



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA Y FISIOTERAPIA

**TESIS DOCTORAL**

**“EFECTOS HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES  
PRODUCIDOS POR LA TÉCNICA FISIOTERÁPICA  
ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR (EPI)  
EN LAS TENDINOPATÍAS”**

**LAURA CALDERÓN DÍEZ**

**Salamanca 2019**



Los abajo firmantes, Drs. D. Manuel Javier Herrero Turrión Y D. José Luis Sánchez Sánchez miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y del Departamento de Enfermería y Fisioterapia, respectivamente

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado **“EFECTOS HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES PRODUCIDOS POR LA TÉCNICA FISIOTERÁPICA ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR (EPI) EN LAS TENDINOPATÍAS”** ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Laura Calderón Díez, y reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 18 de marzo de 2019.

Fdo.:

Dra. José Luis Sánchez Sánchez

Fdo.:

Dr. D. Manuel Javier Herrero Turrión





VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DPTO. DE ENFERMERÍA Y FISIOTERAPIA

El abajo firmante, Dr. D. José Ignacio Calvo Arenillas, Catedrático de la Escuela Universitaria de Enfermería y Fisioterapia de la Universidad de Salamanca y coordinador del programa de Doctorado Salud, Discapacidad, Dependencia y Bienestar perteneciente al Departamento de Enfermería y Fisioterapia de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado **"EFECTOS HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES PRODUCIDOS POR DE LA TÉCNICA FISIOTERÁPICA ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR (EPI) EN LAS TENDINOPATÍAS"** ha sido realizado bajo su tutorización por Dña. Laura Calderón Díez, y reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 18 de marzo de 2019.

Fdo.:

Dr. D. José Ignacio Calvo Arenillas



A mis pollitos

*"La educación es el arma más poderosa que puedes usar para  
cambiar el mundo"*

*Nelson Mandela*





## AGRADECIMIENTOS

*"Si he visto más lejos que otros, es poniéndome de pie sobre los hombros de gigantes"*

*Isaac Newton*

Una tesis doctoral no es un trabajo individual, y que llegue a buen puerto es gracias al esfuerzo y trabajo en equipo de varios profesionales. En mi caso, he tenido la suerte de encontrarme "a hombros de 2 gigantes", mis directores de tesis, contar con su inestimable ayuda ha hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. D. Manuel Javier Herrero Turrión el darme la oportunidad de trabajar a su lado. Ha sido un privilegio poder contar con sus orientaciones y consejos, su gran conocimiento de la materia y su juiciosa dirección. Ya sabía que era una gran persona y ahora he comprobado que también es un gran profesional.

En segundo lugar, al Dr. D. José Luis Sánchez Sánchez, por desatascar mi cabeza y enseñarme a razonar e iluminar con sus ideas este trabajo cuando yo tantas veces me desesperaba. Es un ejemplo para muchos en su profesión y me considero una afortunada por tener tan accesible su experiencia y conocimiento.

Al Dr. D. José Ignacio Calvo Arenillas, Checho, por tutorizarme con sabios consejos, y por toda una vida dedicada a la enseñanza, siempre dispuesto a ayudar desinteresadamente a los demás.

A Pedro Ordóñez, porque nos enseñó a amar la fisioterapia y a utilizar el sentido común para poder disfrutarla.

A mis padres, por su amor incondicional y por inculcarme con su ejemplo el deber de la responsabilidad y del sacrificio.

Y por último, pero no por ello menos importante, a Jose, el otro pilar sobre el que se mantiene mi mente y mi familia, y a Iker, Alex y Mariela, porque su sonrisa es mi fuerza motriz, y porque por y para ellos, me cuestiono innumerables cosas cada día.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.



# ÍNDICE



<b>I.INTRODUCCIÓN . . . . .</b>	<b>1</b>
<b>1. EL TENDÓN. . . . .</b>	<b>5</b>
1.1. ESTRUCTURA E HISTOLOGÍA . . . . .	6
1.1.1. ESTRUCTURAS INTRATENDINOSAS. . . . .	6
1.1.1.1. Elementos celulares. . . . .	6
1.1.1.2. La Matriz extracelular. . . . .	9
1.1.2. ESTRUCTURAS EXTRATENDINOSAS. . . . .	16
1.2. VASCULARIZACIÓN . . . . .	17
1.3. INERVACIÓN . . . . .	19
1.4. BIOMECÁNICA Y FISIOLÓGÍA . . . . .	20
<b>2.PATOLOGÍA TENDINOSA. TIPOS Y TERMINOLOGÍA. . . . .</b>	<b>23</b>
<b>3.PROCESOS Y FASES DE REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DEL TENDÓN . . . . .</b>	<b>26</b>
3.1. FASE DE RESPUESTA INFLAMATORIA. . . . .	27
3.2. FASE DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA (PROLIFERATIVA). . . . .	28
3.3. FASE DE REMODELACIÓN/MADURACIÓN. . . . .	29
<b>4.PATOGÉNESIS DE LAS TENDINOPATIAS. . . . .</b>	<b>30</b>
4.1. ETIOLOGÍA. . . . .	30
4.1.1. HIPÓTESIS BASADA EN LA SOBRECARGA MECÁNICA. . . . .	30
4.1.2. HIPÓTESIS BASADA EN LA RESPUESTA DE CICATRIZACIÓN. . . . .	32
4.2. FACTORES DE RIESGO. . . . .	33
4.2.1. FACTORES DE RIESGO INTRÍNSECOS. . . . .	34
4.2.2. FACTORES DE RIESGO EXTRÍNSECOS. . . . .	36
4.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA TENDINOPATÍA . . . . .	37
4.3.1. MODELO QUE RELACIONA LA SOBRECARGA Y UNA ALTERACIÓN METABÓLICA . . . . .	37
4.3.2. MODELO <i>CONTINUUM</i> . . . . .	41
4.3.2.1. Fase 1: Tendinopatía reactiva . . . . .	42
4.3.2.2. Fase 2. Tendón desestructurado / degeneración tendinosa . . . . .	43
4.3.2.3. Fase 3. Tendinopatía degenerativa . . . . .	44
4.4. SINTOMATOLOGÍA. . . . .	45
4.4.1. MODELO MECÁNICO. . . . .	46
4.4.2. MODELO BIOQUÍMICO/ NEUROGÉNICO. . . . .	48
<b>5. TRATAMIENTOS DE LAS TENDINOPATÍAS. . . . .</b>	<b>49</b>

5.1. MODALIDADES TERAPÉUTICAS CONSERVADORAS. . . . .	51
5.1.1. VÍA INHIBITORIA: TRATAMIENTOS ENFOCADOS AL CONTROL DEL DOLOR. . . . .	51
5.1.2. VÍA ESTIMULATIVA: TRATAMIENTOS ENFOCADOS A LA ESTRUCTURA TENDINOSA. . . . .	54
5.1.3. VÍA ADAPTATIVA: TÉCNICAS ACTIVAS O ADAPTATIVAS FUNCIONALES . . . . .	57
5.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO. . . . .	60
5.3. CONCLUSIONES A LOS TRATAMIENTOS. . . . .	61
<b>6. ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR. . . . .</b>	<b>62</b>
6.1. TÉCNICA DE APLICACIÓN. . . . .	64
6.2. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS. . . . .	65
<b>7. MODELOS ANIMALES DE LAS TENDINOPATÍAS. . . . .</b>	<b>67</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. . . . .</b>	<b>69</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS. . . . .</b>	<b>73</b>
<b>1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL . . . . .</b>	<b>75</b>
<b>2. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS. . . . .</b>	<b>79</b>
2.1. INDUCCIÓN DE TENDINOPATÍA CON COLAGENASA . . . . .	79
2.2. INYECCIÓN DE SUERO SALINO. . . . .	80
2.3. ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR . . . . .	80
2.4. PUNCIÓN CON AGUJA. . . . .	81
<b>3. MATERIAL BIOLÓGICO Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES. . . . .</b>	<b>82</b>
3.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS. . . . .	83
3.1.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA. . . . .	83
3.1.2. TINCIÓN CON SAFRANINA O. . . . .	85
3.1.3. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES AL MICROSCOPIO. . . . .	86
3.2. TÉCNICA DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA. . . . .	87
3.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN. . . . .	87
3.2.2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN. . . . .	87
3.2.3. RETROTRANSCRIPCIÓN. . . . .	88
3.2.4. PCR CUANTITATIVA. . . . .	89
<b>IV. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>97</b>
<b>1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO COMPARATIVO. . . . .</b>	<b>100</b>
1.1. C vs. 1T . . . . .	100

1.2. C vs. EPI vs. PA . . . . .	101
1.3. 1T vs. 1T+EPI vs. 1T+PA . . . . .	103
2.4. 2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA . . . . .	105
<b>2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA. . . . .</b>	<b>107</b>
2.1. C vs. 1T . . . . .	108
2.2. C vs. EPI vs. PA . . . . .	108
2.3. 1T vs. 1T+EPI vs. 1T+PA . . . . .	109
2.4. 2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA . . . . .	110
<b>V. DISCUSIÓN. . . . .</b>	<b>121</b>
1. EFECTIVIDAD DE LA INDUCCIÓN DE LA TENDINOPATÍA. . . . .	123
2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA EPI EN TENDÓN SANO . . . . .	125
3. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA EPI EN TENDÓN CON TENDINOPATÍA	129
4. LA TERAPIA EPI FRENTE A OTROS TRATAMIENTOS FISIOTERÁPICOS. . . . .	144
4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO. . . . .	148
<b>VI. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>151</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA. . . . .</b>	<b>155</b>





## ABREVIATURAS

- **ADAM:** *A Disintegrin And Metalloproteinase*. Desintegrina metaloproteínasa.
- **AINEs:** Antiinflamatorios No Esteroideos.
- **CGRP:** *Calcitonin Gene-Related Peptide*. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
- **COX2:** Ciclooxygenasa 2.
- **Ct:** Ciclo umbral.
- **ECM:** Matriz ExtraCelular.
- **EPI:** Electrolisis Percutánea Intratisular.
- **GAG:** Glucosaminoglicano.
- **MMP:** Metaloproteínasa.
- **MTP:** Masaje Transverso Profundo.
- **NGF:** *Nerve Growth Factor*. Factor de crecimiento neural.
- **TOCH:** Ondas de Choque Extracorpóreas.
- **PGs:** Proteoglicanos.
- **PRF:** Plasma Rico en Factores de crecimiento.
- **PRP:** Plasma Rico en Plaquetas.
- **RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.
- **SCX:** Escleraxis.
- **SP:** Substancia P.
- **TIMPs:** *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*. Inhibidores tisulares específicos.
- **TENS:** Electroestimulación Nerviosa Transcutánea.
- **TSPC:** *Tendon stem/progenitor cells*. Células madre / progenitoras del tendón.
- **UMT:** Unión miotendinosa.
- **UOT:** Unión osteotendinosa o entesis.
- **UTC:** Técnica ecográfica *Ultrasound Tissue Characterization*.
- **VEFG:** *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular.
- **VISA-P:** *Victorian Institute of Sport Assessment – Patella*.
- **VISA-A:** *Victorian Institute of Sport Assessment – Achilles*.



# I.INTRODUCCIÓN



En las 2 últimas décadas se ha producido un cambio en el estilo de vida, destacando un aumento en la tendencia a la práctica del deporte, al entender ésta como un símbolo de salud y cuidado del cuerpo. Numerosas actividades deportivas, así como laborales, conllevan una importante sollicitación tendinosa, y en ocasiones la realización de gestos repetitivos y/o actividades con cargas elevadas convierten al tendón en una estructura susceptible de lesionarse y de desarrollar una tendinopatía.

A pesar de que la primera lesión del tendón registrada en la historia fue la de Aquiles, lo que se conoce en la actualidad sobre las lesiones de tendón todavía es insuficiente, y ha sido fundamentalmente en las 3 últimas décadas cuando la investigación ha dado un vuelco importante y ha avanzado mucho en su conocimiento.

Las tendinopatías se consideran una anomalía mecánica primaria que produce daños en la Matriz Extracelular (ECM) y que las células tendinosas intentan reparar, pero sin éxito [1]. En la actualidad, se hipotetiza que la mayoría de las tendinopatías no están relacionadas con un único factor y que el proceso degenerativo que precede a la ruptura tendinosa podría deberse a una variedad de mecanismos y factores causales [2-4].

La estrategia terapéutica en el tratamiento de estas lesiones requiere de un mayor conocimiento etiopatogénico e histológico ya que, a pesar de ser una de las lesiones músculo esqueléticas más frecuentes, con una alta incidencia tanto en el mundo laboral como en el deportivo, actualmente no existe un tratamiento de elección que esté avalado con suficiente evidencia científica ni éxito en su resultado clínico [5-12].

En fisioterapia, desde el año 2003 se cuenta con una técnica que tiene entre sus indicaciones el tratamiento de la patología tendinosa; es la Electrolisis Percutánea Intratisular (EPI), una técnica de fisioterapia invasiva que consiste en la aplicación de corriente continua (corriente galvánica) a través de una aguja de punción que actúa como electrodo negativo (cátodo) y que, mediante control ecográfico, va a provocar una reacción electroquímica en la región de tejido degenerada. Según su autor, Sánchez-Ibáñez, su objetivo es producir una respuesta inflamatoria aguda que activaría

los mecanismos fisiológicos de regeneración del tejido tendinoso degenerado [13]. En la actualidad, los estudios publicados le atribuyen a esta técnica buenos resultados clínicos en el tratamiento de las tendinopatías, con mejoría en el dolor y en la función del tendón [14-21]. Sin embargo, su base experimental es escasa, ya que no han sido aún claramente demostrados los teóricos efectos fisiológicos que se otorgan a esta técnica. En conclusión, falta investigación básica al respecto.

Consideramos que la falta de evidencia científica actual en numerosas técnicas usadas actualmente en fisioterapia es el talón de Aquiles de esta profesión. Tradicionalmente la práctica clínica de la fisioterapia se ha basado en la opinión generada a partir de la experiencia clínica y no siempre con los correspondientes avales de investigaciones científicas básicas.

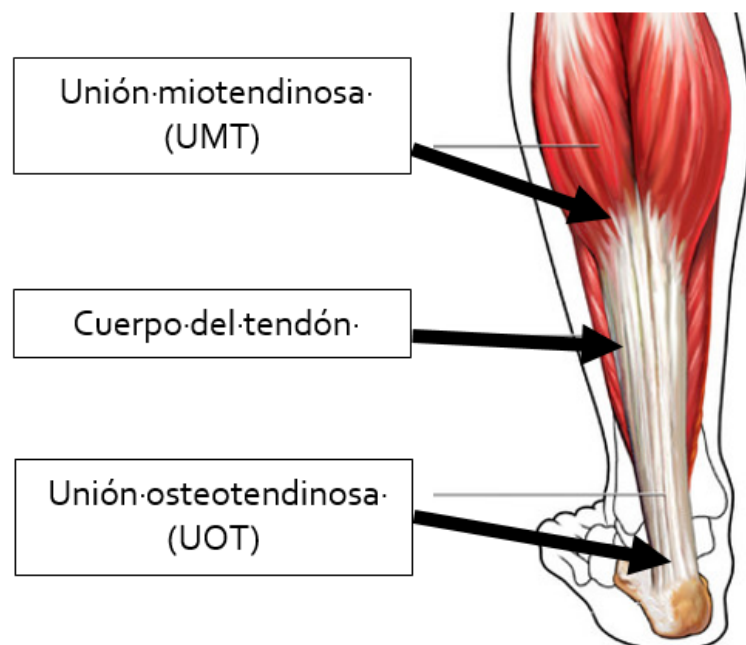
Al igual que otras disciplinas biomédicas, la fisioterapia está en continua evolución. Protocolos empleados durante años actualmente están en desuso, o incluso contraindicados, porque con el tiempo se ha concluido que no eran eficaces, y muchas de las técnicas, tras estudiarse más a fondo, se ha comprobado que no tenían más efecto beneficioso que un placebo. Numerosos profesionales han justificado sus tratamientos desde sus buenos resultados, desde la *"Fisioterapia basada en la Experiencia"*, pero eso no es suficiente. No se deben atribuir efectos teóricos a unas técnicas aplicadas en personas sin tener la mayor certeza posible de que realmente esos supuestos efectos fisiológicos que provocan son ciertos. Construir una *"Fisioterapia basada en la Evidencia"* debe ser una meta en esta profesión.

Esta tesis doctoral pretende profundizar en el conocimiento de parte de los procesos fisiológicos que se desencadenan con la aplicación de la técnica EPI. Para ello, se han analizado los cambios que tienen lugar a nivel histológico y molecular, estos últimos analizando cambios de expresión génica, tras la aplicación de esta terapia en el tendón de Aquiles sano y con tendinopatía de la rata, buscando evidencias científicas que avalen parte de los resultados clínicos publicados hasta la fecha actual al utilizar esta técnica terapéutica.

## 1. EL TENDÓN

El tendón es una organizada estructura anatómica de tejido conjuntivo situada entre un músculo y un hueso, con la función de transmitir de forma efectiva la fuerza generada por las células contráctiles de los músculos para provocar, o no, un movimiento articular, dependiendo de las fuerzas ejercidas, las cargas a mover y las posiciones adoptadas [22, 23].

Existen 4 tipos fundamentales de tejido en el cuerpo humano: epitelial, muscular, nervioso y conjuntivo. El tejido tendinoso pertenece a este último, concretamente al “tejido conjuntivo denso regular” [23], y está organizado por células y fibras conjuntivas ordenadas en haces paralelos muy juntas con el fin de proveerle de la máxima resistencia. Como se muestra en la **Figura 1**, el tendón se divide longitudinalmente en 3 zonas específicas: el punto de unión músculo-tendón, denominado unión miotendinosa (UMT), la zona media o el cuerpo, y el punto de unión tendón-hueso, llamado unión osteotendinosa (UOT) o entesis, zona de transición gradual del tendón al cartílago y al hueso [23-25].



**Figura 1.** Las tres divisiones del tendón.

Desde el punto de vista macroscópico, los tendones sanos (no patológicos) presentan un aspecto blanquecino y brillante, firmes al tacto, pero flexibles. Varían en longitud y tamaño, de tal forma que se pueden diferenciar tendones anchos, planos, cilíndricos, en forma de abanico o en forma de cinta, en función de las características del músculo con el que se relacionan [23, 24, 26]. Por otra parte, microscópicamente, los componentes que lo conforman son células (principalmente tenocitos y tenoblastos) y la matriz extracelular (ECM), compuesta mayoritariamente por una proteína estructural, el colágeno y, en menor medida, por la proteína elastina, los proteoglicanos (PGs) y las glicoproteínas de adhesión como la fibronectina y tenascina C [23, 27].

## 1. 1. ESTRUCTURA E HISTOLOGÍA

### 1.1.1. ESTRUCTURAS INTRATENDINOSAS

Todos los tendones comparten semejanzas en cuanto a su microanatomía, histología y anatomía patológica. Están compuestos por un pequeño componente celular que produce y conserva una ECM mucho más abundante [23, 27].

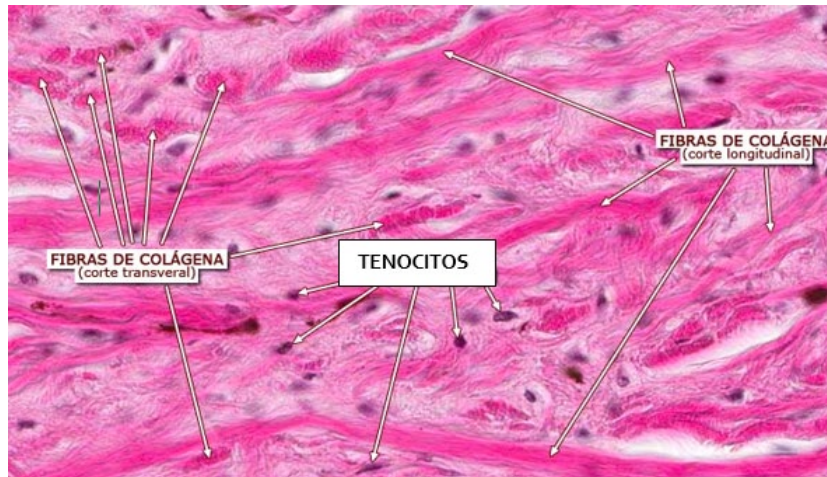
#### 1.1.1.1. Elementos celulares

Los elementos celulares del tendón están constituidos aproximadamente en un 95% por tenocitos y, en menor medida, por tenoblastos, células progenitoras, fibroblastos y otros tipos celulares [27, 28].

- **Tenocitos**

Son las células encargadas de sintetizar los componentes principales de la ECM (colágeno y PGs). Ocupan menos de un 5% del volumen del tendón sano. Intervienen de forma activa en el mantenimiento de la homeostasis del tendón y favorecen la recuperación de los tendones lesionados [29-31]. Como se muestra en la **Figura 2**, tienen forma fusiforme, alargadas longitudinal y transversalmente, e incluso algunas presentan formas estrelladas. Además, se localizan de forma intercalada y en paralelo entre las fibrillas de colágeno [22, 24, 26, 27].





**Figura 2.** Imagen histológica de un tendón sano en el que se muestran los tenocitos y las fibras de colágeno.

Desde el punto de vista metabólico, son células que tienen un cociente respiratorio bajo, lo que indica que su metabolismo es bajo [22]. Los tenocitos reaccionan únicamente a estímulos locales, y responden a fuerzas mecánicas deformándose y adaptándose a ellas, provocando las reacciones bioquímicas necesarias para variar su composición y función [32].

- **Tenoblastos**

Son las células inmaduras de los tendones, presentan forma de huso y tienen una elevada actividad metabólica. A medida que este tipo de células envejecen, se alargan y se diferencian en tenocitos; por tanto, los tenoblastos son un reservorio de tenocitos inmaduros (no diferenciados). La suma de tenoblastos y tenocitos representan el 90-95% de los elementos celulares que conforman un tendón [22, 23].

