome: A systematic literature review. *J. Orthop.* **2016**, *13*, 15–28. [CrossRef] [PubMed]
7. Grimaldi, A.; Mellor, R.; Hodges, P.; Bennell, K.; Wajswelner, H.; Vicenzino, B. Gluteal tendinopathy: A review of mechanisms, assessment and management. *Sports Med.* **2015**, *45*, 1107–1119. [CrossRef]
8. Seo, K.H.; Lee, J.Y.; Yoon, K.; Do, J.G.; Park, H.J.; Lee, S.Y.; Park, Y.S.; Lee, Y.T. Long-term outcome of low-energy extracorporeal shockwave therapy on gluteal tendinopathy documented by magnetic resonance imaging. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e019746. [CrossRef]
9. Del Buono, A.; Papalia, R.; Khanduja, V.; Denaro, V.; Maffulli, N. Management of the greater trochanteric pain syndrome: A. systematic review. *Br. Med. Bull.* **2012**, *102*, 115–131. [CrossRef]
10. Fitzpatrick, J.; Bulsara, M.K.; O'Donnell, J.; McCrory, P.R.; Zheng, M.H. The effectiveness of platelet-rich plasma injections in gluteal tendinopathy a randomized, double-blind controlled trial comparing a single platelet-rich plasma injection with a single corticosteroid injection. *Am. J. Sports Med.* **2018**, *46*, 933–939. [CrossRef]
11. Thomas, A.; Bucher, T.A.; Ebert, J.R.; Smith, A.; Breidahl, W.; Fallon, M.; Wang, T.; Zheng, M.H.; Janes, G.C. Autologous tenocyte injection for the treatment of chronic recalcitrant gluteal tendinopathy a prospective pilot study. *Orthopaedic J. Sports Med.* **2017**, *5*, 1–10. [CrossRef]
12. Andia, I.; Maffulli, N. How far have biological therapies come in regenerative sports medicine? *Expert Opin. Biol. Ther.* **2018**, *18*, 785–793. [CrossRef]
13. Kannus, P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J. Med. Sci Sports* **2000**, *10*, 312–320. [CrossRef]

14. Kjaer, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 649–698. [CrossRef] [PubMed]
15. Riley, G.P.; Harrall, R.L.; Constant, C.R.; Chard, M.D.; Cawston, T.E.; Hazleman, B.L. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann. Rheum. Dis.* **1994**, *53*, 367–376. [CrossRef] [PubMed]
16. Banes, A.J.; Horesovsky, G.; Larson, C.; Tsuzaki, M.; Judex, S.; Archambault, J.; Zernicke, R.; Herzog, W.; Kelley, S.; Miller, L. Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells. *Osteoarthritis Cartilage* **1999**, *7*, 141–153. [CrossRef] [PubMed]
17. Benjamin, M.; Ralphs, J.R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *196*, 85–130.
18. Martin, L.S.; Massafra, U.; Bizzi, E.; Migliore, A. A double blind randomized active-controlled clinical trial on the intra-articular use of Md-Knee versus sodium hyaluronate in patients with knee osteoarthritis ("Joint"). *BMC Musculoskelet Disord* **2016**, *17*, 94. [CrossRef]
19. Pavelka, K.; Jarosova, H.; Sleglova, O.; Svobodova, R.; Votavova, M.; Milani, L.; Prochazka, Z.; Kotlarova, L.; Kostiuk, P.; Sliva, J.; et al. Chronic Low Back Pain: Current Pharmacotherapeutic Therapies and a New Biological Approach. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1–8. [CrossRef]
20. Ritty, T.M.; Herzog, J. Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. *J. Orthop. Res.* **2003**, *21*, 442–450. [CrossRef]
21. Menon, A.; Pettinari, L.; Martinelli, C.; Colombo, G.; Portinaro, N.; Dalle-Donne, I.; d'Agostino, M.C.; Gagliano, N. New insights in extracellular matrix remodeling and collagen turnover related pathways in cultured human tenocytes after ciprofloxacin administration. *Muscles Ligaments Tendons J.* **2013**, *113*, 122–131.