- **Células madre / progenitoras del tendón**

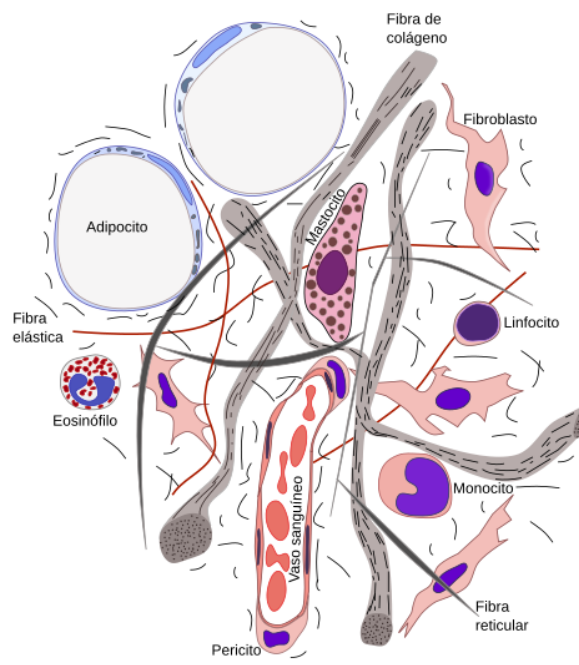
Son una población celular única, denominadas en su acrónimo en inglés TSPC (*tendon stem/progenitor cells*), que tiene características universales de células madre, como clonogenicidad, multipotencia y capacidad de autorrenovación [27]. Varios estudios sugieren que este tipo de células cultivadas *in vitro* y posteriormente trasplantadas *in vivo*, podrían regenerar el tejido tendinoso [33, 34].

- **Fibroblastos**

Son las células del tejido conectivo responsables de la síntesis de los componentes fibrosos, fundamentalmente colágeno y elastina. Están implicadas en la síntesis y mantenimiento de la ECM y son parte esencial de los procesos de reparación y regeneración tendinosa [23, 35]. Al igual que los tenocitos, se regulan exclusivamente por estímulos locales, principalmente de carácter mecánico, modificando su forma, composición y función [32].

- **Otros tipos celulares**

En menor medida (menos del 5%) y dependiendo de las circunstancias en que se encuentre el tendón, en este tejido se localizan otro tipo de células como linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células cebadas (**Fig.3**), interviniendo todas ellas en los procesos inmunes del tendón, llevando a cabo la eliminación de metabolitos de desecho o la liberación de mediadores que generan la respuesta inflamatoria [22].

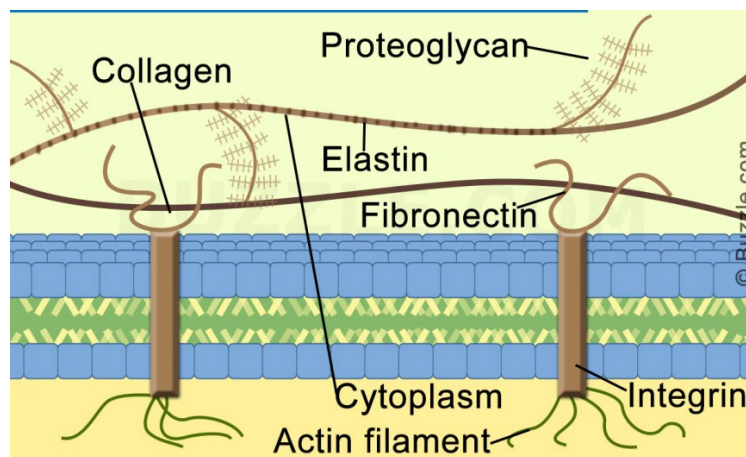


**Figura 3.** Representación esquemática de los diferentes tipos celulares que intervienen en los procesos inmunes en la estructura tendinosa.

### 1.1.1.2. La Matriz Extracelular

La Matriz Extracelular (ECM) es un medio viscoso, hidratado, incoloro, de consistencia gelatinosa, formado por una compleja trama de macromoléculas extracelulares que contribuyen de manera importante a la integridad mecánica del tendón, a su organización y al control de su crecimiento [27, 36]. Constituye la mayor parte del volumen del tendón (95% del volumen de un tendón sano), preserva sus propiedades viscoelásticas al aportar lubricación para el deslizamiento y entrecruzamiento de los tejidos, y es el espacio físico que acoge a las células descritas en el apartado anterior y a las fibras de colágeno y elastina [36, 37].

Su composición biológica está integrada por una mezcla de agua (60-80%), proteínas fibrosas (colágeno y elastina), PGs y glicoproteínas de adhesión como la fibronectina y tenascina-C (*Fig. 4*) [23]. Esta composición no es uniforme en toda la longitud del tendón, sino que presenta variaciones locales en cuanto a su contenido que le permiten ajustarse a las particularidades biomecánicas en su recorrido [27].

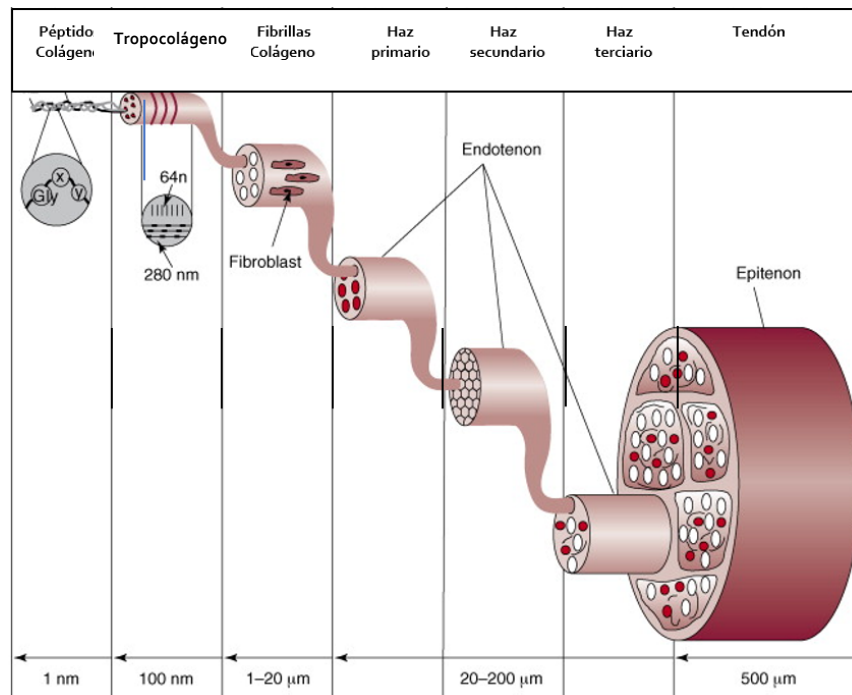


*Figura 4.* Representación de los componentes principales de la ECM.

- **Proteínas fibrosas.**

- Colágeno:** proteína que representa el 30% del peso de un tendón fresco y el 80% del peso en un tendón seco. Es sintetizada por los fibroblastos del tendón y aporta la rigidez y la resistencia a la tracción cuando se somete al tendón a una fuerza tensil, y la flexibilidad cuando se dobla, se comprime, se retuerce o se cizalla [27, 32].

Su estructura está compuesta de haces compactos de fibras que se disponen longitudinalmente siguiendo las líneas de fuerza, estructurándose en un orden jerárquico de 5 niveles diferenciados desde una unidad microscópica a un conjunto macroscópico [23]. Como se muestra en la **Figura 5**, la unidad de menor tamaño es el tropocolágeno, proteína compuesta por 3 péptidos enrollados helicoidalmente. A su vez, estas moléculas de tropocolágeno se unen por enlaces cruzados (covalentes y electrostáticos intra- e intermoleculares) formando una triple hélice, la fibrilla de colágeno, unidad funcional básica de transmisión de fuerzas en el tendón. Seguidamente, un conjunto de fibrillas de colágeno se agrupa formando el haz primario de fibrillas o subfascículo. La unión de estos haces primarios conforma el haz secundario o fascículo y, a su vez, varios de éstos, formarán el haz terciario de fibras. Finalmente, la unión de todos estos haces es lo que conforma la estructura del tendón [22, 23, 25].

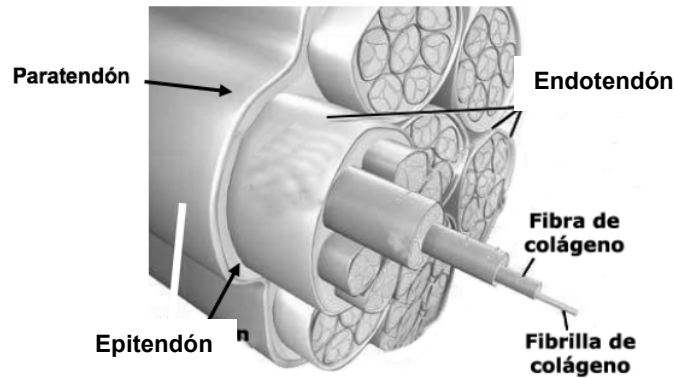


**Figura 5.** Estructura jerarquizada de la proteína del colágeno en el tendón.

En la actualidad, se han identificado hasta 27 tipos de colágeno con propiedades mecánicas diferentes [4, 27, 38-40]. En el caso del tendón, se han detectado hasta 10 tipos diferentes (tipos I, II, III, IV, V, VI, IX, X, XII y XIV), aunque principalmente están presentes los colágenos tipo I y III, constituyendo casi el 95% del colágeno total de este tejido. En concreto, el colágeno tipo I está conformado por 2 tipos de proteínas ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) codificadas por 2 genes diferentes, *Col1a1* y *Col1a2*, cuya combinación constituye el tropocolágeno, la triple hélice, con fibras de un diámetro de 40-60 nm que se entrelazan formando haces densos. Este tipo de colágeno copolimeriza con el colágeno tipo V, conocido regulador de la estructura del colágeno fibrilar [41]. Por su parte, el colágeno tipo III tiene un proceso de formación similar al del tipo I, con la excepción de que es codificado por un único gen, el *Col3a1*, traductor de 3 péptidos  $\alpha_1$  que conforman su forma de procolágeno. Este tipo de colágeno constituye fibras de menor diámetro (10-20 nm) y haces más reticulares y sueltos, lo que le hace menos resistente que el colágeno tipo I [4, 23, 27, 38].

En relación con los enlaces cruzados (covalentes y electrostáticos intra e intermoleculares), cabe destacar que son elementos de conjunción que aportan fuerza de tensión y resistencia al colágeno, haciéndolo más fuerte y con capacidad para absorber más energía, lo que aumenta su resistencia al ser sometido a tensión [26, 42, 43]. Es de matizar el hecho de que el número de enlaces cruzados va aumentando durante toda la vida de un vertebrado. Así, en etapas tempranas los tendones están constituidos por un colágeno blando, pero muy flexible, y conforme pasa el tiempo, el número de enlaces cruzados va aumentando, de tal forma que, un acúmulo excesivo de este tipo de enlaces durante la vejez es causa de tendones cada vez más rígidos, menos elásticos y, como consecuencia, más frágiles, con más susceptibilidad a lesionarse [23].

Por otra parte, y como muestra la **Figura 6**, las fibras de colágeno que conforman el tendón están rodeadas a distintos niveles por diferentes capas de tejido conjuntivo.



**Figura 6.** Diferentes capas de tejido conjuntivo que envuelven la estructura tendinosa.

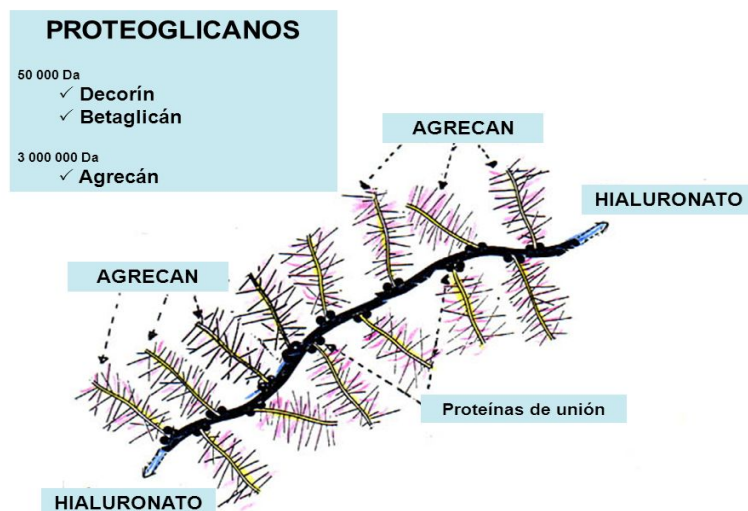
- El endotendón: es la capa más interna, y rodea a los haces terciarios de fibras. Su función es la de sostén e interviene en la vascularización tendinosa, como transporte de los vasos sanguíneos y linfáticos hasta y a través del tendón [22, 23].
- El epitendón: es la capa de tejido conjuntivo externa al endotendón, por lo que podría considerarse también como un elemento extratendinoso. Conformar una red relativamente densa de fibras longitudinales, oblicuas (dispuestas en un ángulo de 60° respecto a las fibras del tendón) y transversales, cuya función se ha sugerido que serviría como un mecanismo de defensa contra el sobre-estiramiento tendinoso [22, 23].
- El paratendón: es la última capa de tejido conjuntivo presente en aquellos tendones con trayectos rectilíneos, como el tendón de Aquiles. Tanto esta capa como el epitendón pueden variar en su densidad dependiendo de las fuerzas mecánicas y de fricción con estructuras vecinas a las que estén sometidos [44, 45].

**-Elastina:** es la proteína que contribuye a dar elasticidad al tendón y que representa aproximadamente el 2% de su peso seco. Es la responsable de devolver al tendón su configuración original ondulada tras ser estirado y le permite alargarse (sin romperse) hasta un 70% de su longitud [23, 46]. En algunas condiciones patológicas, como alteraciones hormonales, el número y volumen de las fibras de elastina está significativamente aumentado, mientras

que, en procesos de reparación del tendón, como en las heridas, se encuentra en un menor número [46].

• **Proteoglicanos (PGs).**

Los PGs son un grupo heterogéneo de biomoléculas compuestas por una proteína central a la que se unen covalentemente un tipo especial de polisacáridos, los glucosaminoglicanos (GAGs); así, su constitución en porcentaje es un 20% de fracción proteica y un 80% de polisacárido. Desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la estructura tendinosa ya que funcionan como organizadores de este tipo de tejido modulando el crecimiento celular y su maduración, regulando las actividades de los factores de crecimiento y la fibrillogénesis del colágeno [39, 47, 48]. Además, al ser los PGs moléculas hidrofílicas y cargadas negativamente, proporcionan a las fibrillas de colágeno una gran capacidad para resistir altas fuerzas de compresión y tensión [27]. En el tendón hay varios tipos de PGs como la decorina, biglicano, fibromodulina, lumican, agrecan y versican. Por su parte, los tipos de GAGs más habituales presentes en estos PGs son el ácido hialurónico y el condroitin sulfato (*Fig. 7*).



*Figura 7. Representación esquemática de proteoglicanos.*

- **Glicoproteínas de adhesión.**

Este tipo de macromoléculas están compuestas por una proteína unida mediante enlaces covalentes a uno o varios carbohidratos y, a diferencia de los PGs, su porcentaje de proteína es mucho mayor que el de glúcidos. Ejercen función de adhesión y favorecen la cohesión del entramado celular.

Se han identificado al menos 4 de estos tipos de macromoléculas en el tendón: fibronectina, tenascina C, trombospondina e indulina, destacando especialmente la presencia de las 2 primeras [27]. Ambas facilitan la unión de los fibroblastos a las fibras de colágeno y son factores clave en el proceso de reparación del tendón, ya que favorecen la migración de fibroblastos al tejido lesionado [27, 49].

- **Metaloproteinasas.**

Las metaloproteinasas de la ECM, simbolizadas como MMPs, son enzimas endopeptidasas que degradan, mediante hidrólisis, específicos componentes proteicos como los distintos tipos de colágeno de la matriz, e intervienen de forma activa en la fisiología del tendón al mantener su homeostasis [4, 27, 50]. Además, es conocido que también intervienen en la fisiología de determinados procesos patológicos, como en las metástasis de células tumorales y algunas enfermedades como la artritis reumatoide [51]. Diferentes agentes químicos, moléculas como factores de crecimiento, y determinadas cargas mecánicas, activan su síntesis. Asimismo, los procesos inflamatorios son también activadores del incremento de la expresión y activación de MMPs [52].

Están descritos 25 miembros de la familia de MMPs, clasificándose en 5 subfamilias: colagenasas (producen colágeno desnaturalizado), gelatinasas (hidrolizan la red más pequeña de moléculas de colágeno y las piezas de colágeno fibrilar sobrantes de la actividad de las colagenasas [53]), estromelisininas (degradan distintas proteínas estructurales de la matriz estructuras salvo los colágenos fibrilares), metaloproteasas de membrana (MT-MMP, claves en la activación del resto de MMPs y presentan tanto actividad colagenasa como gelatinasa) y otras MMPs (como la MMP<sub>11</sub>, -12) (**Tabla 1**) [27].



Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de producir la degradación de la práctica totalidad de los componentes macromoleculares de la ECM.

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC
Colagenasas		
MMP-1	Colagenasa-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agrecan
MMP-13	Colagenasa 3	Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, agrecan, osteonectina
Gelatinasas		
MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecan, versican, osteonectina, proteoglicanos
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, agrecan, versican, proteoglicanos, osteonectina
Estromalinas		
MMP-3	Estromalinas-1	Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agrecan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina
MMP-10	Estromalinas-2	Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, agrecan, elastina, proteoglicanos
MMP-11	Estromalinas-3	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina
Tipo membrana		
MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina
MMP-17	MT4-MMP	ND
MMP-24	MT5-MMP	ND
MMP-25	MT6-MMP	ND
Otras		
MMP-7	Matrilisina	Colágenos IV y X, gelatina, agrecan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína, transferrina, integrina b <sub>4</sub> , osteonectina, elastina
MMP-12	Metaloelastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina
MMP-23A	MMP-21	ND
MMP-23B	MMP-22	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína
MMP-27	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína

MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteasas; ND: no determinado.

**Tabla 1.** Diferentes tipos de MMPs. Tomado de Rodríguez y cols. (2007) [54].

La actividad de las MMPs está regulada por los inhibidores tisulares específicos, los TIMPs (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Estos inhibidores endógenos están también presentes en la ECM y actúan al unirse a las MMPs mediante enlaces no covalentes y de forma reversible, a su dominio catalítico, y a unas proteínas de membrana con actividad enzimática y de adhesión denominadas desintegrinas metaloproteinasas (ADAMs: *A Disintegrin And Metalloproteinase*). En la actualidad se han identificado 4 tipos de TIMPs (TIMP<sub>1</sub> al -4) y 19 tipos de ADAMs [4, 52].

Es de destacar también el hecho de que a lo largo de la longitud del tendón se han detectado diferencias regionales en la expresión de distintos tipos de colágeno, y también de MMPs y TIMPs, probablemente debido a diferentes demandas mecánicas del tendón [52].

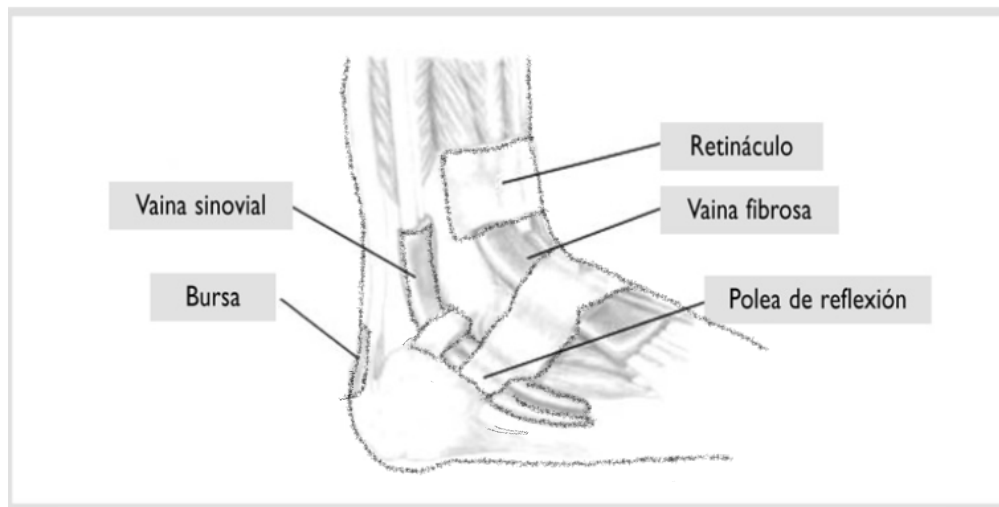
En la estructura tendinosa, un desequilibrio entre las MMPs y sus reguladores (TIMPs y ADAMs) desencadenaría una serie de alteraciones del contenido de colágeno y otros componentes proteicos, favoreciendo una mayor degradación y desorganización de la ECM y provocando cambios en las propiedades estructurales y viscoelásticas de este tejido [4, 55, 56].

### 1.1.2. ESTRUCTURAS EXTRATENDINOSAS

Los tendones se encuentran rodeados de una serie de estructuras extratendinosas que favorecen su correcto funcionamiento y mejoran su biomecánica [23]. Estos elementos varían en función de las fuerzas mecánicas que soporta el tendón y de la fricción causada por las estructuras cercanas, agrupándose, de acuerdo con la clasificación de Ippolito y Postacchini [25], en 5 categorías (**Fig. 8**).

- **Vainas sinoviales:** son túneles compuestos por 2 capas, la parietal y la visceral, conformando un conducto cerrado con fluido peritendinoso cuya función es la de lubricar el tendón reduciendo así la fricción presente contra algunas estructuras anatómicas, como en el caso de los tendones de la musculatura extensora de muñeca.
- **Paratendón:** capa peritendinosa que se encuentra en algunos tendones que no tienen vaina sinovial, como el tendón de Aquiles. Su función es permitir el libre movimiento, así como reducir la fricción contra las estructuras adyacentes.
- **Retináculos:** son los conductos a través de los cuales algunos tendones, como por ejemplo los tendones peroneos, se deslizan durante el movimiento. Están presentes en zonas de flexión o extensión de tendones largos que están sometidos a importantes fricciones. En ocasiones, anatómicamente, los huesos presentan escotaduras y hendiduras para acoger al tendón y éstas se recubren por los retináculos.
- **Poleas de reflexión:** son refuerzos anatómicos de las vainas fibrosas localizados en los lugares curvos de cambio de dirección del tendón. Su función es mantener al tendón en el lecho por el que se desliza y evitar la luxación.

• **Bursas:** pequeñas bolsas de líquido sinovial que actúan como amortiguadores al reducir la fricción y asistir el movimiento tendinoso. Están situadas en lugares anatómicamente escogidos, donde músculos y tendones pueden sufrir fenómenos compresivos contra prominencias óseas que dificultan el deslizamiento entre estructuras. En situaciones no patológicas, las bursas están compuestas de 2 capas con un espacio virtual entre ambas, que reaccionan llenándose de fluido en caso de exceso de fricción.