22. Liang, C.C.; Park, A.Y.; Guan, J.L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 329–333. [CrossRef] [PubMed]
23. Viganò, M.; Perucca Orfei, C.; de Girolamo, L.; Pearson, J.R.; Ragni, E.; De Luca, P.; Colombini, A. Housekeeping Gene Stability in Human Mesenchymal Stem and Tendon Cells Exposed to Tenogenic Factors. *Tissue Eng. Part. C Methods* **2018**, *24*, 360–367. [CrossRef] [PubMed]
24. Calloni, R.; Cordero, E.A.; Henriques, J.A.; Bonatto, D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev.* **2013**, *22*, 1455–1476. [CrossRef] [PubMed]
25. Viidik, A. The effect of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. *Scand J. Plast Reconstr. Surg.* **1967**, *1*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
26. Woo, S.L.; Ritter, M.A.; Amiel, D.; Sanders, T.M.; Gomez, M.A.; Kuei, S.C.; Garfin, S.R.; Akeson, W.H. The biomechanical and biochemical properties of swine tendons–long term effects of exercise on the digital extensors. *Connect. Tissue Res.* **1980**, *7*, 177–183. [CrossRef]
27. Woo, S.L.; Gomez, M.A.; Amiel, D.; Ritter, M.A.; Gelberman, R.H.; Akeson, W.H. The effects of exercise on the biomechanical and biochemical properties of swine digital flexor tendons. *J. Biomech. Eng.* **1981**, *103*, 51–56. [CrossRef]
28. Langberg, H.; Rosendal, L.; Kjaer, M. Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J. Physiol.* **2001**, *534*, 297–302. [CrossRef]
29. Silver, F.H.; Christiansen, D.; Snowhill, P.B.; Chen, Y.; Landis, W.J. The role of mineral in the storage of elastic energy in turkey tendons. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 180–185. [CrossRef]
30. Walker, L.C.; Overstreet, M.A.; Yeowell, H.N. Tissue-specific expression and regulation of the alternatively-spliced forms of lysyl hydroxylase 2 (LH2) in human kidney cells and skin fibroblasts. *Matrix. Biol.* **2005**, *23*, 515–523. [CrossRef]
31. Sakai, T.; Gross, J. Some properties of the products of reaction of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry* **1967**, *6*, 518–528. [CrossRef] [PubMed]
32. Woessner, F.J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2145–2154. [CrossRef] [PubMed]
33. Arnoczky, S.P.; Tian, T.; Lavagnino, M.; Gardner, K. Ex vivo static tensile loading inhibits MMP-1 expression in rat tail tendon cells through a cytoskeletally based mechanotransduction mechanism. *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 328–333. [CrossRef]
34. Brew, K.; Dinakarpandian, D.; Nagase, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1477*, 267–283. [CrossRef]

35. Murphy, G.; Willenbrock, F.; Crabbe, T.; O'Shea, M.; Ward, R.; Atkinson, S.; O'Connell, J.; Docherty, A. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1994**, *732*, 31–41. [CrossRef] [PubMed]
36. Phipps, R.P.; Borrello, M.A.; Blieden, T.M. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J. Periodontal Res.* **1997**, *32*, 159–165. [CrossRef] [PubMed]
37. Archana, A.; Srikanth, V.; Sasireka; Kurien, B.; Ebenezer. Fibroblast Heterogeneity in Periodontium. *Int. J. Dental Sci. Res.* **2014**, *2*, 50–54. [CrossRef]
38. Burridge, K.; Guilluy, C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp. Cell. Res.* **2016**, *343*, 14–20. [CrossRef]
39. Wang, J.H.; Guo, Q.; Li, B. Tendon Biomechanics and Mechanobiology-A Minireview of Basic Concepts and Recent Advancements. *J. Hand Ther.* **2012**, *25*, 133–140. [CrossRef]
40. Docking, S.; Samiric, T.; Scase, E.; Purdam, C.; Cook, J. Relationship between compressive loading and ECM changes in tendons. *Muscle Ligaments Tendons J.* **2013**, *3*, 7–11. [CrossRef]
41. Heinemeier, K.M.; Olesen, J.L.; Haddad, F.; Schjerling, P.; Baldwin, K.M.; Kjaer, M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *106*, 178–186. [CrossRef] [PubMed]
42. Reed, M.J.; Ferara, N.S.; Vernon, R.B. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 1203–1220. [CrossRef]
43. Jones, M.E.; Mudera, V.; Brown, R.A.; Cambrey, A.D.; Grobbelaar, A.O.; McGrouther, D.A. The early surface cell response to flexor tendon injury. *J. Hand Surg. Am.* **2003**, *28*, 221–230. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).