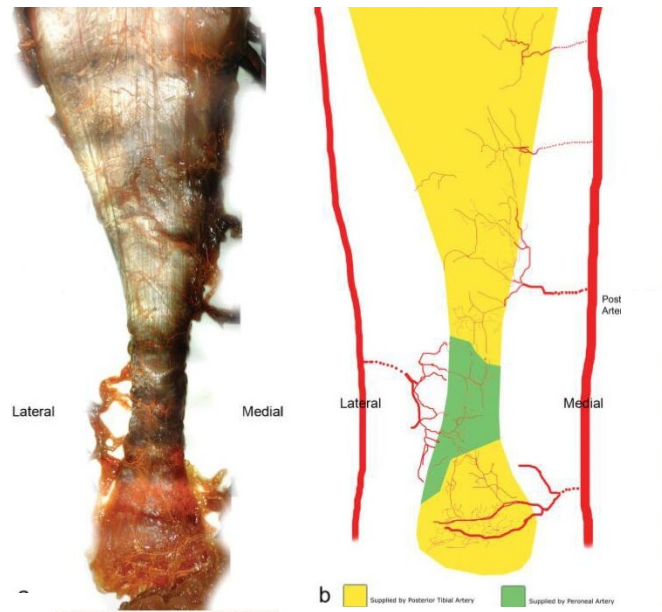


**Figura 8.** Estructuras extratendinosas.

## 1.2. VASCULARIZACIÓN

Hasta comienzos del siglo XX el tendón fue considerado un elemento avascular y metabólicamente inactivo. Pero en 1916, un estudio demostró, gracias a una infiltración de colorante, la existencia de aporte sanguíneo, admitiéndose que el tendón recibía vascularización procedente del endotendón [57]. Posteriormente, se confirmó también la existencia de actividad metabólica propiciada por esta vascularización [58, 59].

Actualmente se conoce que existen 2 sistemas de vascularización que alimentan a la estructura tendinosa, uno intrínseco, que aporta sangre a través de la UMT y de la UOT, y otro extrínseco, periférico al tendón, proveniente de vasos sanguíneos del tejido conjuntivo circundante y de vasos sanguíneos peritendinosos (**Fig. 9**) [23, 60].



**Figura 9.** Anatomía del sistema arterial (extrínseco) en el tendón de Aquiles. Tomado de Chen y cols. [61].

En la UMT, los vasos sanguíneos del músculo continúan entre los fascículos del tendón y son del mismo tamaño que en el músculo, siendo una zona raramente afectada por lesiones tendinosas [32]. Por su parte, en el cuerpo del tendón, el aporte vascular llega vía paratendón o a través de la vaina sinovial en aquellos tendones expuestos a fricción rodeados por ella, no llegando a penetrar la propia estructura tendinosa. Estos vasos del cuerpo del tendón son de menor calibre que los anteriormente descritos, por lo que esta zona está peor perfundida y es más sensible a lesiones [60]. Por último, los vasos que irrigan la UOT proceden tanto del hueso como del tendón, pero no se comunican entre ellos debido a la presencia de una membrana fibrocartilaginosa que existe entre ambos. El aporte sanguíneo y de nutrientes en esta zona es menor que el de las 2 anteriores, no contribuyendo a la vascularización del cuerpo del tendón [62].

Durante el desarrollo embriológico, los tendones contienen más células y su riego sanguíneo es más abundante, lo que favorece que se produzca en ellos una activa síntesis y secreción de colágeno; no obstante, una vez formados, ya maduros, tanto el número de células como el grado de vascularización disminuye. Se postula que tales descensos están determinados por las condiciones metabólicas que demanda el propio tejido, es decir, un tendón totalmente formado requiere una menor densidad celular y

unos menores requerimientos de oxígeno y nutrientes [63]. Asimismo, por lo general, la vascularización del tendón es más deficitaria en los hombres que en las mujeres, y disminuye con la edad y con la sobrecarga mecánica [64].

### 1.3. INERVACIÓN

La inervación tendinosa es somatosensitiva de tipo propioceptivo a través de terminaciones nerviosas tipo mecanorreceptores y nociceptores. No hay función motora eferente. Los nervios acceden al tendón, formando pequeños plexos longitudinales, atravesando y penetrando en el septo del endotendón cerca de la UMT [65].

Se distinguen 4 tipos de receptores o terminaciones nerviosas en el tendón, según los criterios anatómicos y funcionales [65, 66].

- Los receptores tipo I o corpúsculo de Ruffini, que son mecanorreceptores que reaccionan a los cambios de presión.
- Los receptores tipo II o corpúsculo de Pacini, mecanorreceptores que también reaccionan a la presión, pero con una adaptación más rápida, respondiendo en los movimientos de aceleración y deceleración.
- Los receptores tipo III u órganos tendinosos de Golgi, que son mecanorreceptores que convierten la deformación mecánica en información nerviosa aferente.
- Los receptores tipo IV son verdaderas terminaciones nerviosas libres y desde el punto de vista somatosensitivo son nociceptores (informadores de la sensación dolorosa) de adaptación lenta.

La mayoría de estos receptores se localizan en el tendón en la UMT y, de forma escasa, en el propio cuerpo del tendón. Esta ubicación podría explicar la lenta adaptación a la carga repetitiva de este tejido en determinadas ocasiones, el proceso de curación prolongado y la vulnerabilidad a las lesiones crónicas [67]. Asimismo, puede dar respuesta al hecho de que, ante un proceso degenerativo del cuerpo del tendón, éste pueda manifestarse de forma asintomática.

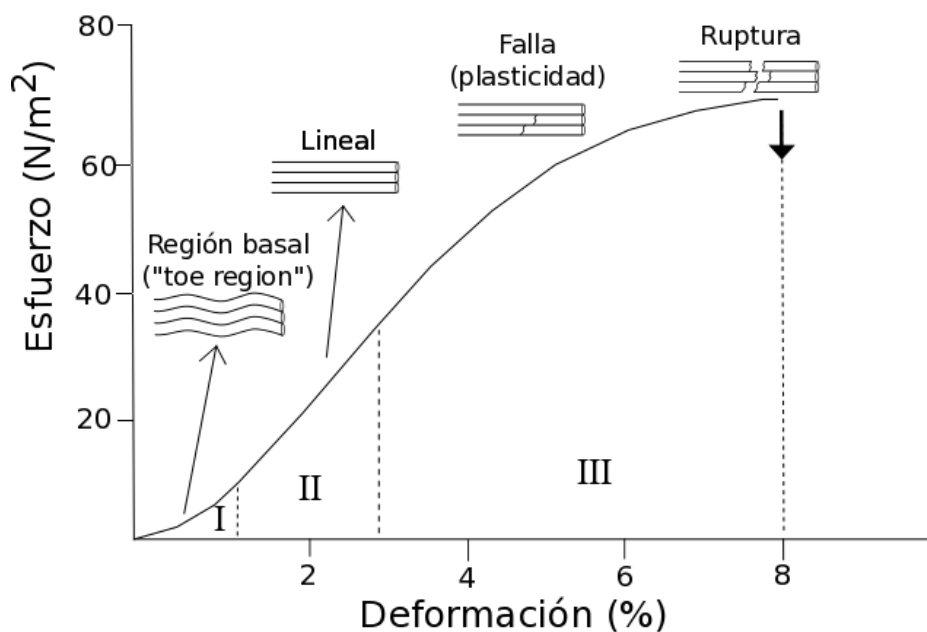
#### 1.4. BIOMECÁNICA Y FISIOLOGÍA

El tendón está diseñado para transmitir la fuerza contráctil originada por el músculo a la palanca ósea, al hueso, generando el movimiento de la articulación mediante el desarrollo del momento de fuerza resultante. Actúa como un muelle biológico, almacenando y liberando energía durante el movimiento, y regulando la intervención mecánica del músculo [68]. Cuando un músculo se contrae, transmite tensión al tendón provocando que la ECM deforme al tenocito. Esta deformación se transmite a este tipo celular a través de las integrinas (un tipo de glicoproteína de membrana), alcanzando esta señal a su núcleo, activándose en éste las respuestas moleculares metabólicas oportunas para adaptarse a la carga [69, 70]. La mecánica a la que se ve sometida el tenocito regula su funcionamiento y homeostasis.

La estructura tendinosa soporta fuerzas mecánicas en diferentes direcciones [71, 72]. Si son fuerzas de estiramiento que siguen el eje longitudinal del tendón y lo alargan, son fuerzas de tracción o tensiles. Por su parte, las fuerzas aplicadas en el eje longitudinal, pero en sentido de acortamiento, son fuerzas compresivas. Finalmente, las fuerzas aplicadas perpendicularmente al eje longitudinal son fuerzas de torsión o cizallamiento. Para soportar todas esas fuerzas, el tendón tiene propiedades estructurales de viscoelasticidad y plasticidad [71]. La particular disposición del colágeno, junto con el tipo de enlaces que sustentan su estructura y la presencia en su composición de proteínas fibrosas como la elastina, confieren al tendón una habilidad excepcional para soportar las fuerzas de tensión longitudinales o de estiramiento, pero no tanta para las fuerzas de compresión y torsión [27].

La información que se conoce sobre el comportamiento (fisiología y biomecánica) del tendón humano *in vivo* es limitada y son pocos los estudios que han podido determinar aproximaciones sobre la tensión del tendón y el almacenamiento de energía que tiene lugar en los movimientos en humanos [73, 74]. Así, en estudios realizados con tendones *in vitro* sometidos a estiramientos, se ha observado que, en reposo, su apariencia es ondulada (cuantificado un 0.2% de tensión), y sometido a tensión, presenta un comportamiento elástico no lineal. Bajo la acción de fuerzas externas, con estiramientos menores a un 2% de su longitud, los tendones adoptan una

forma aplanada, sus fibras se reorientan y muestran una respuesta lineal al estrés. Por su parte, sometidos hasta un 4% de tensión, la deformación que sufre el tendón es elástica, es decir, puede volver a su longitud original sin lesionarse, pero si sobrepasa esta tensión, pasaría a una deformación plástica, desapareciendo con ella su capacidad de reversión. De esto se deduce que la zona de seguridad del tendón sometido a solicitaciones de tensión se encuentra entre el 0 y el 4%. Si es sometido a un estrés superior al 4%, puede producirse una ruptura parcial de sus fibras y si el estiramiento supera el 8% de tensión, se produciría una rotura total (**Fig. 10**) [22, 32, 35, 45, 75].



**Figura 10.** Representación de la curva de carga/deformación del tendón [45].

En el caso de las personas, la capacidad para soportar una determinada fuerza de tensión en los tendones sanos es mayor durante la infancia, alcanza sus niveles máximos entre los 25 y 35 años y, después, disminuye progresivamente a partir de la tercera década. A mayor edad, mayor rigidez del tendón y menor capacidad de estiramiento [76].

Pero el tendón es un tejido vivo y, como tal, sus propiedades mecánicas y estructurales pueden cambiar en función de las demandas funcionales [77]. Cuando la estructura tendinosa es sometida a entrenamiento, a ejercicio físico, sufre cambios tanto en su arquitectura como en su composición celular y química [71]. Es conocido que el ejercicio, realizado dentro de un rango fisiológico, no daña el tendón, sino todo

lo contrario, estimula la producción de nuevas fibras de colágeno. Este efecto del ejercicio ha sido muy estudiado en modelos animales, con todas las limitaciones que ello comporta, concluyéndose que la fuerza, elasticidad y peso total del tendón aumentan conforme lo hace la actividad física [69, 75, 78, 79]. Las fibras de colágeno son más gruesas y el número de enlaces cruzados entre ellas es mayor, deduciéndose, por tanto, que un entrenamiento adecuado puede mejorar la calidad del tejido tendinoso. Por otra parte, en los estudios realizados en seres humanos, al analizar el metabolismo del colágeno por medio de técnicas de microdiálisis, también se ha demostrado que después de diferentes tipos de ejercicio, hay un aumento tanto de la síntesis como de la degradación de colágeno, pero con un predominio mayor, en condiciones no patológicas, de la síntesis tanto en cantidad como en prevalencia en el tiempo [80-85]. Por consiguiente, se puede concluir que la carga, en niveles fisiológicos óptimos, tiene consecuencias positivas sobre la estructura tendinosa, el tendón se hace más voluminoso, más fuerte, y con más resistencia a la tracción y a sufrir una lesión [68, 69].

Por el contrario, la ausencia de carga, es decir, la inmovilización y el desuso, también provocan un cambio, en este caso pernicioso, en las propiedades estructurales y mecánicas del tendón. Se produce un descenso en su trofismo, desregulándose la ratio síntesis y degradación del colágeno que conforma la ECM. En concreto, la falta de tensión que tiene lugar en una inmovilización ha mostrado tener efectos adversos sobre la regulación óptima de la expresión génica (transcripción) y proteica (traducción) de distintos tipos de colágeno, MMPs y factores de crecimiento [69, 86, 87]. Además, se ha podido observar que, ante la falta de tensión en un tendón, las fibras de colágeno son más delgadas, desorganizadas, dispuestas aleatoriamente y con menores enlaces cruzados [69].

En resumen, la estructura tendinosa se ve afectada por los cambios de sollicitación mecánica, de tal forma que la carga y la tensión son necesarias para mantener la función y el fenotipo óptimo ("normal") del tenocito [88]. Además, se deduce la importancia de enmarcar el volumen e intensidad de esa tensión sobre el tendón dentro de unos parámetros correctos. Si el equilibrio se rompe a favor de un trabajo excesivo o muy extenuante o, por el contrario, de una ausencia de actividad, se



puede producir un cambio desfavorable en la estructura tendinosa, en sus propiedades viscoelásticas, y el peligro de lesión se hace patente [88].

## 2. PATOLOGÍA TENDINOSA: TIPOS Y TERMINOLOGÍA

Hasta hace pocos años, la clasificación de las lesiones tendinosas más utilizada se basaba en definir la naturaleza de su inicio, traumática o por sobreuso, al proceso histológico que subyacía, inflamación o degeneración, y se complementaba atendiendo a la porción del tendón afectada, bien intratendón o bien en la estructura externa, el paratendón [44, 89]. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos 3 parámetros, las lesiones tendinosas se clasificaban en los siguientes tipos:

- **TENDINITIS:** Lesión aguda del tendón que cursa con un proceso inflamatorio en el espesor de éste. Es poco frecuente y se presenta casi exclusivamente en el contexto de las enfermedades inflamatorias sistémicas con afectación osteoarticular, fundamentalmente enfermedades reumatológicas.
- **TENDINOSIS:** Lesión crónica degenerativa del tendón causada generalmente por una sobresolicitación de la estructura tendinosa. Desde el punto de vista histopatológico, en este tipo de lesión se detecta un aumento del número de fibroblastos, colágeno fragmentado y desorganizado, hiperplasia vascular y, en ocasiones, presencia de microcalcificaciones. Asimismo, su característica principal es la carencia o prácticamente ausencia de células inflamatorias. Su cuadro clínico no siempre es doloroso y se instaura de manera progresiva.
- **PARATENDINITIS (tenosinovitis, tenovaginitis):** Lesión del tendón que cursa con una inflamación aislada de las capas externas del tendón, y engloba afecciones denominadas tenosinovitis, cuando se afecta una única capa de la vaina tendinosa, o tenovaginitis, cuando se ve afectada la doble capa de la vaina. Ambos procesos se desencadenan por compresiones, fricciones repetitivas con una protuberancia ósea o algún elemento externo (calzado, esparadrapo, etc.) o con algún retináculo de tejido conectivo del propio sujeto. Histológicamente se detecta mediante la visualización de un infiltrado de células inflamatorias.

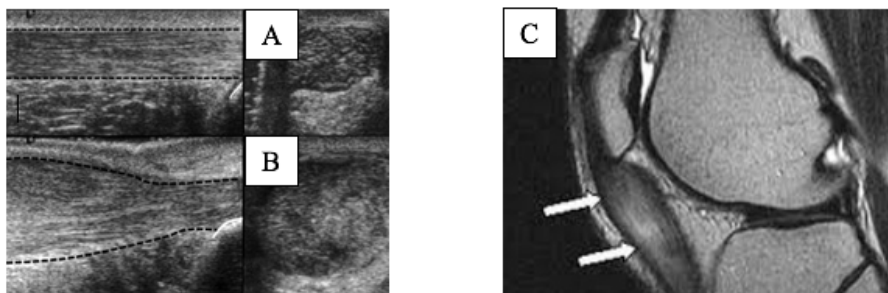
- **TENDINOSIS CON PARATENDINITIS:** Lesión del tendón en el que se manifiestan procesos degenerativos sin una respuesta celular inflamatoria en el propio tendón, pero asociada a una paratendinitis externa, donde si existe inflamación. La estructura intratendinosa no se inflama, pero la capa externa, el paratendón, sí.

Históricamente, la mayoría de las lesiones que asentaban en el tendón se denominaban de forma indiscriminada como **tendinitis** [90-92] y, teniendo en cuenta que etimológicamente el sufijo *-itis* significa "inflamación", una tendinitis sería la patología del tendón en la que éste se encuentra en una situación de predominio inflamatorio. A finales de la década de los 90, empleando técnicas histológicas y moleculares en el estudio de este tipo de patología, se detectó que era mayor el predominio de los procesos degenerativos que de los inflamatorios [2, 12, 93-99]. Por lo tanto, el término tendinitis no parecía el más adecuado para la descripción de la mayoría de este tipo de lesiones. En consecuencia, a principios de este siglo XXI, priorizando los hallazgos anatomopatológicos, se abogó por abandonar este término y sustituirlo por el de **tendinosis** [100, 101]. Esta terminología enmarcaría un cuadro clínico del tendón donde se destaca un proceso degenerativo con cambios estructurales irreversibles en este tejido. No obstante, la definición de tendinosis también fue sometida a discusión por distintos autores [95, 97, 99, 101, 102, 102], al no considerar que dicho término fuera la nomenclatura óptima para definir las lesiones tendinosas. Algunos investigadores insisten en la necesidad de usar una terminología que refleje el proceso fisiopatológico que subyace a esta patología, bien tendinitis con inflamación o tendinosis con degeneración, pero no siempre se puede excluir de forma absoluta en la clínica uno de estos 2 procesos, ya que, en ocasiones, coexisten en algunas fases de la patogénesis [98, 103]. Finalmente, en la actualidad se ha optado por un nuevo término que defina este tipo de lesiones, la **tendinopatía**, descriptor general de los desórdenes que se producen en el tendón y que cursan principalmente con dolor y pérdida de funcionalidad [1, 27, 104].

Por otra parte, teniendo en cuenta esta terminología actual, desde el punto de vista clínico es conocido que hay una notable mayor prevalencia de las lesiones

tendinosas provocadas por un sobreuso o sobrecarga, denominadas **tendinopatías por sobreuso** (*tendinopathy overuse*) [27]. Este tipo de patología tiene una gran trascendencia clínica ya que, dentro de los trastornos musculoesqueléticos, supone una de las principales razones de consulta médica, en torno a un 15-30% en el ámbito laboral y llegando a superar el 50% en el ámbito deportivo [3, 105-107]. Su tratamiento constituye un verdadero desafío clínico, describiéndolo algunos autores como uno de los mayores problemas en la medicina deportiva [108].

Estas tendinopatías por sobreuso son el objetivo de estudio de esta tesis doctoral. Cursan con cambios en la estructura del tendón que afectan negativamente a su capacidad de carga y tolerancia. Se presentan tanto en la extremidad inferior como en la superior, causando dolor y pérdida de funcionalidad. Las más frecuentes son en el miembro inferior, en el tendón de Aquiles y en el rotuliano; no obstante, también se producen en otras regiones como en el pubis (aductores), hombros (manguito rotador), codo (musculatura extensora) y cadera (glúteos) [3]. Su diagnóstico se hace principalmente por la anamnesis y la exploración clínica del paciente. También puede complementarse con técnicas de imagen, como la ecografía musculoesquelética y/o la resonancia magnética nuclear (RMN), siendo la ecografía la técnica más específica y por ello más indicada en el diagnóstico de esta patología [1]. Como se muestra en la **Figura 11**, en la visualización de las imágenes de tendón con tendinopatía por sobreuso obtenidas mediante ecografía, se observa una zona hipoecogénica que se corresponde con alteraciones en las fibras de colágeno y áreas de degeneración mucoide [109-111]. Por su parte, en imágenes obtenidas mediante la RMN, la degeneración se manifestará en secuencias potenciadas en T2 con áreas donde la señal esté incrementada [110, 112, 113].



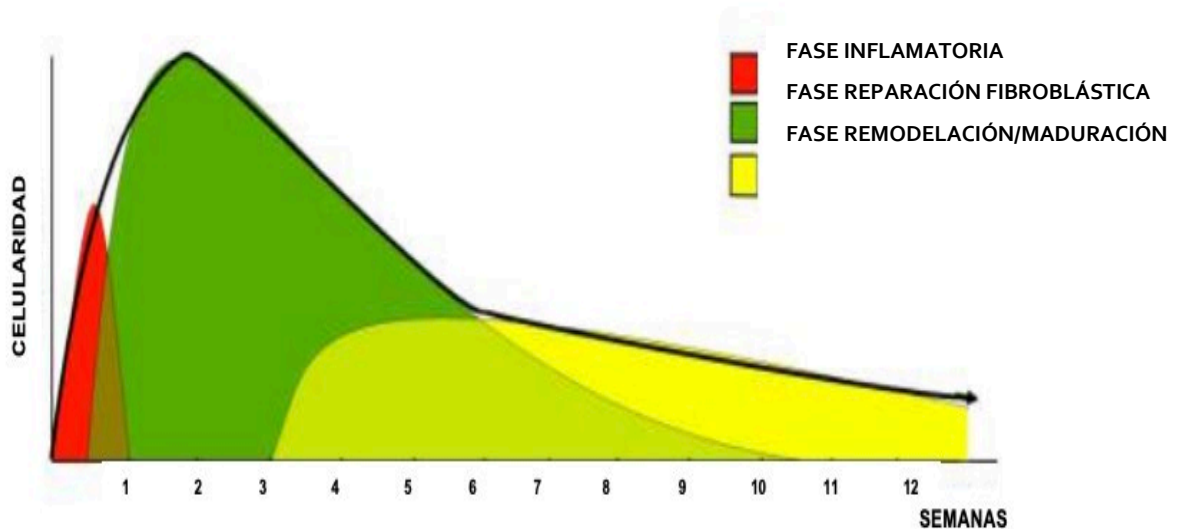
**Figura 11.** (A) Imagen ecográfica de tendón normal. (B) Imagen ecográfica de un tendón con tendinopatía. (C) Imagen mediante RMN de un tendón con tendinopatía.

El síntoma más destacado de las tendinopatías por sobreuso es el dolor. Habitualmente, éste aparece al iniciar la actividad, tras el calentamiento del tendón suele desaparecer para reaparecer de nuevo cuando la actividad termina. El examen físico muestra en la mayoría de los casos un engrosamiento del tendón objetivable visual y palpatoriamente [114]. Finalmente, para evaluar el índice de severidad sintomática de este tipo de patologías, se usan escalas validadas como, por ejemplo, la de *Victorian Institute of Sport Assessment – Patella (VISA-P)* o la *Victorian Institute of Sport Assessment - Achilles (VISA-A)*, ambas para el miembro inferior [115-117]. Estas escalas están basadas en cuestionarios de alta fiabilidad, simples, prácticos y de fácil aplicación, que permiten valorar la capacidad funcional y de practicar deporte. Se consideran una herramienta útil para valorar la progresión en la patología y en el tratamiento.

### 3. PROCESOS Y FASES DE REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DEL TENDÓN

Ante una lesión del tejido blando y, por extensión, de tejido tendinoso, coexisten dos procesos biológicos de curación: la **reparación** y la **regeneración** [118]. La reparación es la restauración del tejido, pero sin conservar su arquitectura original ni su función, es decir, se sustituye el tejido lesionado o perdido por otro cicatricial viable, pero no idéntico, con propiedades físicas y mecánicas modificadas. Por el contrario, la regeneración de un tejido lesionado consiste en la restauración por un nuevo tejido morfológica y funcionalmente similar, con propiedades y características idénticas al tejido original. Tanto el proceso de reparación como el de regeneración se desarrollan simultáneamente ante cualquier lesión del tejido blando, aunque no en la misma proporción; esto dependerá directamente de una serie de factores y de condiciones. Por ello, conocer e identificar las diferencias de composición celular y molecular que existen entre los 2 procesos es primordial, ya que permitirá fundamentar mejor una correcta estrategia terapéutica, la cual debe ir encaminada a alcanzar el mayor porcentaje posible de regeneración (tejido nuevo) frente al de reparación (tejido cicatricial), entendiendo que así los resultados estructurales y funcionales serán mucho mejores.

En condiciones óptimas, las fases que suceden a una lesión y el propio proceso reparador son bien conocidos. Factores como la vascularización, la edad, la nutrición y los factores genéticos son claves en el desarrollo de estos procesos [119]. Así, la curación de una lesión aguda del tejido tendinoso se lleva a cabo en 3 fases diferenciadas: fase de respuesta inflamatoria, fase de reparación fibroblástica (proliferativa) y fase de remodelación/maduración [119, 120] (**Fig. 12**). Aunque estas fases están diferenciadas a nivel didáctico, realmente son una progresión continua. Se superponen de tal manera que no se pueden delimitar los puntos de comienzo ni final de cada una de ellas, se van solapando. Si las 3 fases transcurren coordinadamente con éxito dan lugar finalmente a un tejido reparado óptimo y completamente [37, 121, 122].



**Figura 12.** Representación gráfica en el que se muestra la coexistencia a lo largo del tiempo de las 3 fases del proceso de cicatrización en el tendón.

### 3.1. FASE DE RESPUESTA INFLAMATORIA

Una lesión en el tendón (tejido blando) provoca un daño multicelular, una alteración del metabolismo basal y una liberación de biomoléculas que iniciarán entre múltiples procesos, uno inflamatorio. En concreto, la respuesta inmediata inicial es una respuesta vascular, con una vasoconstricción capilar que dura de 5 a 10 minutos, seguida de una vasodilatación provocada por la liberación de histamina, logrando un éxtasis venoso e incremento de la permeabilidad de las células endoteliales vasculares.

A continuación, comienza la migración de leucocitos (macrófagos y neutrófilos) por un fenómeno de quimiotaxis, hacia la zona de la lesión del tendón, para no sólo fagocitar las sustancias de desecho provocadas directa y/o indirectamente por esta lesión, sino también para que estas células sintetizen y secreten citoquinas inflamatorias, como la ciclooxigenasa 2 (COX2), la prostanglandina E2 (PGE-2), interleucinas 6 y 1 beta (IL-6, IL-1 $\beta$ ), y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- $\alpha$  y  $\beta$ ) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), éste último necesario en la activación de los fibroblastos [120, 123]. Seguidamente se produce una reacción vascular local que implica la formación de una barrera plaquetaria y el crecimiento de tejido fibroso, formándose un coágulo por la conversión de la proteína fibrinógeno en fibrina, de tal manera que se aísla el área lesional [124].

La totalidad de esta fase inflamatoria, altamente beneficiosa para el tejido tendinoso lesionado, dura aproximadamente entre 2 y 7 días, y en ella se produce la fagocitosis de elementos o sustancias producidas por la lesión, preparando al tejido lesionado para la regeneración tisular posterior.

### **3.2. FASE DE REPARACIÓN FIBROBLÁSTICA (PROLIFERATIVA)**

Esta fase es un proceso de reparación en el que se lleva a cabo la síntesis de los distintos componentes de la ECM y una neovascularización del tejido tendinoso lesionado. Comienza unas 24 horas post-lesión, es decir, coexiste temporalmente con la fase inflamatoria, y suele durar unas 4 semanas. Se caracteriza por la presencia de diferentes células reparadoras (fibroblastos, fibrocitos, macrófagos y células endoteliales) procedentes de los tejidos adyacentes (músculo y fascia). Estos tipos celulares proliferan en este tejido lesionado por la presencia de los distintos tipos de factores de crecimiento mencionados anteriormente, producidos por las plaquetas y los macrófagos de la fase inflamatoria [119, 125]. En esta etapa, sobre el 5º día post-lesión, comienza la neovascularización capilar por angiogénesis debido a la generación de una red vascular nueva y/ o por anastomosis de vasos preexistentes, con el objetivo de facilitar la llegada de oxígeno y nutrientes a la zona lesionada. En los días 6º y 7º post-lesión, los fibroblastos incrementan su actividad metabólica, inician la expresión génica y síntesis de varios tipos de colágeno, entre ellos, los más importantes, los

colágenos tipos I y III, y también de los PGs, que van a ser depositados a lo largo de la lesión de una forma desordenada [126]. Éste es el momento clave en el que un estímulo mecánico óptimo favorecerá la alineación correcta y remodelación óptima de las nuevas proteínas de colágeno formado. Finalmente, a medida que aumenta la fuerza de tensión en el tejido, disminuirá la presencia de fibroblastos, lo que indicará el inicio de la fase de maduración [37, 121, 126].

### **3.3. FASE DE REMODELACIÓN/MADURACIÓN**

En esta fase se va a constituir y madurar el tejido cicatricial a partir de la reorganización o remodelación de las fibras de colágeno. Se inicia coexistiendo con la fase anterior, de reparación fibroblástica, a las 3 semanas post-lesión y puede durar hasta los 2 años. En esta fase se irá disminuyendo progresivamente el número de macrófagos, fibroblastos y nuevos capilares presentes en la zona del tejido lesionado [119, 125]. Las fibras de colágeno tipo III son reemplazadas por fibras que contienen colágeno tipo I, adquiriendo una disposición más ordenada en la estructura global del tendón, en paralelo, siguiendo los vectores de fuerza de tracción y aumentando sus enlaces cruzados a medida que avanza esta fase. Alrededor de las 8 semanas post-lesión se habrá formado una cicatriz, restaurándose la función primaria del tejido blando lesionado, pero en el caso concreto del tendón, varios estudios demuestran que hasta el año este tejido no adquiere la misma fuerza y resistencia a la tracción que la que tenía previa a la lesión [37, 127]. Esta fase se puede subdividir en 2 etapas, una primera etapa, la fase de remodelación, que comprende las 8 primeras semanas post-lesión y, una segunda etapa, mucho más larga, que puede durar meses o incluso varios años, que constituiría la fase de maduración [128].

En conclusión, el proceso completo de reparación y regeneración de un tendón tendría que completarse tras una lesión aguda de este tipo de tejido. Sin embargo, en el caso de las tendinopatías por sobreuso, las fases de reparación y regeneración no se cumplen con éxito, no conociéndose la causa. Por lo tanto, las investigaciones en torno a este tema están en continuo estudio.

## 4. PATOGÉNESIS DE LAS TENDINOPATÍAS

Se conocen algunos aspectos sobre la etiología, histopatología y clínica de las tendinopatías por sobreuso, pero, en algunos casos, la falta de éxito en su tratamiento evidencia que el conocimiento sobre estas patologías es todavía insuficiente. Por consiguiente, un mejor entendimiento de la causa y consecuentes procesos biológicos que tienen lugar en el tendón con tendinopatía a distintos niveles, molecular, bioquímico e histológico, resulta necesario, con el fin de lograr un mayor éxito de curación mediante tratamientos más efectivos. Seguidamente se detallan las hipótesis que se barajan actualmente sobre la etiopatogenia y fisiopatología de esta patología.

### 4.1. ETIOLOGÍA

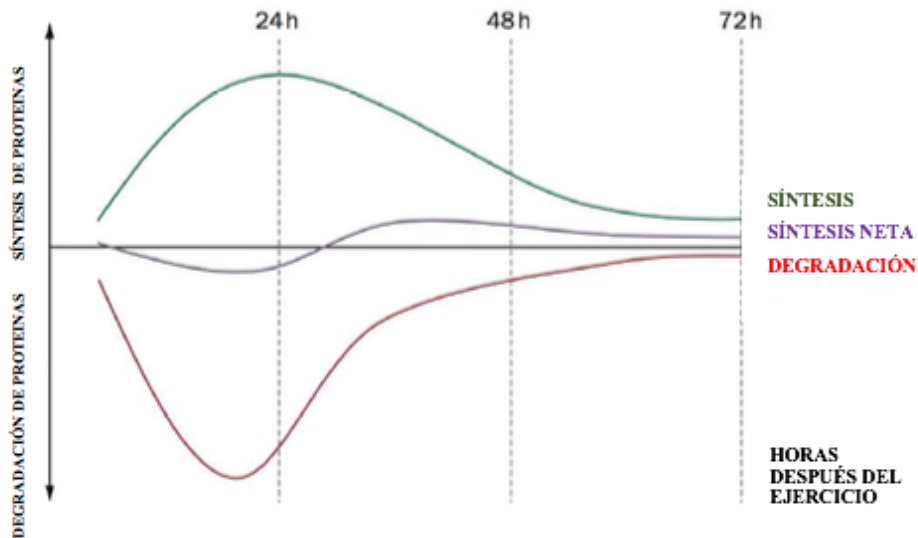
En la actualidad 2 teorías, hipótesis o modelos se han descrito para explicar la etiología de las tendinopatías por sobreuso. La primera de ellas se fundamenta en una causa extrínseca, de origen mecánico, atribuyendo el origen de la patología a un desorden en las fuerzas soportadas por el tendón, y denominada por tanto hipótesis **basada en la sobrecarga mecánica** [2, 12, 95, 100]. La segunda, **basada en la respuesta de cicatrización**, se decanta por una causa intrínseca, fisiopatológica, considerando que el origen está en un fallo en el proceso de reparación del tejido tendinoso [129, 130].

#### 4.1.1. HIPÓTESIS BASADA EN LA SOBRECARGA MECÁNICA

Es conocido que la tensión, la carga, es necesaria para mantener la función y el fenotipo normal del principal tipo celular del tendón, el tenocito. Estudios sobre el metabolismo del colágeno, realizados en humanos por medio de técnicas de microdiálisis, han demostrado que cuando el tendón sufre una fuerza de tensión, si es bien tolerada, se desencadenan en los tenocitos 2 procesos a la vez, la síntesis y la degradación de las proteínas fibrilares [83, 85]. Como se muestra en la **Figura 13**, en el tendón, desde que se inicia la carga hasta las primeras 36-48 horas, hay una mayor degradación de las proteínas de colágeno en comparación con la síntesis de estas mismas proteínas (balance negativo); sin embargo, a partir de las 72 horas, y



manteniéndose a tiempos mayores, el proceso se invierte, pasando a un mayor predominio de la síntesis de colágeno respecto a su degradación (balance positivo) [83, 85].



**Figura 13.** Representación esquemática de la síntesis y la degradación de colágeno.

Tomado de Magnusson [131].

Por tanto, cuando el tendón es solicitado con cargas de trabajo a niveles óptimos, cargas con un determinado umbral para las que está preparado y puede soportar, el proceso de degradación y regeneración está equilibrado. Por el contrario, si se sobrepasa el umbral fisiológico individual con esfuerzos submáximos repetitivos sin tiempo de recuperación, o en una sobrecarga sobre un tendón con debilidad muscular o con deterioro viscoelástico, este equilibrio se alterará, pasando a un balance negativo (con un mayor protagonismo de la degradación de colágeno), lo que provocará microlesiones intratendinosas [83, 85, 131].

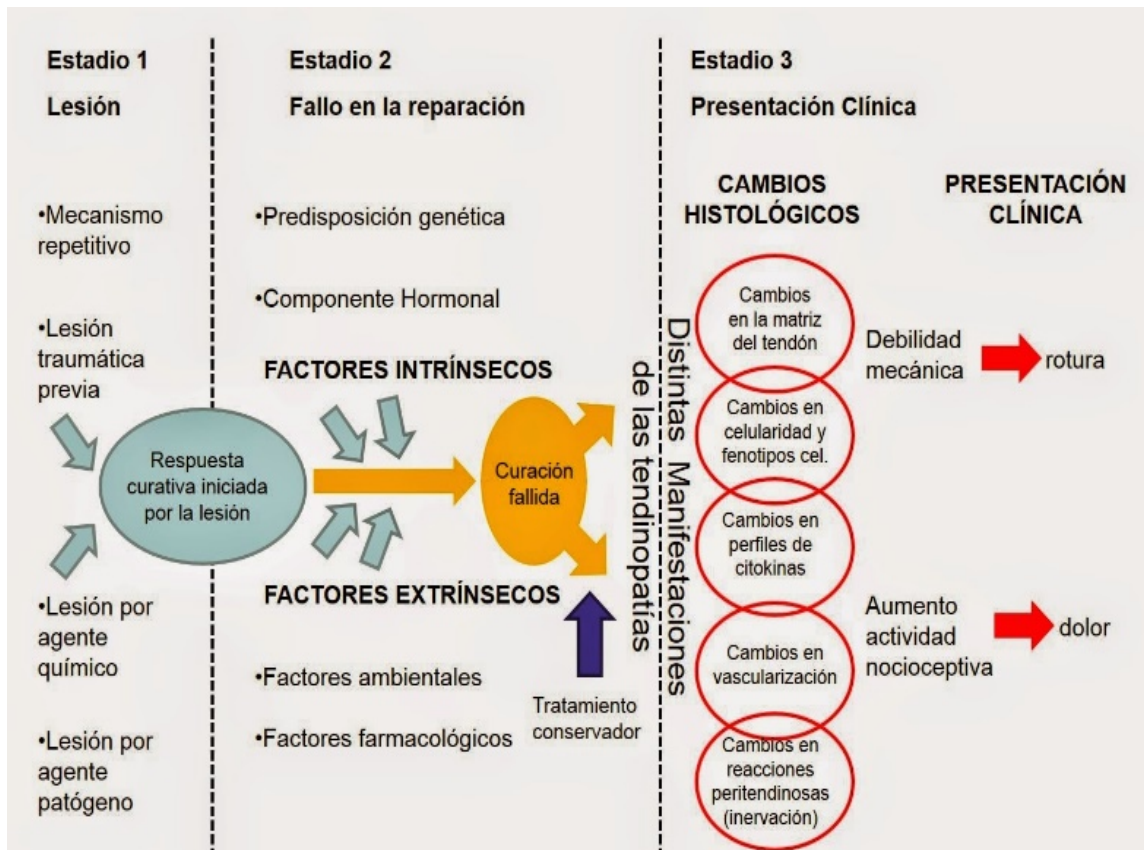
Varias observaciones epidemiológicas publicadas indican que el factor inicial desencadenante de las tendinopatías es este sobreuso excesivo del tendón, esta sobrecarga. Consideran que la causa está en el factor mecánico de sobresolicitación, agravado en ocasiones, si, por su localización anatómica, el tendón también sufre compresión, por ejemplo, como es el caso del tendón supraespinoso [2, 12, 95, 100, 132]. Esta teoría justificaría que los tendones que están expuestos a grandes demandas

mecánicas son lo que se lesionan con más frecuencia, como, por ejemplo, el tendón rotuliano, el tendón de Aquiles y el tendón del supraespinoso. Asimismo, esta hipótesis estaría avalada indirectamente por el hecho de existir un mayor índice de tendinopatías en deportistas y personas más activas que están involucradas en actividades específicas repetitivas que producen sobreestrés al tendón [133]. Sin embargo, también se han reportado tendinopatías en tendón de Aquiles en sujetos sedentarios, por lo que, en estos casos, esta teoría del sobreuso por sí sola no podría explicar la etiología de estas lesiones [134].

#### 4.1.2. HIPÓTESIS BASADA EN LA RESPUESTA DE CICATRIZACIÓN

Esta hipótesis se basa en que el origen del desarrollo de las tendinopatías podría estar en errores en los procesos (y fases) de reparación y regeneración que se deben producir tras una lesión tendinosa. En este caso, se postula que, tras producirse este tipo de lesión, si se dan a su vez una serie de factores adversos (ver a continuación), éstos puedan provocar que no tenga lugar con éxito alguna/s de las 3 fases de cicatrización (fase de respuesta inflamatoria, de reparación fibroblástica y de remodelación/maduración), lo que conllevaría la no curación del tendón lesionado.

Actualmente las 2 teorías más aceptadas que avalarían esta hipótesis son: la **Teoría del iceberg**, propuesta por Abate y cols. (2009) [130] y la **Teoría de la curación fallida**, postulada por Fu y cols. (2002) [55] (**Fig. 14**). Ambas teorías defienden que, en la primera de las 3 fases de curación del tendón, la fase inflamatoria, si se dan a su vez una serie de elementos, como entornos mecánicos adversos (mantenimiento de la sobrecarga o falta de tiempo de recuperación entre sollicitaciones), entornos bioquímicos nocivos (estrés oxidativo, fármacos tipo antiinflamatorio no esteroideo - AINEs- y corticoides) o una falta de flujo sanguíneo adecuada, se produciría una curación no sólo insuficiente, sino también incorrecta. Es decir, los mecanismos de curación fallarían y comenzaría la primera fase de desarrollo de una tendinopatía [55, 130].

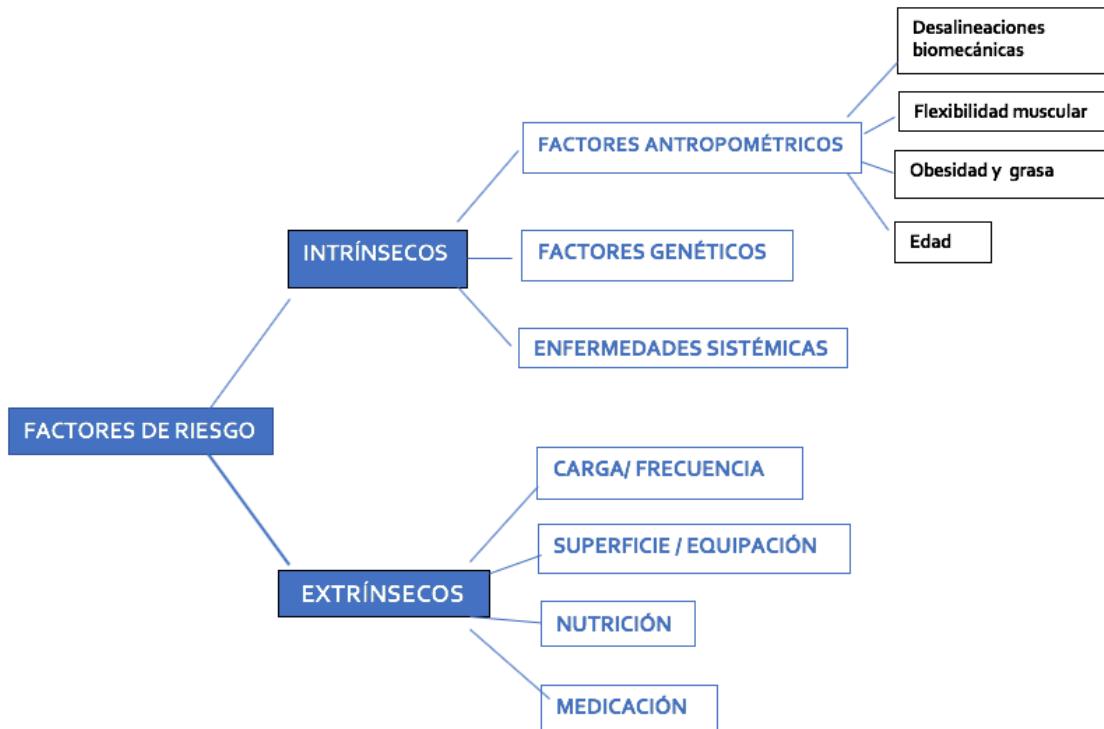


**Figura 14.** Teoría de la "Curación Fallida" de Fu y cols. (2002) [55].

Como conclusión a este apartado sobre la etiología de las tendinopatías por sobreuso, parece que no se puede hablar de un factor único como el causante de este tipo de patologías. Las 2 hipótesis descritas, tanto la basada en la sobrecarga mecánica como la que respondería a una alteración en la cicatrización, no son excluyentes una de otra, de hecho, hay publicaciones que sugieren que ambas parecen complementarse, postulándose una etiología multicausal [135].

#### 4.2. FACTORES DE RIESGO

Partiendo de la posible etiología multicausal, en la literatura hay descritos una serie de factores de riesgo que, asociados a esta etiología, predisponen a algunos individuos a desarrollar una tendinopatía con más probabilidad que otros. Se pueden dividir estos factores de riesgo en: intrínsecos o predisponentes y extrínsecos o determinantes (*Fig. 15*).



*Figura 15. Factores de riesgo de las tendinopatías.*

#### 4.2.1. FACTORES DE RIESGO INTRÍNSECOS

Son factores que dependen directamente de las características individuales de cada sujeto. Incrementan la predisposición a desarrollar una tendinopatía determinadas **características antropométricas, genéticas** o el padecimiento de determinadas **enfermedades sistémicas**.

En el caso de las **características antropométricas**, una mayor predisposición a padecer una tendinopatía por sobreuso puede ser debido a desalineaciones biomecánicas, una disminución de la flexibilidad muscular, padecer obesidad y a una mayor edad.

Las alteraciones biomecánicas, como una torsión tibial lateral, pie cavo, varo de calcáneo y/o disimetría de miembros inferiores, son determinantes en la aparición de este tipo de patologías en el caso del miembro inferior [136, 137]. Estas variaciones biomecánicas son habitualmente de origen genético, sugiriendo la posibilidad de que determinados factores genéticos predispongan a esta lesión tendinosa.

Por su parte, la falta de flexibilidad muscular es una fuente contrastada de causa de numerosas lesiones, tanto a nivel muscular como tendinoso, debido a la merma que se produce en la capacidad de absorción de las tensiones. Así lo revelaron Witvrouw y cols. (2001) [138] en un estudio en el que los pacientes que desarrollaron una tendinopatía rotuliana presentaban una menor flexibilidad muscular en cuádriceps, isquiotibiales y gemelos en comparación al grupo control de pacientes no patológicos.

En cuanto a la relación con la obesidad, varios autores han establecido una relación directa entre la composición corporal y las tendinopatías, a mayor grasa corporal, existe un mayor riesgo de padecerlas [139-144].

Finalmente, la edad es considerado un factor directamente relacionado con las tendinopatías. Un claro ejemplo es que, a partir de la tercera década de la vida, hay un mayor riesgo de sufrir este tipo de patologías. Este factor es tan determinante que, incluso algunos autores, otorgan más importancia a la edad que a la sobrecarga mecánica en la etiología de estas lesiones [71, 97]. Este hecho puede ser debido a que las células que componen el tendón, como las de cualquier otro tejido, envejecen de forma progresiva, produciendo en este tejido una rigidez y un descenso del aporte sanguíneo que le llega, disminuyendo con ello, a su vez, de forma gradual, su capacidad para soportar las cargas.

Respecto a los **factores genéticos** que predisponen a desarrollar una tendinopatía, por ejemplo, están descritos en humanos polimorfismos (variaciones naturales en un gen, en su secuencia de ADN) de algunos genes como *COL5A1*, el gen codificante de la proteína tenascina-C (*TN-C*) [145-147], el *TIMP2* y *ADAMTS14* [148]. Por otra parte, también se ha postulado que un componente génico pudiera estar involucrado con un mayor riesgo de padecer una ruptura del tendón de Aquiles contralateral en sujetos con rotura previa (mayor predisposición en personas con grupo sanguíneo O y niveles altos de colesterol) [134]; además, hermanos de pacientes con rotura de espesor completa del manguito rotador tienen el doble de probabilidad de sufrir también un desgarró en estos mismos tendones [149].

Finalmente, las **enfermedades sistémicas** como la diabetes, especialmente la tipo II, la artritis reumatoide, metabolopatías como la hipercolesterolemia y la

hiperuricemia, y algunas enfermedades que afectan al colágeno como el Síndrome de Marfan (enfermedad hereditaria autosómica dominante, asociada a una alteración del gen *FBN1*, codificante de la proteína fibrilina, esencial en la formación de fibras elásticas del tejido conectivo) y el Síndrome de Ehlers-Danlos (enfermedad rara provocada por un defecto en la síntesis de colágeno), se han asociado a estas lesiones al presentar estos pacientes una mayor incidencia de tendinopatías [18-22, 150].

#### 4.2.2. FACTORES DE RIESGO EXTRÍNSECOS

Son factores que afectan al paciente, pero no dependen directamente del organismo del sujeto, como son los **errores en la ejecución del entrenamiento**, en cuanto a la carga, volumen y frecuencia, la propia **superficie de entrenamiento**, la correcta **nutrición e hidratación** o el uso de determinados **medicamentos**.

Numerosos autores atribuyen a una mala planificación o **ejecución del entrenamiento** el 60% de las tendinopatías por sobreuso en el ámbito deportivo [2]. Así, se ha descrito que existe una relación directa entre el incremento del tiempo de entrenamiento, la distancia recorrida, el número de repeticiones del entreno, el incremento de la velocidad de las carreras, el tiempo de reposo y/o una recuperación insuficiente entre entrenos, con un mayor riesgo de desarrollar una tendinopatía. Si no se atienden correctamente unos criterios de aumento progresivo en la sollicitación tendinosa, respetando el tiempo necesario para la recuperación en la síntesis del colágeno, no hay adaptación. Las propiedades viscoelásticas del tendón se alteran, produciéndose una disminución de la capacidad tendinosa para absorber impactos [86, 87, 151].

En cuanto al tipo de **superficie de entrenamiento**, éste juega un papel fundamental en la posibilidad de producirse una tendinopatía dada su capacidad para absorber el impacto del pie contra el suelo. Resulta muy significativo un estudio de Fernández-Palazzi y cols. (1990) [152] en el que analizaron la incidencia de las tendinopatías en las bailarinas, en concreto, en el tendón de Aquiles. Estos autores observaron que, en el 4% de los casos en el que las bailarinas sufrían tendinopatía la superficie de trabajo era de madera, en un 23% la superficie era sintética, y en un 45%

la superficie era de cemento, superficies clasificadas como de mayor a menor capacidad de absorción, respectivamente.

Por otra parte, una adecuada **nutrición**, en concreto, de aporte de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (hierro, magnesio, cobre y zinc) es totalmente necesaria para una correcta síntesis de la ECM, fundamentalmente de uno de sus componentes principales, el colágeno. Además, una correcta **hidratación**, aporte de agua, también es básica para mantener las propiedades mecánicas viscoelásticas del tejido tendinoso [153, 154].

Finalmente, es conocido que el uso de algunos **medicamentos**, como las quinolonas (antibióticos de amplio espectro), los corticoesteroides (antiinflamatorios e inmunosupresores) y los AINEs, se han relacionado con un mayor porcentaje de rupturas de la estructura tendinosa [155-157]. El uso continuado de este tipo de fármacos favorece la degradación de las fibras de colágeno del tendón, predisponiéndolo a sufrir una rotura [158-161]. Sin embargo, en el caso de los AINEs, su prescripción y uso clínico es relativamente frecuente en las tendinopatías, a pesar del hecho de no estar aún demostrado su beneficio clínico [162, 163].

### 4.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA TENDINOPATÍA

En la actualidad se han propuesto 2 modelos o teorías que pueden explicar la fisiopatología de la tendinopatía, el modelo propuesto por Xu y cols. (2008) [4], basado en una relación directa entre la **sobrecarga y una alteración del metabolismo** del tendón, y el postulado por Cook y cols. [103, 164] denominado **Modelo Continuum**, que describe la tendinopatía como un proceso continuo bidireccional.

#### 4.3.1. MODELO QUE RELACIONA LA SOBRECARGA Y UNA ALTERACIÓN METABÓLICA

Xu y cols. (2008) [4] propusieron una primera aproximación del proceso fisiopatológico que tiene lugar en estas lesiones basándose en una relación directa entre la sobrecarga y una alteración del metabolismo del tendón. De esta forma se explica que, cuando se somete a un tendón a una sobrecarga, se produce la ruptura o el

rasgado de algunas fibras de colágeno de forma paralela y simultánea a un aumento en la proliferación de fibroblastos y en la síntesis de los diversos componentes de la ECM. Si son sobrecargas mantenidas y repetidas durante largos periodos de tiempo, con un periodo mínimo de descanso entre las mismas, se produce un fallo funcional de adaptación a la carga, acelerándose el ritmo de degradación tisular, alterándose el metabolismo de los tenocitos, que pasará de ser aeróbico a anaeróbico, y produciéndose un incremento de los procesos apoptóticos [165, 166]. Dado que la integridad morfológica y funcional celular es necesaria para el mantenimiento del tejido conectivo, este conjunto de alteraciones influye directa y negativamente en la síntesis de los distintos componentes que integran la ECM, desregulándose el equilibrio de la síntesis y degradación de los distintos tipos de colágeno, MMPs y TIMPs [4, 4, 27, 27, 55, 56, 167, 167, 168].

En el caso de las proteínas de colágeno, la alteración a la adaptación de la carga produce en el conjunto del tendón una mayor cantidad del colágeno tipo III en vez del tipo I, que es lo más habitual en condiciones óptimas, provocando una disposición de las fibras de colágeno desorganizada y al azar [4, 27, 167]. Dichas fibras se presentan envueltas en una sustancia mixoide (sustancia semisólida en estado gel compuesta por la degradación de las células y los productos de desecho), lo que disminuye y altera el correcto deslizamiento de las fibrillas, produciendo en el tejido tendinoso zonas con microdesgarros y signos de degeneración hialina (cuando las fibras conjuntivas se vuelven de aspecto vidrioso y refringentes al microscopio) [169].

Por su parte, el desequilibrio entre síntesis y degradación de las MMPs y la de sus inhibidores (TIMPs) favorece una mayor degradación de la ECM, con los consiguientes cambios que se producen en las propiedades estructurales y viscoelásticas del tendón. En concreto, niveles elevados de MMP-2 y -9, enzimas que degradan los colágenos de la red, pueden ser los responsables de la morfología alterada de los fibroblastos y la inhibición en la regeneración del tendón. David y cols. (2013) [52] propusieron específicamente que la degradación mediada por MMP-9 de la red de colágenos perjudica la capacidad de los fibroblastos para detectar adecuadamente las fuerzas que se transmiten a través de la ECM, interrumpiendo su potencial para



responder a la carga mecánica, conduciendo al fallo de los fibroblastos para reparar los sitios de lesión.

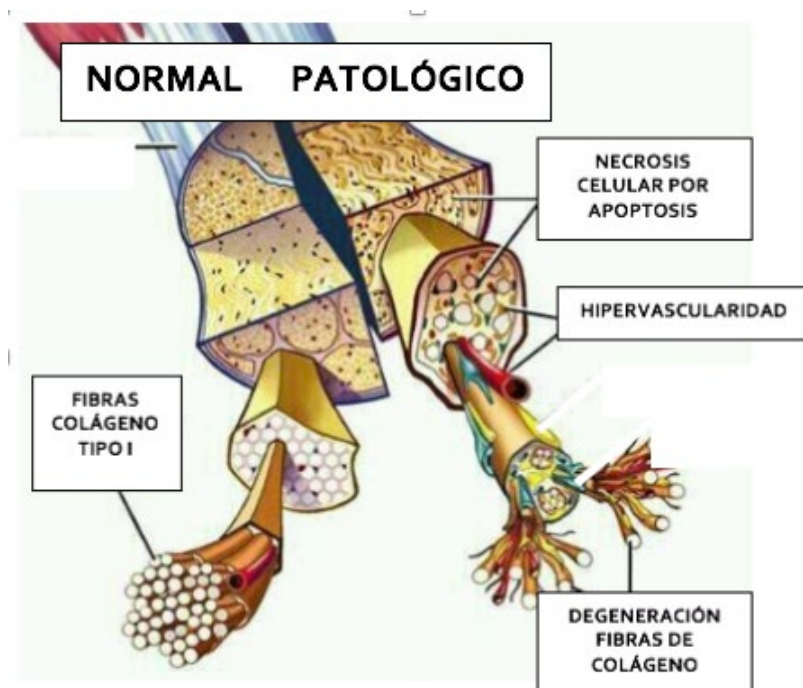
En las tendinopatías también se ha detectado un incremento de los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG: *Vascular Endothelial Growth Factor*) implicado en la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Este hecho redundaría en un incremento del aporte de oxígeno y nutrientes a las células que componen el tendón patológico [4, 170]. Pero, en el caso de las tendinopatías, estos nuevos vasos presentan un endurecimiento en su lámina basal, llegando incluso a obturarlos, de tal forma que, aunque existe hipervascularización, los neovasos que aparecen no son funcionales [44, 171-173]. Esta neoangiogénesis conlleva también una neoinervación del tendón, caracterizada por la presencia de factores de crecimiento nervioso (NGF, *nerve growth factor*) y neurotransmisores como el glutamato, la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP: *calcitonin gene-related peptide*), implicados a diferentes niveles en el procesamiento del dolor [171, 174, 175]. A su vez, los neuropéptidos SP y CGRP, inducen un aumento de la vasodilatación y una desregulación de la síntesis proteica de fibroblastos, lo que repercute, una vez más, en las propiedades óptimas de la ECM, contribuyendo al deterioro de la estructura del tendón y de sus propiedades viscoelásticas [4, 172, 176]. Resultados obtenidos con tendones *in vivo* utilizando la técnica de Doppler energía o Power Doppler (una técnica de imagen no invasiva mediante ultrasonidos que permite la detección de flujos sanguíneos lentos y débiles), han objetivado la proliferación de nuevos vasos en el espesor de algunos tendones con degeneración [177-179]. Es de destacar el hecho de que la neovascularización está más presente en pacientes con sintomatología dolorosa, probablemente debido a su mayor relación con la neoinervación.

Desde el punto de vista macroscópico, si un tendón sano es blanco, brillante y con una estructura fibroelástica firme, un tendón con tendinopatía presenta un aspecto edematoso, mucoide, frágil, engrosado y de color grisáceo [4, 22, 94].

Como resumen, el 90% de las muestras de biopsia tomadas en humanos con tendinopatías por sobreesfuerzo muestran las siguientes características [180]:

- Alteración del tamaño y forma de las mitocondrias y del núcleo de los tenocitos, con presencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma.
- Desorganización de las fibras de colágeno con una orientación incorrecta en la dirección de las líneas de tensión, con rotura de los enlaces cruzados y predominio del colágeno tipo III frente al colágeno tipo I.
- Necrosis focal y microcalcificaciones en la UOT.
- Degeneración mixoide, fibrinoide (caracterizada por la desorganización de las proteínas tisulares que se homogeneizan tomando un aspecto similar al de los depósitos de fibrina) y lipóide del cuerpo del tendón con adherencias irregulares en la cara profunda del paratendón y acúmulo de grasa peritendinosa.
- Presencia de hipervascularidad por hiperplasia vascular.
- Liberación de neurotransmisores nociceptivos como el glutamato, la SP y el CGRP.

Todos estos cambios histológicos y bioquímicos descritos han sido denominados de forma global "hiperplasia angiofibroblástica" [169], y comprenden cambios degenerativos e irreversibles en la estructura tendinosa (**Fig. 16**).

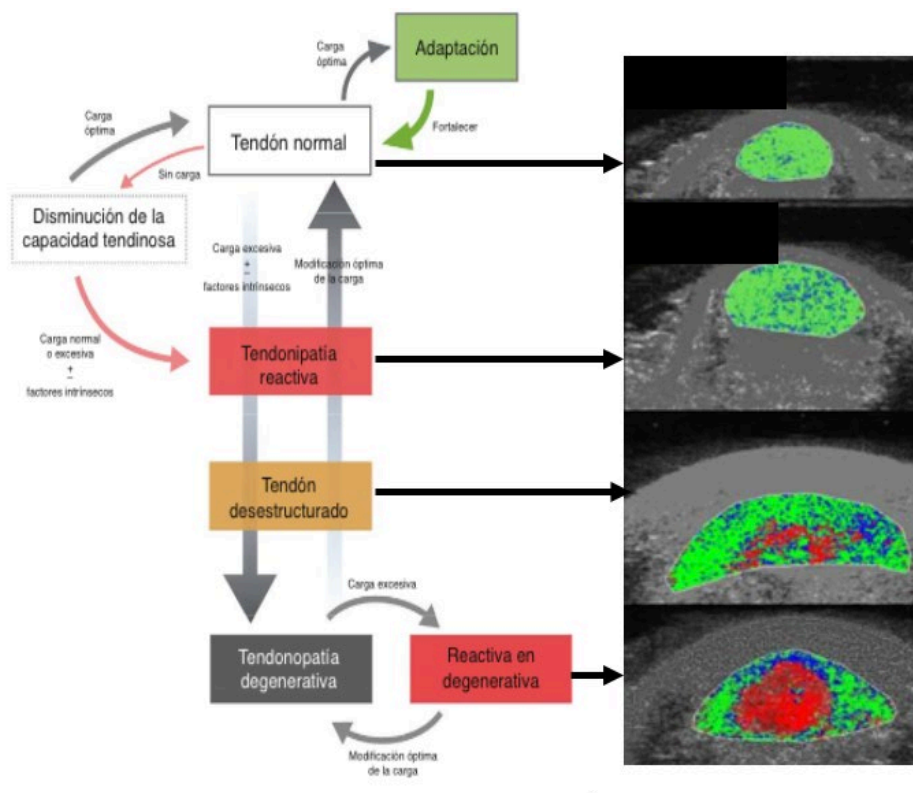


**Figura 16.** Cambios histopatológicos detectados en un tendón con tendinopatía (lado derecho de la imagen) en comparación con un tendón no patológico (lado izquierdo de la imagen).

### 4.3.2. MODELO CONTINUUM

En el año 2009, a raíz de nuevos hallazgos histológicos en muestras de tejidos con tendinopatías, Cook y Purdam [103] presentaron su teoría sobre la evolución fisiopatológica que tiene lugar en esta patología, describiendo un modelo que denominaron el Modelo *Continuum*, posteriormente, corregido y ampliado por estos mismos autores en el 2016 [164].

Este modelo, actualmente más aceptado por toda la comunidad científica que el anterior, describe la tendinopatía como un proceso continuo bidireccional y sugiere, a partir del análisis de los resultados obtenidos con estudios clínicos transversales [181, 182] y los hallazgos histopatológicos mostrados en modelos animales con tendinopatías inducidas [44, 183], la existencia de 3 fases, etapas o progresiones: **tendinopatía reactiva**, **tendón desestructurado** y **tendinopatía degenerativa** (*Fig. 17*). Consideran que es un proceso continuo, pero destacan la capacidad de reversión de algunas fases.



**Figura 17.** Modelo Continuum y su imagen en UTC. Tomado de Cook y Purdam [103].

#### 4.3.2.1. Fase 1: Tendinopatía reactiva.

Cuando el tendón sano recibe una sobrecarga, se desencadena una reacción adaptativa, una respuesta hiperactiva con proliferación celular no predominantemente inflamatoria. A nivel microscópico se objetiva un aumento exponencial del número de células tendinosas, que se redondean, y el índice metabólico de los PGs de mayor peso molecular, como el agregan, crece significativamente [184, 185]. Este PG, al igual que otros, es altamente hidrófilo, atrae las moléculas de agua, lo que provoca un aumento de volumen de la ECM, disminuyendo el estrés del tendón al aumentar su superficie para soportar cargas. En esta fase sólo se refieren cambios celulares, el colágeno mantiene su integridad y no hay ningún cambio en las estructuras neurovasculares [44].

Esta respuesta adaptativa a corto plazo, demostrada en modelos *in vitro* por Cook y Purdam (2007) [183], da nombre a esta fase, denominada **tendinopatía reactiva**. Acontece en sobrecargas agudas, definidas como sobrecargas suprafisiológicas puntuales, y se produce ante un aumento repentino de solicitaciones en un tendón poco acostumbrado a esta actividad, en un deportista desentrenado que comienza a entrenar después de un periodo de lesión, o tras un traumatismo directo.

A nivel macroscópico, las pruebas de imagen de la tendinopatía reactiva muestran un tendón con un patrón fusiforme y un leve incremento de su diámetro, observándose, excepcionalmente mediante ecografía algunas zonas hipoecoicas (áreas más oscuras que el tejido circundante debido a una baja ecogenicidad) entre áreas de colágeno intactas, y mínimos o nulos aumentos de señal en imagen mediante RMN [110, 182, 186, 187]. Por último, una nueva técnica ecográfica, la UTC (*Ultrasound Tissue Characterization*), una prueba que evalúa la estructura del tendón en 3 dimensiones y cuantifica la organización del tendón mediante el análisis de la estabilidad del brillo de los píxeles [188, 189], ha objetivado que esta etapa de tendinopatía reactiva es totalmente reversible con un tratamiento adecuado. El tendón tiene el potencial de volver a su estado óptimo si la sobrecarga se reduce lo suficiente, o si entre sesiones de entrenamiento o trabajo transcurre el tiempo necesario para recuperarse.

Este tipo de tendinopatía, definida con el nombre de esta fase, se presenta principalmente en pacientes jóvenes [103].

#### 4.3.2.2. Fase 2. Tendón desestructurado / degeneración tendinosa.

En esta fase se produce un intento de cicatrización del tendón, similar a la anterior fase, la tendinopatía reactiva, pero aquí ya está presente una descomposición y desorganización de la ECM, es decir, se evidencia una degeneración del tendón. En concreto, en esta etapa se produce un aumento generalizado del número de células en la ECM y del contenido de PGs, pero principalmente se caracteriza porque se empiezan a detectar algunos cambios que afectan a la estructura de fibras de colágeno, como la separación y fragmentación de sus fibras. Al mismo tiempo, en la estructura tendinosa pueden coexistir tanto un incremento de la vascularización como de la inervación [4, 103].

Clínicamente, esta fase es difícil de distinguir de la anterior, ya que, generalmente, el tendón desestructurado es asintomático, no presenta dolor, por lo que no suele verse en la práctica clínica ya que el paciente no acude a consulta. A pesar de ello, las pruebas de imagen si pueden objetivar la patología. Así, en ecografía, aparecen cambios en la señal que reflejan la desestructuración de la ECM, con discontinuidad de los fascículos de colágeno y pequeñas áreas delimitadas hipoeoicas; mediante Power Doppler también se hace evidente la neovascularización; y mediante imágenes obtenidas de la RMN, el tendón aparece engrosado, aunque no se detecta un incremento de su señal [182, 186].

Esta fase que muestra un tendón desestructurado es frecuente en pacientes de un mayor espectro de edad, siendo aún los jóvenes y los deportistas, sobre todo con historia de sobrecarga crónica, los que habitualmente presentan más esta fase de la patología. Al igual que puede suceder con la etapa anterior, ésta también tiene capacidad de reversión si hay una correcta gestión de la carga y del ejercicio para estimular la estructura de la ECM [103].

#### 4.3.2.3. Fase 3. Tendinopatía degenerativa.

En esta fase, prácticamente irreversible en cuanto a su recuperación, en el tendón se puede observar un entramado de células muertas por apoptosis, áreas con gran desorganización de la ECM, y zonas de neovascularización llenas de nuevos vasos sanguíneos, posiblemente afuncionales [4, 165].

Las imágenes obtenidas por ecografía muestran tendones engrosados con signos degenerativos, con regiones hipoecoicas y fascículos de colágeno muy desorganizados sin un patrón fibrilar continuo [186]. Por otra parte, empleando la técnica Power Doppler, en los tendones se puede visualizar un elevado número de vasos sanguíneos, mientras que, en las imágenes obtenidas de la RMN se puede apreciar un engrosamiento muy marcado del tendón y un aumento de la señal intratendinosa [172]. Se ha sugerido que este engrosamiento sería una adaptación positiva de la zona no patológica (sana) del tendón para, de este modo, poder así mantener la capacidad de aguante de las cargas tensiles, debido a que, logrando este aumento de tamaño, podría compensarse el área de desorganización fibrilar [103, 164]. Se hipotetiza que el paciente con tendinopatía puramente degenerativa no presenta clínica hasta que es sometido a un nuevo cuadro de sobrecarga suprafisiológica puntual o a una sobrecarga mantenida en el tiempo que lo desestabiliza, desencadenando en ese momento un cuadro de reactividad sobre el tendón degenerado. En realidad, la detección de este "nuevo cuadro" sería realmente la fase de una tendinopatía reactiva de las fibras sanas compensatorias, momento en el que el paciente comienza con clínica de dolor y, muy posiblemente, realiza la consulta médica [103, 164].

Desde el punto de vista clínico, esta fase se observa más en pacientes de edad madura, aunque también se puede detectar en jóvenes con una sobrecarga crónica del tendón llevada a un extremo con el paso del tiempo. Como se mencionó anteriormente, las tendinopatías en esta fase se presentan con una capacidad casi nula de revertirse, dado que los cambios estructurales producidos, fundamentalmente los procesos de muerte celular como la apoptosis, son irreversibles [103, 164].

Para finalizar lo relativo a este modelo *Continuum*, cabe destacar el hecho de que sus autores, Cook y Purdam [164], son firmes defensores de que un determinado

tendón podría presentar características de los 3 tipos de fases al mismo tiempo, e insisten en la importancia de considerar que determinados factores individuales externos al tendón, algunos ya mencionados, como la edad, la genética, el sexo, y la composición corporal, pero sobre todo el **control de la carga**, pueden alterar la progresión, o la regresión, de esta patología. Es razonable pensar que un mayor conocimiento del impacto de todos estos factores podría repercutir en una mejora de su tratamiento y permitir también una mejor asistencia a los pacientes de riesgo (medicina preventiva).

Como conclusión, se podría considerar que este modelo no difiere demasiado del que clasificaba a las tendinopatías como tendinosis [100, 101], o del modelo que relaciona la sobrecarga y una alteración metabólica, definido por Nirchs como "hiperplasia angiofibroblástica" [169]. Ambos caracterizan la fisiopatología de las tendinopatías como un tejido degenerado con cicatrización fallida. Sin embargo, la diferencia recae en que Cook y Purdam no se refieren a términos que sugieren una patología irreparable, no describen un modelo que pasa directamente de un tendón sano a un tendón con fase degenerativa directamente. Describen un modelo de tendinopatía con capacidad de reversión entre las distintas fases, con una evolución en el tiempo, de ahí el término *Continuum*, en el que añadir o quitar carga será el estímulo que hará que se avance o retroceda de fase, especialmente en las 2 primeras fases, que presentan mayor capacidad de cambio [164].

#### 4.4. SINTOMATOLOGÍA

En las **tendinopatías por sobreuso**, los principales síntomas referidos por los pacientes son dolor y pérdida de funcionalidad. En concreto, describen un dolor local, sin irradiación y limitado en extensión exclusivamente a la zona degenerada. Además, este síntoma no es continuo, sino vinculado temporalmente a la carga; aparece al iniciar la actividad y, tras el calentamiento suele desaparecer, para reaparecer de nuevo cuando el episodio de sobrecarga mecánica finaliza [103, 175].

A pesar de lo anteriormente expuesto en relación con el dolor, es importante señalar que no hay una relación directa entre este síntoma y las tendinopatías por

sobreuso, ya que se han descrito numerosas roturas tendinosas en estructuras aparentemente asintomáticas [190-192]. El momento de la percepción de dolor por parte del paciente podría ser considerado la punta del iceberg, ya que, en ocasiones, cuando se manifiesta este síntoma, ya estaba presente con anterioridad el proceso fisiopatológico, incluso ya en su fase final, del proceso degenerativo [130].

Conociéndose el hecho de que sólo las estructuras inervadas pueden ser fuente de nocicepción y, por tanto, responsables como tales de la experiencia dolorosa del paciente, en el caso de las tendinopatías es inevitable cuestionarse qué estructura o estructuras son las causantes del dolor, donde está su origen. Como se indicará a continuación, se han descrito 2 posibles **modelos (mecánico y bioquímico)** que hipotetizan la etiología de este dolor. Estos postulados han sido desarrollados a pesar de que los mecanismos moleculares y biológicos que subyacen en el dolor crónico tendinoso no son del todo conocidos. Desde un punto de vista clínico, conocer en profundidad estos mecanismos sería fundamental, para así lograr una mayor efectividad en la elección de los tratamientos indicados para aliviar este síntoma.

Tradicionalmente se aceptaba que existía una relación directa entre sobreuso del tendón, inflamación y dolor [193], pero actualmente, la teoría que incluía el proceso inflamatorio está descartada. Los resultados obtenidos en modelos animales [194-196], confirmados posteriormente en ensayos clínicos [44, 100, 169, 197], concluyeron en excluir protagonismo al componente inflamatorio en la génesis del dolor de las tendinopatías. Aunque inicialmente pueda existir en este tipo de lesiones un período inflamatorio, de unos pocos días de duración (con presencia de citoquinas, interleucinas y factores de crecimiento), los síntomas dolorosos que están presentes durante más de tres semanas deben tener su origen en un mecanismo no inflamatorio [198]. Descartado entonces este paradigma, quedan 2 posibles modelos que podrían explicar el origen del dolor en esta patología: el mecánico y el bioquímico.

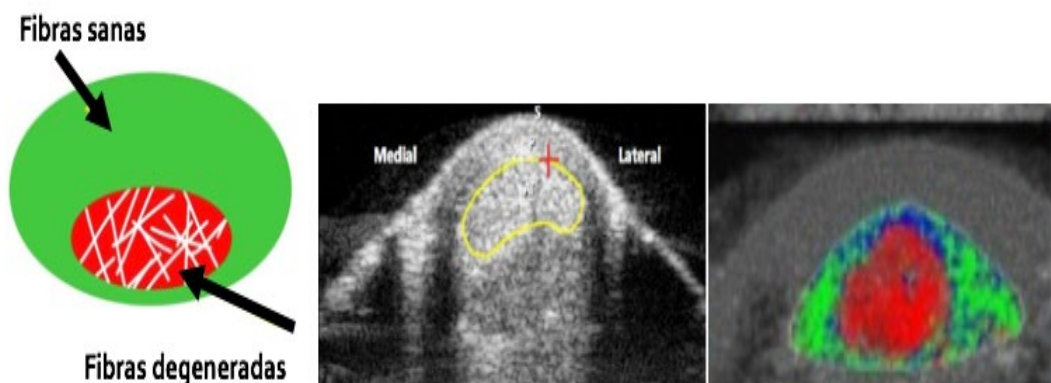
#### 4.4.1. MODELO MECÁNICO

Una primera hipótesis que se ajusta a este modelo defiende la relación entre las alteraciones mecánicas del tendón, alteraciones de su estructura, y el síntoma doloroso. De este modo, se atribuye el origen del dolor a la propia lesión tisular del



colágeno, a la separación o fragmentación de sus fibras, que debido a las sobrecargas mecánicas que soporta el tendón, éstas degeneran. Sin embargo, en la experiencia clínica se ha observado en numerosas ocasiones que pacientes con tendones con signos de degeneración, objetivados ecográficamente, refieren no tener clínica dolorosa ni haberlo tenido antes [44, 95, 99, 107, 181, 186, 191, 199]. Por lo tanto, esta teoría ajustada a este modelo mecánico no podría dar respuesta ni justificación a lo detectado en todos los casos de tendinopatías por sobreuso.

Una segunda hipótesis perteneciente a este modelo mecánico se fundamenta en que el origen del dolor no está en la propia rotura del colágeno, sino en la sobrecarga mecánica a la que se someten el resto de las fibras no patológicas (sanas) de colágeno contiguas a las fibras fragmentadas [103, 164]. Como se muestra en la **Figura 18**, el uso de la técnica ecográfica UTC ha demostrado que coexisten diferentes estados del tejido en un tendón con tendinopatía, presentándose en su espesor zonas de tejido sano adyacentes a porciones bien delimitadas de tejido degenerado [188]. Así, según esta hipótesis, el dolor aparece cuando las fibras de colágeno sanas, no fragmentadas, superan un determinado umbral de carga crítica, en otras palabras, sobrepasan su capacidad "normal" de soportar tensión. Se postula que el paciente presenta clínica dolorosa cuando es sometido a un nuevo cuadro de sobrecarga suprafisiológica puntual o a una sobrecarga mantenida en el tiempo, afectando a las fibras sanas, desestabilizándolas. En conclusión, la causa del dolor estaría en la falta de adaptación del tejido del tendón sano a la sobrecarga y no en el tejido degenerado [103, 164, 200].



**Figura 18.** Esquema e imágenes mediante la técnica UTC de tendón con tejido degenerativo (en rojo) y tejido sano alrededor (en verde). Tomado de Rudavsky y Cook (2014) [200].

Y aún existe una tercera hipótesis que se adapta al modelo mecánico. Ésta se basa en el pinzamiento (*impingement*) tisular que sufren algunos tendones que, debido a su localización anatómica, pueden verse sometidos a compresiones repetitivas con estructuras vecinas, como el acromion y el tendón del supraespinoso, el espolón calcáneo y la fascia plantar, o las fibras profundas del tendón rotuliano y el pico de la rótula. Esta compresión, además de favorecer el deterioro de las fibras de colágeno, estimularía directamente los nociceptores [132]. Sin embargo, se ha comprobado que, al liberar la compresión de forma quirúrgica, realizando una acromioplastia o una exéresis en el caso del espolón calcáneo, el paciente debería conseguir una mejoría sintomática, pero no siempre es así [201, 202]. Por consiguiente, estos hallazgos clínicos también refutan esta teoría, ya que, además de lo anteriormente expuesto, pacientes sin presencia de espolón calcáneo pueden padecer una sintomatología de tendinopatía, al tiempo que pacientes con espolón con este tipo de patología pueden estar completamente asintomáticos [202].

#### 4.4.2. MODELO BIOQUÍMICO/ NEUROGÉNICO

Este modelo defiende que la causa del dolor podría estar en una alteración bioquímica debida a una hipoxia regional y a la falta de células fagocíticas que eliminen los productos nocivos desechados del consecuente metabolismo anaeróbico de los tenocitos [4, 169]. Algunos trabajos postulan que la zona de transición hueso-periostio-tendón, donde existen nociceptores (fibras nerviosas positivas para la SP), al verse sometida a microtraumatismos de repetición (saltos, giros, sprints, etc.), ésta se vería afectada por episodios cíclicos de isquemia como consecuencia de la torsión y cizallamiento de los vasos sanguíneos ubicados en esta región [203]. El mecanismo de acción de esta hipótesis parece corroborarse, ya que, empleando técnicas de microdiálisis que permiten la monitorización de los procesos químicos, en esta zona de transición se ha podido detectar un aumento de lactato, uno de los principales productos del metabolismo anaeróbico e indirectamente marcador de tejidos con isquemia. De este modo, en la zona de transición hueso-periostio-tendón se puede producir una disminución del flujo de sangre rica en oxígeno, esto es, una isquemia, estimulándose la expresión génica, síntesis proteica y secreción de factores de crecimiento vasculares (VEGF: *vascular endothelial growth factor*), lo cual produciría la

formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), y de NGFs, que inervarían esos vasos sanguíneos nuevos. La presencia de NGFs y la SP conlleva una hiperestimulación nociceptiva en esta región de transición [172, 178, 204-206]. En este entorno "tóxico" isquémico, también se produce un incremento de la presencia de la sustancia mixoide (productos de desecho consecuencia de la degradación celular) y de moléculas citotóxicas secretadas por los tenocitos que actúan como "irritantes bioquímicos" del sistema neural aferente. Entre estas sustancias destaca la presencia del aminoácido glutamato, importante neurotransmisor neurotóxico que podría ser la molécula clave del síntoma doloroso en las tendinopatías [203].

En resumen, las evidencias actuales apuntan hacia que los responsables del dolor en las lesiones tendinosas por sobreuso son los procesos bioquímicos (hiperinervación neurovascular) más que los procesos biomecánicos (lesión de las fibras de colágeno y compresión tisular). No obstante, optar por un único modelo no parece lo más indicado ya que, si se atiende a la causa química como elemento causal, ésta debería desaparecer con el tratamiento farmacológico y no siempre es así. Por el contrario, si la causa fuera puramente mecánica, una morfología anormal del tendón sería un factor de riesgo para padecer sintomatología dolorosa, y tampoco siempre se cumple este hecho. En conclusión, ambas hipótesis pudieran ser en parte ciertas y el origen del dolor, por lo tanto, podría ser multicausal, es decir, probablemente la respuesta a su etiología se debe encontrar en el desarrollo de un modelo integrador [130].

## 5. TRATAMIENTO DE LAS TENDINOPATÍAS

Khan publicó en el año 1999 que "el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso está basado en protocolos clínicos que tienen su origen en la tradición y en la suposición" [44] y, este hecho, fue así durante años. De este modo, los tratamientos consistían en la combinación de diferentes técnicas conservadoras, médicas y fisioterápicas, pero ninguna con un porcentaje de éxito suficiente como para considerarse tratamiento de referencia. El tratamiento "tipo" solía incluir reposo, hielo, electroterapia, masoterapia y algún ejercicio, complementándose en ocasiones con una farmacoterapia con antiinflamatorios tipo AINEs y/o inyecciones de corticoides

[207-211]. Desgraciadamente, los pacientes experimentaban largos y frustrantes periodos de tratamiento con resultados impredecibles [212].

En las 2 últimas décadas, debido a los últimos avances en la investigación, el enfoque del tratamiento de las tendinopatías por sobreuso ha variado, pasando de los protocolos mencionados con anterioridad a nuevas líneas de tratamientos conservadores [14-16, 213-219]. Los avances en el conocimiento de la etiopatogenia y la fisiopatología de este tipo de patología, junto con el asentamiento de la base de que las tendinopatías cursan con dolor, alteración de la estructura del tendón y pérdida de su funcionalidad, han sido determinantes en la variación del tipo de tratamiento. Así, el enfoque actual se basa en la combinación de 3 vías de tratamientos, médicos y fisioterápicos, cuyo objetivo será actuar sobre 3 pilares: (I) la **vía inhibitoria**, en el que se emplean tratamientos dirigidos al control del dolor, (II) la **vía estimulativa**, cuyos tratamientos se enfocan a la mejora de la estructura tendinosa, y (III) la **vía adaptativa**, cuyos tratamientos se basan en el restablecimiento de la capacidad de carga y funcionalidad del tejido tendinoso. En resumen, estas 3 vías de tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, interrelacionadas, y cuya combinación resulta necesaria para alcanzar el éxito terapéutico, se basan en inhibir el proceso doloroso, reagudizar una lesión estructural tendinosa cronificada y, por último, readaptar el tendón a la carga, como resolución y prevención de posibles recidivas.

Dentro de cada vía hay un gran abanico de técnicas con objetivos similares y, aunque todas se prescriben actualmente para el tratamiento de las tendinopatías, es importante destacar que no con todas ellas se obtienen los mismos resultados. Por ejemplo, en el caso de la ultrasonoterapia, aunque ha sido prescrita durante décadas, en la actualidad se ha concluido que no presenta buenos resultados que la sigan avalando [162, 220-223]; y tratamientos más novedosos, como son las ondas de choque extracorpóreas, están destacando en la actualidad por tener resultados clínicos notablemente significativos [14-16, 213-219].

## 5.1. MODALIDADES TERAPÉUTICAS CONSERVADORAS.

### 5.1.1. VÍA INHIBITORIA: TRATAMIENTOS ENFOCADOS AL CONTROL DEL DOLOR

Al igual que en muchas otras patologías, en el caso de las tendinopatías por sobreuso se considera que la remisión del dolor es esencial y ha de ser el primer objetivo en el tratamiento. Para lograr este fin, el tratamiento más efectivo es la reducción de la carga del tendón lesionado, es decir, controlar su nivel de carga. En este caso es necesario un estudio individualizado de cada paciente para reducir o limitar durante un tiempo ese mecanismo irritante que produce dolor, pero, en ningún caso, está indicado la inmovilización ni el reposo absoluto [224].

Además del control de la carga, también se han descrito un amplio abanico de técnicas para tratar de forma conservadora la sintomatología dolorosa; éstas se presentan divididas en 2 tipos: tratamientos fisioterápicos [electroterapia, crioterapia y tratamientos manuales a nivel del aparato locomotor] y tratamientos médicos [con fármacos antiinflamatorios, infiltraciones con corticoesteroides e infiltraciones con polidocanol].

#### *Tratamientos fisioterápicos:*

- **Electroterapia.**

Es una técnica fisioterápica basada en el uso de la corriente eléctrica como agente físico para producir sobre el organismo diferentes reacciones fisiológicas y biológicas con fines terapéuticos. Dentro de la electroterapia existe una gran variedad de corrientes. En concreto, para el tratamiento del dolor en las tendinopatías, las que más se aplican son las **corrientes analgésicas tipo interferenciales** y la **electroestimulación nerviosa transcutánea (TENS)** [95]. A través de estas corrientes se consigue estimular las fibras nociceptivas A $\delta$ , bloqueando la sensación de dolor, según la teoría de control del dolor de Melzack y Wall [225]. En concreto, la técnica TENS tiene un efecto analgésico casi inmediato, pero de corta duración. Por el contrario, las corrientes interferenciales, al ser de media frecuencia, presentan menor impedancia de la

piel, mayor tolerancia por parte del paciente y un efecto analgésico más duradero [226, 227].

- **Crioterapia.**

La aplicación tópica de frío, en el caso de las lesiones de tejidos blandos como el tendón, tiene como objetivo provocar una serie de efectos fisiológicos que ayuden al tratamiento de la zona lesionada. Es conocido que su efecto inicial provoca un descenso de la temperatura en el tejido que se aplica, y en tiempos cortos, conlleva una vasoconstricción y, por tanto, una disminución del aporte sanguíneo y un descenso en el metabolismo celular en la zona lesionada. Por el contrario, si su aplicación se mantiene en el tiempo, se produce una vasodilatación refleja a fin de prevenir un daño tisular. Por otra parte, en relación con su efecto analgésico, éste se consigue con aplicaciones de tiempos cortos (menos de 10 min), actuando sobre las terminaciones nerviosas, especialmente sobre las fibras mielinizadas de pequeño diámetro (C), atenuando las transmisiones nociceptivas [229, 230]. A este respecto, cabe destacar que la crioterapia presenta el gran inconveniente de que las pautas de aplicación no son del todo claras y su uso crea cierta controversia [228]. Actualmente no existe ningún tipo de consenso en cuanto al tiempo de aplicación en este tipo de técnica y tampoco en el número de repeticiones al día, o si aplicarlo en agudo o en crónico [228]. La tendencia actual, en el caso de las tendinopatías, es aplicar tiempos cortos (menos de 5 min) y de forma repetitiva (2-3 veces/día), con el fin de lograr los efectos analgésicos mencionados sobre los nociceptores [231].

- **Tratamientos manuales a nivel del aparato locomotor.**

La fisioterapia cuenta con una gran cantidad de técnicas de terapia manual: técnicas de relajación muscular, técnicas miofasciales, masaje muscular, estiramientos, etc. Todas ellas están indicadas en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso con el fin de lograr una relajación de las estructuras miofasciales, disminuyendo así la tensión del tendón afectado [209, 232].

**Tratamientos médicos:**

- **Fármacos AINEs.**

Los AINEs, como el ibuprofeno y el celecoxib, son prescritos habitualmente en las tendinopatías por sobreuso, a pesar de que, como ya se ha mencionado en esta tesis doctoral, la evidencia actual sugiere una presencia escasa de proceso inflamatorio en este tipo de lesión [233]. Además, hay evidencias que demuestran que los antiinflamatorios intervienen por algún tipo de mecanismo aún desconocido en el retraso del proceso de regeneración del tejido blando, ralentizando, por lo tanto, su curación [157-160, 162]. En conclusión, su prescripción en el caso de este tipo de patologías tal vez debería cuestionarse.

- **Infiltraciones con corticoesteroides.**

Este tipo de tratamiento parece ofrecer un alivio del dolor a corto plazo, mientras que, a largo plazo, existe poca evidencia de su beneficio [234, 235]. Debido a esta última característica y también a que está demostrado que produce la inhibición de la síntesis de colágeno pudiendo llegar a provocar hasta roturas espontáneas del tendón, actualmente su uso en el tratamiento de las tendinopatías está cuestionado [236, 237].

- **Infiltraciones con polidocanol.**

Este tipo de tratamiento consiste en la infiltración bajo control ecográfico de una sustancia esclerosante de los vasos, el polidocanol, un alcohol utilizado por los cirujanos vasculares para el tratamiento de las venas varicosas. Esta técnica la introdujeron Ohgber y Alfredson [238] tras sugerir que la neovascularización está asociada a una hiperinervación, afirmación ya introducida en este texto, y responsabilizar a ésta última del dolor en las tendinopatías [172, 178, 204-206]. Por lo tanto, el objetivo de este tratamiento es esclerosar la zona de hipervascularización, eliminando así la hiperinervación vinculada y, en última instancia, el dolor. Los resultados de las primeras series realizadas en el tratamiento de la tendinopatía del tendón de Aquiles mostraron una eliminación de la trama vascular intratendinosa, así como una disminución de la clínica dolorosa [204, 238-240]. Hay que destacar que en todos los trabajos publicados exponiendo este tipo de tratamiento se recomienda la realización,

por parte del paciente, de ejercicios excéntricos del tendón a continuación de la aplicación de la infiltración [178, 204, 205, 241].

### 5.1.2. VÍA ESTIMULATIVA: TRATAMIENTOS ENFOCADOS A LA ESTRUCTURA TENDINOSA

En este caso, la serie de técnicas empleadas para tratar la tendinopatía por sobreuso tiene por objetivo reagudizar la lesión tendinosa, desencadenando de manera controlada un proceso reactivo en el propio tendón y dirigiéndolo hacia una regeneración con mejora en la "calidad" de su estructura. A continuación, y del mismo modo que el apartado anterior, se detallan la serie de técnicas subdivididas en 2 tipos: tratamientos fisioterápicos [termoterapia profunda, ultrasonoterapia, láser, masaje transversal profundo (MTP), ondas de choque extracorpóreas (TOCH) y la técnica de electrólisis percutánea intratisular (EPI), esta última, como es la técnica empleada en esta tesis doctoral será detallada más adelante en un apartado propio] y tratamientos médicos [Terapia con plasma rico en plaquetas (PRP) y factores de crecimiento (PRF) y terapia con células madre].

#### *Tratamientos fisioterápicos.*

- **Termoterapia profunda.**

Esta modalidad terapéutica tiene como fin aumentar la temperatura del tejido para favorecer su curación, al provocar un efecto vasodilatador con el consiguiente incremento del metabolismo celular [242]. Existen distintos tipos de técnicas basadas en la termoterapia y, en el caso del tratamiento de la tendinopatía por sobreuso, la que más se utiliza actualmente es la **diatermia profunda**. Esta técnica presenta mayor penetrabilidad en el tejido, en comparación con otras formas de termoterapia, (como la microonda, infrarrojos u onda corta), eso sí, sin producir un aumento de la temperatura de la piel por encima de los 45°C, ya que esto provocaría una quemadura en la epidermis [243, 244]. Varios estudios defienden los buenos resultados obtenidos con esta técnica para el tratamiento de la tendinopatía por sobreuso [243-245].



- **Ultrasonoterapia.**

Las aplicaciones de ultrasonidos, ondas sonoras de alta frecuencia provenientes de vibraciones mecánicas, han mostrado efectos positivos en el tratamiento de las patologías musculoesqueléticas, reduciendo la inflamación e incrementando los procesos de reparación tisular, al estimular la división celular y la síntesis y mejora de la alineación de las fibras de colágeno en la fase reparadora de los tejidos blandos [221, 246, 247]. A pesar de los efectos beneficiosos descritos con esta técnica, en el caso concreto de su uso clínico para el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, la bibliografía no muestra tales efectos positivos, por lo que no parece eficaz para el tratamiento de este tipo de patologías [220, 223, 248-250].

- **Láser.**

En fisioterapia, la terapia láser (Luz Amplificada por Emisión Estimulada de Radiación) aplica al organismo energía del espectro electromagnético con uso terapéutico. Al igual que ocurre con los ultrasonidos, justifica su aplicación por los efectos fisiológicos beneficiosos que produce, tales como un incremento de la capacidad regeneradora del tejido al estimular la síntesis de colágeno, activar la proliferación de fibroblastos y la síntesis de factores de crecimiento tisular [251-254]. Existe láser de baja y alta intensidad, reportando la literatura los mejores resultados clínicos con el uso del láser de baja intensidad [255]. En el caso de las tendinopatías por sobreuso, en 2 trabajos publicados por Reddy y cols. se mostró un incremento de la tasa de producción de colágeno en tendones con tendinopatía al combinar el tratamiento de láser de baja intensidad con una carga mecánica precoz [256, 257]. Asimismo, posteriormente también se han reportado sus efectos beneficiosos al reducir sensiblemente el síntoma doloroso [258, 259]. A pesar de estos buenos resultados, también hay otros artículos en la bibliografía que ponen en duda su eficacia en el tratamiento de este tipo de lesiones tendinosas, al señalar que sus efectos clínicos superan levemente los obtenidos con placebo [260-262].

- **Masaje Transverso Profundo (MTP).**

Cyriax describió, en el año 1984 la indicación de este tipo de técnica en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso [263]. Los objetivos del MTP son

el provocar una hiperemia que reagudice el proceso tendinoso, además de intentar eliminar las adherencias y fibrosis presentes en los procesos cicatriciales en el tendón. Gehlsen y cols. (1999) [264], en estudios realizados *in vitro*, reportaron que este tipo de tratamiento era efectivo en las lesiones crónicas de los tendones, siendo considerado en esta época uno de los tratamientos de elección [9, 265, 266]. Sin embargo, otros autores como Brossau (2002) [267] no defienden tan buenos resultados al tratar con esta técnica este tipo de patologías.

- **Ondas de choque extracorpóreas (TOCH).**

Este tipo de técnica se basa en la aplicación sobre el tejido de impulsos físicos de presión mecánica de una alta energía y de muy corta duración (de 30 a 130 nanosegundos), generados a partir de una fuente de energía electromagnética, electrohidráulica o piezoeléctrica [268]. La técnica de TOCH tiene su origen en la litotricia, técnica que se aplica desde los años 80 para producir una fragmentación de los cálculos renales. Posteriormente, hacia el comienzo de la década de los 90, la traumatología adopta este tipo de técnica, adaptándola para el tratamiento de las patologías músculo esqueléticas con resultados positivos [269]. Respecto a los efectos fisiológicos que produce, se le atribuye un aumento del metabolismo y de la vascularización en la zona tisular del impacto, provocando una respuesta inflamatoria aguda. Además, es conocido que estimula la liberación de factores de crecimiento en la zona de la lesión, favoreciendo una respuesta regeneradora del tejido lesionado [270, 271]. En la actualidad, hay una gran variedad de estudios que avalan el uso de este tipo de terapia en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso [213, 215, 272-279], aunque, también hay otros, en menor número, que desaconsejan su utilización, debido a que los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos comparados con grupos control o placebo [280, 281].

- **Electrolisis Percutánea Intratisular (EPI).**

Procedimiento fisioterápico perteneciente a la vía estimulativa, pero que, como se ha indicado previamente, por ser la técnica sometida a estudio en esta tesis doctoral, será descrita más detalladamente en un apartado propio.

### Tratamientos médicos:

- **Terapia con Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Plasma Rico en Factores de crecimiento (PRF).**

Las técnicas de estimulación con PRP o PRF consisten en la infiltración en el tejido a tratar de un preparado plasmático, bien de plaquetas o bien de factores de crecimiento (proteínas liberadas de las plaquetas), obtenido de la propia sangre del paciente tras un proceso de extracción y centrifugado. En cuanto a los beneficios fisiológicos que produce este preparado destaca su función moduladora como activador de la respuesta migratoria, de la replicación celular y de la síntesis de la ECM [282, 283]. Por lo tanto, la suplementación exógena de estos factores en las respuestas fallidas de curación, como las tendinopatías crónicas, podría reactivar una respuesta de cicatrización adecuada. A pesar de esta hipótesis, los resultados obtenidos en distintos estudios no son concluyentes ni muestran el suficiente aval en cuanto a su efecto positivo en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, por lo que son necesarios más estudios utilizando grupos control y comparativas con otras técnicas que valoren su eficacia clínica [284-294].

- **Terapia con células madre.**

La utilización de células madre es una de las técnicas más novedosas y, como tal, está en pleno proceso de desarrollo. Su aplicación en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso sólo se ha realizado hasta el momento en ensayos clínicos, y sus resultados preliminares determinan que podría ser una terapia prometedora en el tratamiento de este tipo de patologías, ya que ha demostrado buenos resultados clínicos en estudios a 5 años [295-299].

#### 5.1.3. VÍA ADAPTATIVA: TÉCNICAS ACTIVAS O ADAPTATIVAS FUNCIONALES

Es conocido y aceptado ampliamente por la comunidad científica que con cualesquiera de los tratamientos de las tendinopatías por sobreuso descritos anteriormente es altamente beneficioso la realización conjunta de técnicas de readaptación o fortalecimiento, ya que, si la patología tendinosa está desencadenada por un desajuste en la carga, la solución final pasa por ajustar esa carga. Por

consiguiente, dentro de la vía adaptativa, hay una serie de técnicas que someten al tendón a ejercicios con carga dirigidas a una mejora en la adaptación funcional, buscando la carga idónea, la óptima sin sobrecargarlo, para que los tenocitos activen la formación de colágeno y, en última instancia, se regenere la ECM [300, 301].

A este respecto, existe un arduo debate sobre cuál es la mejor forma de realizar el trabajo activo y las propuestas presentadas se han ido modificando en el transcurso de los años. Hace más de 3 décadas, Stanish (1986) [302] defendió los ejercicios excéntricos como una opción muy válida para tratar las tendinopatías, y sus resultados mostraron que un 44% de los pacientes tratados con este tipo de ejercicios presentaban un alivio completo del dolor, mientras que un 43% de los pacientes restantes presentaban una mejoría general en su sintomatología. Posteriormente, en la década de los años 90, se reafirmó esta idea al comprobarse que las contracciones excéntricas producían un incremento de la fuerza de tensión del tendón [303-305]. No obstante, en esta época aún no se conocía exactamente los mecanismos del cómo y el por qué se obtenían estos resultados. Ya en el año 2000, se demostró que este tipo de contracción estimula los mecanorreceptores de los tenocitos favoreciendo la síntesis de colágeno y una alineación correcta de sus fibras, preparando al tendón para una mayor tolerancia a las fuerzas de tensión futuras [95, 99, 306].

Por otra parte, cabe indicar que las propuestas de protocolo de cómo hacer ese trabajo excéntrico publicadas han ido variando a lo largo de los años. Así, Curwin y Stanish (1984) [90] proponían un protocolo de ejercicios excéntricos que incluía calentamiento y estiramiento previo al ejercicio y crioterapia posterior, preconizando que el ejercicio debía realizarse sin dolor. Posteriormente, Alfredson y cols. (1998) [304] introdujeron el concepto de que la contracción excéntrica era un ejercicio molesto y en ocasiones doloroso, permitiendo a los pacientes realizarlo con dolor. Estos últimos autores defendían que al realizar este ejercicio buscando molestias en el tendón, las fibras nerviosas se acomodan y aunque los niveles de glutamato no se alteran, postulan que sí lo hacen los de sus receptores, como el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), provocando una respuesta fisiológica beneficiosa sobre el tendón [241, 307-309].

Propuestas de protocolos posteriores, como la de Miller (2005) [154] pusieron su enfoque en que el tendón no se usaba solamente en la contracción excéntrica en nuestras actividades de la vida diaria, por lo que parecía lógico y necesario adaptarlo a todo tipo de contracción en su proceso de curación, evitando así recidivas posteriores. Hasta entonces, los estudios publicados únicamente destacaban los beneficios de los ejercicios excéntricos [305, 310-314], llegando incluso a reportar Visnes y Bahr (2007) [315] un 70% de buenos resultados, en cuanto a la mejoría del dolor y la función, obtenidos mediante este tipo de ejercicios. Se omitían los posibles beneficios que podrían generarse de la contracción concéntrica, pero probablemente porque la excéntrica era el único tipo de contracción en la que se había puesto el foco y no porque se creyera que el ejercicio concéntrico fuera nocivo para el tendón. Así, posteriormente, tanto Naugle (2012) [316] como de Rio (2015) [317] analizaron los beneficios del ejercicio isométrico en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, señalando su potente efecto analgésico en el dolor tendinoso. Se demostró cómo mediante contracciones isométricas de larga duración y de baja a moderada intensidad (25-50% de la máxima contracción voluntaria), se producía una reducción del dolor y una inhibición cortical. Por su parte, ya recientemente, Cook y Purdam (2014) [318] también mostraron resultados prometedores en el tratamiento de este tipo de patologías con ejercicios isométricos, proponiéndolos en las fases iniciales de este tratamiento para reducir el dolor y, sobre todo, para mantener la capacidad del tendón de someterse a cargas [88].

Como conclusión, Mallarias (2013) [5] demostró en una extensa revisión bibliográfica que todos los tipos de contracción, isométrica, concéntrica y excéntrica, son beneficiosos en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso y, lo más importante, necesarios en cualquier protocolo que pretenda recuperar una lesión tendinosa. Sin embargo, este autor no pudo determinar cuál era el protocolo de tipo de contracción, tiempo y número de repeticiones más efectivo que se debiera considerar como referente. Lo que sí es incuestionable es que la optimización de cargas según las necesidades de cada paciente es la piedra angular para el éxito en el protocolo, pues cada tendón, cada persona, deberá adaptarse a diferentes cargas, aunque éstas también tendrán que ser adaptadas a cada paciente.

Expuesto todo lo anterior, actualmente la tendencia es a usar en la vía adaptativa un protocolo de ejercicios basado en el modelo *Continuum* propuesto por Cook y Purdam [103, 164, 318], que tiene en cuenta las conclusiones propuestas por Malliaras [5] al integrar los diferentes tipos de contracción. Este modelo de tratamiento está enfocado a la reducción de dolor, modulación de carga, potenciación progresiva encaminada a una correcta regeneración de la estructura tendinosa y, por último, a la prevención de una recidiva. Para ello se diseña un programa de ejercicios adaptado a cada paciente que se inicia con una secuencia progresiva de series isométricas e isotónicas concéntricas, primero con cargas tensiles y, progresivamente, se le van añadiendo cargas compresivas. Seguidamente, cuando ya no hay síntomas de dolor y el tendón ha recuperado su umbral de adaptación y resistencia a la carga al mismo nivel que antes de la lesión, se introduce ejercicio pliométrico, especialmente en los tendones de miembro inferior, puesto que su funcionamiento se basa en el almacenamiento y devolución de energía. Por último, se adaptan los ejercicios a gestos específicos del deporte o trabajo de cada paciente, para evitar posibles recidivas. Por otra parte, es de destacar el hecho de que se recomienda realizar tratamiento de fisioterapia con ejercicio durante al menos 3 meses antes de considerar otras opciones terapéuticas, ya que la estructura tendinosa necesita tiempo para ir adaptándose progresivamente a las nuevas sollicitaciones de trabajo [319-322].

## 5.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Si fracasan los tratamientos conservadores anteriormente expuestos, el tratamiento quirúrgico representa la última opción terapéutica. Según la literatura médica, la cirugía está indicada cuando no se obtienen resultados positivos concluyentes con otros tratamientos físicos o farmacológicos en un período de 6 a 9 meses [323, 324].

De las opciones quirúrgicas posibles, las más utilizadas consisten en una **tenotomía abierta** del tendón, en la que se realizan una o varias incisiones longitudinales además de limpieza y desbridamiento, o en una **tenotomía percutánea longitudinal** guiada con ecografía [171, 324-330]. Los resultados clínicos obtenidos con ambos tipos de cirugías son muy variables. Así, estudios publicados con una pobre

metodología científica se asocian con buenos resultados clínicos, mientras que los estudios con una metodología científica de calidad presentan resultados clínicos mucho menos concluyentes [212, 328, 331, 332]. Por otra parte, al comparar el resultado obtenido con el tratamiento quirúrgico llevado a cabo en sujetos con tendinopatía rotuliana respecto al obtenido en otro grupo empleando tratamiento conservador consistente únicamente en trabajo excéntrico, interesantemente, se obtuvieron resultados clínicos similares en ambos grupos [333].

Actualmente, una novedosa técnica quirúrgica propuesta por Alfredson y cols. (2007) [334], en la que se elimina la neovascularización y la hiperinervación presente en las tendinopatías por sobreuso realizando un afeitado vía artroscópica en la cara profunda del tendón con ayuda de un control de imagen ecográfico, ha obtenido unos muy buenos resultados clínicos; en concreto, 13 de los 15 pacientes con tendinopatía del tendón rotuliano presentaron un muy buen pronóstico de recuperación del tendón transcurridos 6 y hasta 13 meses de la intervención quirúrgica [335].

### 5.3. CONCLUSIONES A LOS TRATAMIENTOS

De toda la batería de tratamientos conservadores, tanto fisioterápicos como médicos, o quirúrgicos explicados anteriormente, y basándose en la evidencia clínica disponible, en la comunidad científica hay dudas más que razonables en cuanto a la elección del tratamiento a llevar a cabo que sea más efectivo o mejor para tratar las tendinopatías por sobreuso [9, 28, 208, 216, 223, 315, 336-338]. Sin embargo, basándose en la etiopatogenia conocida, la estrategia terapéutica más efectiva debe pasar por un tratamiento combinado de diferentes técnicas enfocado hacia 2 campos de actuación:

- Intervenir sobre la propia biología del tendón, para restablecer su homeostasis, utilizando tratamientos que reagudicen la lesión tendinosa para que, de este modo, se pongan en marcha los procesos de regeneración y reparación del tendón que si finalicen con éxito.
- Intervenir sobre la biomecánica del tendón, para reestablecer su función, con un programa de ejercicios controlando de forma progresiva la carga.

## 6. ELECTROLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR

La técnica Electrolisis Percutánea Intratisular (EPI) es una terapia de fisioterapia invasiva creada por el fisioterapeuta español Sánchez-Ibáñez en el año 2003 para el tratamiento de patologías crónicas de los tejidos blandos del aparato locomotor, concretamente, para tratar tendinopatías por sobreuso y fibrosis musculares [14, 339]. Consiste en la aplicación, mediante control ecográfico, de corriente continua (corriente galvánica) a través de una aguja de punción que actúa como electrodo provocando una reacción electroquímica en la región tratada [339]. Esta terapia combina 2 técnicas fisioterápicas: una mecánica, que consiste en la introducción de una aguja roma y flexible en el tejido diana, práctica que se utiliza para técnicas de punción seca de puntos gatillo musculares o en técnicas de acupuntura; y otra electroterápica, consistente en la aplicación de corriente galvánica. Ambas técnicas son utilizadas de forma independiente desde hace años en el ámbito de la fisioterapia [226, 340].

Su mecanismo de actuación consiste en producir una reacción cáustica intratisular, que Sánchez-Ibáñez ha definido como “ablación química no termal”, que generaría una respuesta inflamatoria aguda para reactivar los mecanismos fisiológicos de regeneración del tejido [14, 341, 342]. Para lograr este fin, esta técnica emplea uno de los efectos polares producidos tras la aplicación en el organismo de corriente galvánica, por definición continua, ininterrumpida y de intensidad constante [226], basándose en la utilización del cátodo como electrodo activo. Los animales, e incluso el propio cuerpo humano, están compuestos en más de un 80% por agua y electrolitos, y presentan un comportamiento al paso de la corriente eléctrica similar al de una disolución de cloruro sódico (NaCl), ya que sus líquidos intersticiales y corporales se comportan como conductores electrolíticos. Así, la aplicación de corriente galvánica en una solución de agua salada produce que el NaCl y el agua (H<sub>2</sub>O) se descompongan en sus elementos químicos constitutivos, reagrupándose entre sí para formar el gas hidrógeno (H<sub>2</sub>), el gas cloro (Cl<sub>2</sub>) y el hidróxido de sodio (NaOH); proceso que se conoce como electrolisis y que fue descrito por Michael Faraday en 1834 [343]. En detalle, la molécula de H<sub>2</sub>O, bajo la influencia de la corriente galvánica, se descompone en ion hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y catión de hidrógeno o protón (H<sup>+</sup>); por su parte, el NaCl se descompone



en catión de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y anión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). Todos estos iones inestables, con la técnica EPI, migran hacia el cátodo y el ánodo según su polaridad, y tienden a reagruparse formando las nuevas sustancias o compuestos mencionados ( $\text{H}_2$ ,  $\text{Cl}_2$  y  $\text{NaOH}$ ). Como es ampliamente conocido, el  $\text{NaOH}$  es un compuesto altamente cáustico y, según el autor de esta técnica, es la herramienta terapéutica en la que se fundamenta la técnica EPI, coloquialmente denominada por él como “lejía orgánica o lejía galvánica” [339, 342, 344]. Su mecanismo de acción consistiría en provocar la destrucción del tejido degenerado induciendo así, seguidamente, una respuesta inflamatoria, reagudizando el proceso crónico de este tejido cuya fase de reparación había fracasado [345]. Sánchez-Ibáñez y cols. hipotetizan que en el tejido (tendinoso) que contacta íntimamente con el electrodo activo o aguja catódica se produce una alcalinización del pH, afectando a todo su entorno, y una estimulación de la migración de neutrófilos y macrófagos al foco de la lesión iatrogénica. Estas células fagocitarán los productos de desecho causados por la destrucción electroquímica, “limpiando” la zona de la lesión y promoviendo la migración de otro tipo celular, los fibroblastos, que sintetizarán y secretarán diversos factores de crecimiento, facilitando la síntesis del colágeno y, por último, la regeneración de la ECM [13, 25, 342, 345].

Como se indicó en el punto anterior, la terapia EPI representa una de las técnicas terapéuticas a utilizar en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso perteneciente a la **vía estimulativa**, ya que tiene por objetivo reagudizar la lesión tendinosa desencadenando de manera controlada un proceso reactivo en el propio tendón. Por otra parte, también podría considerarse una técnica de la **vía inhibitoria**, ya que ésta consigue buenos resultados clínicos disminuyendo la sintomatología dolorosa debido al efecto polar del electrodo negativo, consiguiendo la destrucción de terminales sinápticos y degradación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato [342, 344].

En la práctica clínica, el uso de esta técnica está muy indicado en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso combinándola con ejercicios activos de carga. Como ya se mencionó anteriormente, la terapia EPI actuaría sobre la biología tendinosa, sobre su homeostasis, mientras que las técnicas activas (ejercicios adaptativos) actuarían sobre la biomecánica de readaptación de la función y la carga del tendón.

## 6.1. TÉCNICA DE APLICACIÓN

La técnica EPI utiliza un aparato generador de corriente galvánica con polaridad fija, en la que únicamente se puede utilizar el flujo catódico. El aparato está compuesto de 2 electrodos (**Fig. 19**):

- El electrodo activo es el cátodo, un bisturí electroquirúrgico modificado con una aguja de acupuntura con la que se realiza la punción.
- El electrodo indiferente es el positivo, el ánodo, y es un electrodo manual con forma cilíndrica y/o una pulsera que cierra el circuito eléctrico.



**Figura 19.** Aparato de uso en la técnica EPI.

Una de las características de la técnica EPI es que es un tratamiento local, por lo que es determinante el sitio de entrada de la aguja. Realizar la técnica bajo control ecográfico permite localizar mejor la zona de aplicación. El uso de la ecografía en fisioterapia es diferente al que tradicionalmente se realiza en radiología médica. En nuestra disciplina, su uso permite la monitorización de la respuesta al tratamiento y de la interacción dinámica entre las estructuras, aportando mucha información al fisioterapeuta, por lo que se está convirtiendo en una herramienta necesaria en la aplicación de algunas técnicas fisioterápicas, sobre todo invasivas. Mediante un control ecográfico no sólo se localiza mejor la zona a tratar, sino que se evita cualquier efecto iatrogénico no deseado. En las tendinopatías, ecográficamente se identifica el tejido

afectado porque está cercano a áreas focales hipoecoicas, irregularidades en la cortical, pérdidas de continuidad del tejido tendinoso o zonas de hipervascularización [346, 347]. Al aplicar la técnica EPI, el gas de hidrógeno (H<sub>2</sub>) que se genera produce una imagen hiperecogénica bien delimitada, lo que permite una correcta puesta en práctica de la técnica bajo control visual ecográfico simultáneo.

En una tendinopatía por sobreuso, la **intensidad** de aplicación de la EPI, según Sánchez – Ibáñez, debe estar entre 3 y 4 mA [15, 20]. Esta dosis se fundamenta en la impedancia (resistencia) eléctrica de los tendones con tendinopatía; éstos presentan mayor conductividad y, por lo tanto, menor impedancia eléctrica al paso de la corriente que los tendones no patológicos (sanos) o las áreas adyacentes sanas. La zona tendinopática tiene una resistencia al paso de la corriente entre 200 y 250 Ω, mientras que el tejido de un tendón sano está por encima de los 800 Ω [13]. Este hecho avala la hipótesis de que la técnica EPI a intensidades eléctricas bajas provoca que el tejido degenerado sea destruido sin que las células sanas se vean afectadas [15, 20, 342].

Otro parámetro para tener en cuenta es el **tiempo** de aplicación de esta técnica. Un principio máximo es que este tiempo dependerá de la zona a tratar y, por lo tanto, será el necesario para que se logre la destrucción del tejido degenerado. Este hecho se puede objetivar, con la experiencia del fisioterapeuta que aplica la EPI, mediante la detección de que la aguja no encuentra resistencia viscoelástica en el tejido cauterizado. No obstante, se estima que el tiempo total por aplicación no suele superar los 3 segundos [15, 20].

Por último, respecto a la **periodicidad** de cada sesión de EPI, su indicación se estima en cada 7 a 10 días, con el objetivo de adecuarse al ciclo de fagocitosis presente en la primera fase de la respuesta inflamatoria [15, 18-20, 342].

## 6.2. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS

A pesar de que existe una experiencia clínica de más de 15 años en el uso de la técnica EPI y de haberse extendido su aplicación entre los clubs deportivos en todo el mundo, su evidencia científica y los estudios clínicos llevados a cabo son escasos. La bibliografía disponible de esta modalidad de tratamiento es pobre, especialmente en el

caso de estudios de alto índice de impacto. No obstante, los estudios clínicos publicados empleando diferentes grupos de pacientes le atribuyen resultados favorables en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, ya que han verificado una disminución del dolor y mejora en la funcionalidad en un 80-85% de los pacientes [14-17, 19, 348, 349], resultados más beneficiosos desde el punto de vista clínico que los obtenidos con otros tratamientos de fisioterapia, destacando, además, que la EPI produce un menor número de recidivas. Además, en un estudio realizado en el ámbito laboral en el que se comparaba el coste/efectividad entre 2 grupos de pacientes con tendinopatía de la musculatura epicondílea, unos tratados con la técnica EPI y otros con tratamiento quirúrgico, la EPI se mostró más eficiente, generando un menor coste para el sistema, al acortar notablemente el tiempo de retorno a la actividad laboral [18]. Es importante incidir en que, tal y como se mencionó anteriormente, la aplicación de la EPI se realizó, en la mayoría de los estudios, en combinación con un programa de ejercicios activos.

Para lograr ampliar el número de publicaciones que empleen esta técnica en pacientes con tendinopatía, quizás en un futuro se puedan llevar a cabo biopsias o realizar análisis *in vivo* con técnicas de microdiálisis en tendones humanos, para, de este modo, poder obtener un mayor conocimiento del mecanismo de acción de esta técnica sobre este tipo de patología. Pero en la actualidad, los avances en el conocimiento de la base científica que sustenta los buenos resultados clínicos obtenidos aplicando esta técnica para el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso se realizan únicamente con modelos animales. A este respecto y a nivel molecular, el único estudio publicado hasta la fecha y realizado con ratas, ha determinado que la técnica EPI generaba una respuesta molecular en el tejido tratado altamente beneficiosa, objetivándose un aumento de la expresión génica del citocromo C, involucrada, entre otras muchas funciones, en el desarrollo de la apoptosis; el Smac/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*), codificante de la proteína mitocondrial que induce la apoptosis; y el VEGF y uno de sus receptores (VEGFR-2: *Vascular Endotelial Growth Factor Receptor-2*) que actúan como mediadores claves en la angiogénesis [345]. El análisis de los resultados obtenidos concluyó que la EPI puede poner en marcha un

proceso biológico de reparación del colágeno y, en última instancia, de la ECM, aumentando los mecanismos moleculares inflamatorios y angiogénicos [345, 350].

Por otra parte, a nivel histológico aún no existen publicaciones que muestren cuales son los cambios tisulares microscópicos que provoca la técnica EPI durante o tras su aplicación. Macroscópicamente, a corto plazo, en los tendones humanos con tendinopatía tratados con EPI no se aprecian cambios en su estructura manteniendo el patrón de parámetros ecográficos detectados en los tendones degenerados. No obstante, varios autores sí describieron a largo plazo una reducción de la hipervascularidad, objetivada en imágenes mediante Power Doppler, en los casos curados de una serie de pacientes tratados con la técnica EPI en comparación con los tratados con otras técnicas de fisioterapia convencional [17, 351].

En resumen, atendiendo a los resultados de los estudios clínicos publicados, la intervención con la técnica EPI es un tratamiento recomendado en las tendinopatías por sobreuso, en concreto, lo recomendado es la combinación de esta terapia junto con ejercicios activos posteriores. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que evidencien cuales son los procesos moleculares e histológicos que tienen lugar al aplicar esta técnica, con el objetivo de determinar la base científica que relacione la evidencia clínica con la evidencia científica.

## 7. MODELOS ANIMALES DE LAS TENDINOPATÍAS

Como se mencionó en el apartado 4 de esta tesis doctoral, *Patogénesis de las Tendinopatías*, a pesar de la prevalencia de este tipo de patología, la génesis subyacente no es del todo conocida. En consecuencia, ante las limitaciones actuales para su estudio en humanos, la utilización de modelos animales validados nos permite profundizar en el conocimiento de su etiología, sus fases incipientes y sus mecanismos moleculares y, mejorar así, la estrategia terapéutica de su tratamiento [352, 353]. Como es conocido en la ciencia experimental, los modelos animales son una herramienta muy útil para la investigación básica, ya que, a diferencia de los seres humanos, en éstos se pueden tomar datos preclínicos y muestras de tejido en tiempos tempranos de aparición de síntomas en multitud de patologías [354, 355].

En el caso de las tendinopatías, los modelos de animales validados que replican consistentemente las características clínicas, histopatológicas y funcionales presentes en las tendinopatías humanas que se están utilizando son los de **perros, caballos, conejos y ratas** [194, 354, 356-359]. En el caso de los caballos y los perros, que desarrollan de manera natural lesiones tendinosas cuando entrenan y compiten [360, 361], no son modelos animales prácticos, dado su gran tamaño y el alto coste económico de su mantenimiento. Así, los animales de experimentación más utilizados para la investigación en este tipo de patologías son los conejos y las ratas [354, 355, 359, 362], especialmente estas últimas, ya que los conejos, aunque presentan la gran ventaja de poseer unos tendones muy grandes, son biológicamente menos resistentes y pueden morir más fácilmente después de las intervenciones que las ratas.

Independientemente del modelo animal a utilizar, las tendinopatías se inducen mediante 2 procedimientos: mediante **sobrecarga mecánica** extrínseca o mediante la introducción en el tendón no patológico de **sustancias químicas** registradas en muestras humanas con tendinopatías [352]. El uso de la sobrecarga mecánica, habitualmente realizado con cinta de correr forzada, no ha demostrado un éxito universal en el modelo animal de tendinopatía [359, 362], tal vez porque la carga mecánica no sea el único factor que conduce a la lesión tendinosa. Respecto a las sustancias químicas que son utilizadas para la inducción de la lesión tendinosa, las más habituales son la enzima **colagenasa**, las **citoquinas** y las **prostaglandinas**. Estas sustancias producen daños en el tendón, más consistentes que los que se pueden generar con la cinta de correr, con características moleculares e histológicas similares a las de la tendinopatía humana [352]. De los 3 tipos de compuestos, la colagenasa, una metaloproteinasa con capacidad de degradar el colágeno del tejido conjuntivo, es una de las sustancias más utilizadas [363-365] y su inyección induce la degeneración y distorsión de la arquitectura del tendón [4, 27, 50]. Finalmente, cabe resaltar que, aunque hoy no existe un modelo animal perfecto para estudiar las tendinopatías, en la comunidad científica existe un amplio consenso sobre el uso de los tendones de ratas sometidos a inyección intratendinosa de colagenasa para avanzar en el conocimiento de las tendinopatías por sobreuso, en concreto, en el proceso de cicatrización defectuoso que tiene lugar tras la lesión tendinosa [352].

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## HIPÓTESIS

La técnica EPI aplicada sobre un tendón, produce cambios a nivel histológico y molecular que justifican su indicación en el tratamiento fisioterápico de las tendinopatías por sobreuso.

## OBJETIVOS

1. Inducir, mediante la inyección de la enzima colagenasa en el tendón de Aquiles de la rata, una tendinopatía con las características histológicas y moleculares descritas como propias de esta patología, que permita considerarlo un modelo válido para realizar el estudio.
2. Describir y analizar los cambios histológicos que se producen en un tendón de Aquiles sano de la rata tras la aplicación de la técnica EPI.
3. Describir y analizar los cambios a nivel molecular, estudiando los niveles de expresión mostrados por los genes *Cox2*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Vefg* y *Scx*, en el tendón de Aquiles sano de la rata tras la aplicación de la técnica EPI.
4. Describir y analizar los cambios histológicos que se producen en un tendón de Aquiles con tendinopatía de la rata tras la aplicación de la técnica EPI.
5. Describir y analizar los cambios a nivel molecular, estudiando los niveles de expresión mostrados por los genes *Cox2*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Vefg* y *Scx*, en el tendón de Aquiles con tendinopatía de la rata tras la aplicación de la técnica EPI.
6. Describir y analizar los cambios histológicos y moleculares, en los mismos genes estudiados tras la aplicación de la técnica EPI, que se producen tras la técnica de punción con aguja en un grupo de ratas con tendón de Aquiles sano y en otro grupo con tendinopatía. Comparar estos resultados con los obtenidos tras la aplicación de la técnica EPI.



## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## Declaración de Ética

Todos los procedimientos y protocolos experimentales se llevaron a cabo cumpliendo la normativa legal europea (Directiva 2010/63/UE) y española vigente (RD 53/2013, BOE 34/11370-421, 2013), en la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

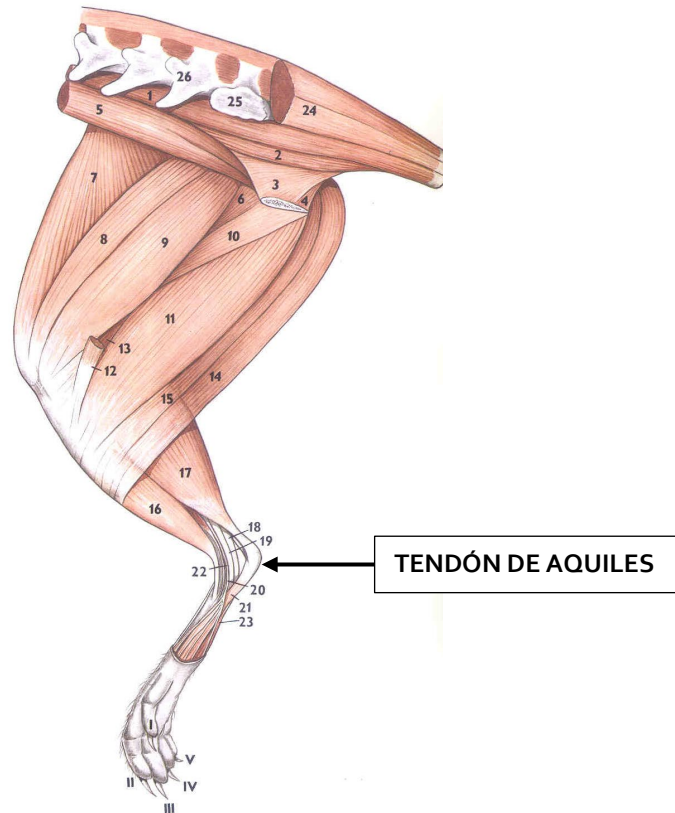
Todos los experimentos e intervenciones se realizaron en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), perteneciente a la Universidad de Salamanca, con el informe favorable del Comité de Bioética Animal de esta Institución.

Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su posible sufrimiento haciendo un cuidadoso diseño de los grupos de trabajo. Se cumplieron las condiciones de alojamiento, luz y temperatura exigidas en el RD 1201/2005 sobre protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

## 1. ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación empleados para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron un total de 33 ratas macho Sprague Dawley, *Rattus norvegicus*, de 8 semanas de edad y un peso aproximado de 250 g, procedentes de Charles River, Barcelona, España. Se mantuvieron en el estabulario del INCYL en condiciones adecuadas, tanto higiénicas como de climatización y de humedad, con ciclos de luz/oscuridad (12/12 h) y alimentadas con dieta sólida estándar y agua.

Para el estudio, se decidió utilizar el tendón de Aquiles de las patas traseras (**Fig. 20**), por ser muy superficial y de fácil abordaje para aplicar, con el menor sufrimiento posible al animal, los procedimientos de inducción de tendinopatía con inyección de colagenasa, y de intervención con la técnica EPI y con punción con aguja (PA).



**Figura 20.** Anatomía del tendón de Aquiles de una pata trasera de la rata.

Los animales se dividieron en 3 grandes grupos de estudio: un grupo control (con solución salina inyectada en el tendón de Aquiles); otro grupo con tendinopatía inducida con la enzima colagenasa y estudiado a corto plazo, en concreto, una única semana de supervivencia tras inyección de colagenasa; y otro grupo con tendinopatía inducida con colagenasa cuya supervivencia fue de cuatro semanas post-inyección. Estos 3 grupos, a su vez, se dividieron en 3 subgrupos cada uno de ellos, para estudiar histológica y molecularmente algunos de los procesos fisiológicos que tenían lugar tras la aplicación de los procedimientos EPI y de PA (ver la totalidad de los grupos en la **Fig. 21**).

<b>Semanas</b>		0	1	2	3	4	
<b>Grupos Experimentales</b>		<b>Inyección de colagenasa</b>	<b>Tratamiento con EPI o PA<sup>(1)</sup></b>	<b>Eutanasia **</b>	<b>Tratamiento con EPI o PA<sup>(1)</sup></b>	<b>Tratamiento con EPI o PA<sup>(1)</sup></b>	<b>Eutanasia</b>
<b>Nº</b>	<b>símbolo</b>						
1	C*						†
2	1T	Δ					†
3	2T	Δ					†
4	EPI		√		√	√	†
5	1T+EPI	Δ	√				†
6	2T+EPI	Δ	√		√	√	†
7	PA		√ <sup>(1)</sup>		√ <sup>(1)</sup>	√ <sup>(1)</sup>	†
8	1T+PA	Δ	√ <sup>(1)</sup>				†
9	2T+PA	Δ	√ <sup>(1)</sup>		√ <sup>(1)</sup>	√ <sup>(1)</sup>	†

**Figura 21.** Diseño experimental con las 33 ratas. El grupo experimental Control (C) fue sometido a inyección con solución salina (\*). Animales sacrificados después de la primera semana (\*\*). (†) Eutanasia. (Δ) Inyección con colagenasa. (√) Tratamiento con EPI o PA<sup>(1)</sup>

Como se muestra en la **Figura 21**, la totalidad de los animales se dividieron en 9 grupos experimentales.

- Grupo 1, **Control (C)**, animales sin patología tendinosa sometidos a una inyección de solución salina (ver procedimiento más adelante) en el primer día de experimentación, con un tamaño de muestra de 6 ratas; sacrificados, un subgrupo de ellos ( $n = 3$ ), a la semana post-inyección, y otro subgrupo ( $n = 3$ ) a la cuarta semana post-inyección.
- Grupo 2, **Grupo 1T**, ratas con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con una inyección de enzima colagenasa en el primer día de experimentación (ver el método empleado en los apartados siguientes) y sacrificadas a la semana ( $n = 3$ ).
- Grupo 3, **Grupo 2T**, animales con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación y sacrificados a la cuarta semana ( $n = 3$ ).
- Grupo 4, **Grupo EPI**, ratas sin patología tendinosa tratados durante 3 semanas consecutivas con una sesión de EPI semanal (ver procedimiento en los siguientes apartados) y sacrificadas a la semana de ésta última, la cuarta semana ( $n = 6$ ).
- Grupo 5, **Grupo 1T+EPI**, animales con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación y tratados a la semana con una única sesión de EPI, sacrificándolos posteriormente a las 3 h de ésta ( $n = 3$ ).
- Grupo 6, **Grupo 2T+EPI**, ratas con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación y tratadas durante 3 semanas consecutivas con una sesión de EPI semanal, sacrificándolas posteriormente a la semana de esta última, la cuarta semana ( $n = 3$ ).
- Grupo 7, **Grupo PA**, animales sin patología tendinosa tratados durante 3 semanas consecutivas con una única sesión de punción con aguja semanalmente y sacrificados a la semana de esta última, la cuarta semana ( $n = 3$ ).



- Grupo 8, **Grupo 1T+PA**, ratas con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación, tratadas a la semana con una única sesión de punción con aguja y sacrificados a las 3 h de ésta (n = 3).
- Grupo 9, **Grupo 2T+PA**, animales con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación y tratados durante 3 semanas consecutivas con una sesión de punción con aguja por semana, sacrificándolos a la semana de ésta última, la cuarta semana (n = 3).

## 2. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

### 2.1. INDUCCIÓN DE TENDINOPATÍA CON COLAGENASA

La enzima colagenasa es una metaloproteinasa con capacidad de degradar el colágeno del tejido conjuntivo. Se emplea, entre otros usos, en el desarrollo de modelos animales experimentales *in vivo* que simulen las tendinopatías humanas, ya que se ha demostrado que tras su inyección en el tendón se induce la degradación de su arquitectura, situación similar a la observada en este tipo de patología en el humano [4, 27, 50].

Este tipo de procedimiento se realizó bajo sedación mediante una cámara de inducción de anestesia con un vaporizador de isoflurano ajustado entre el 4% y el 5% y un medidor de flujo de oxígeno entre el 0.5 y 1 L/min. Tras anestesiarse e inmovilizar a los animales, se les inyectó un total de 250 U (30 µL) de la colagenasa (bacteriana tipo I; Sigma-Aldrich) reconstituida en 0.9% de solución salina previamente filtrada para esterilización con un filtro de 0.22 µm (Nalgene). La inyección se realizó por vía percutánea con una aguja de 30 g a unos 2 mm de la UOT del tendón de Aquiles de la rata. Posteriormente, se observó que el área de inyección y la zona articular no mostraron signos de infección, edema, ni enrojecimiento.

## 2.2. INYECCIÓN DE SUERO SALINO

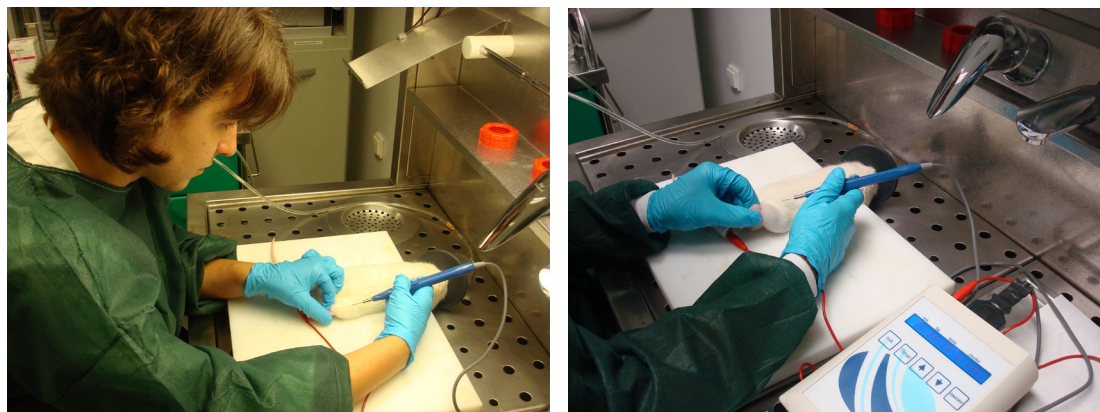
Para comprobar el efecto de la inducción de la tendinopatía mediante la inyección de la metaloproteinasa colagenasa, se compararon los resultados obtenidos a nivel histológico y molecular con los mostrados en el grupo experimental control (C), al que se le inyectó suero salino (solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% en agua) en mismo tiempo y forma que lo realizado con la enzima y descrito en el apartado anterior. El área de inyección y la zona del tobillo, al igual que con la enzima colagenasa, tampoco mostraron signos de infección, ni edema ni enrojecimiento después de este tipo de inyección.

## 2.3. ELECTRÓLISIS PERCUTÁNEA INTRATISULAR

Del mismo modo al realizado en los 2 anteriores procedimientos, en primer lugar, los animales sometidos a la terapia con EPI (ver **Fig. 21**) fueron sedados en la cámara y, seguidamente, una vez retirada de ésta, se les colocó una mascarilla que permitía mantener las condiciones anestésicas durante todo el tiempo que fuera necesario para aplicar este tipo de procedimiento. Cada una de las ratas fue posicionada en decúbito prono, con la articulación del tobillo de la pata trasera a tratar colocada en un ángulo de 90° de flexión, para mantener, en todo momento, al tendón de Aquiles con una adecuada tensión. Finalmente, se preparó la piel con alcohol isopropílico, como refuerzo a la acción bactericida del sistema EPI.

Para la aplicación de la técnica terapéutica como tal, se utilizó el dispositivo EPI® (Epiadvanced, Barcelona, España) con certificado desarrollado por Directiva 93/42/CEE. El electrodo positivo, el ánodo, necesario para cerrar el circuito eléctrico, se fijó con una cincha en contacto directo con la cola de la rata, comprobándose posteriormente que el aparato emitía correctamente. Por otra parte, el electrodo negativo, el cátodo, el que ejercía verdaderamente el efecto biológico, consistía en un bisturí electroquirúrgico modificado con un terminal de aguja estéril de acupuntura, sólida, con punta flexible y no cortante, de 0.3 mm de diámetro y 0.25 mm de longitud (Agupunt, Barcelona, España).

Para el estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral se decidió realizar en cada aplicación de la técnica EPI 3 punciones intratendón a 2 mm de la UOT, con el paso de la corriente a una intensidad de 3 mA durante 4 s por aplicación; parámetros sugeridos por el autor de la técnica para el tratamiento de las tendinopatías [342, 344]. Como se muestra en la **Figura 22**, la aguja se insertó con un ángulo aproximado de 70° a la piel con la punta de la aguja dirigida hacia el calcáneo.



**Figura 22.** Aplicación de la técnica EPI en tendón de Aquiles de la rata.

Como se muestra en la **Figura 21**, este protocolo de EPI se realizó:

- 3 veces, con un intervalo de una semana entre intervención e intervención, en el **grupo EPI**, y posterior eutanasia [sobredosis de pentobarbital sódico intraperitonealmente al 25% (p/v; Vetoquinol, Francia)] a la semana de la última aplicación.
- Una única vez en el **grupo 1T +EPI** y posterior eutanasia a las 3 h.
- 3 veces, con un intervalo de una semana entre intervención e intervención, en el **grupo 2T+EPI** y posterior eutanasia a la semana de la última aplicación.

#### 2.4. PUNCIÓN CON AGUJA

La necesidad de diferenciar entre los mecanismos fisiológicos que se desencadenan por el efecto mecánico de la punción con una aguja y los que son atribuibles al paso de corriente galvánica, producidos por la propia técnica EPI, justificó la obligatoriedad de incluir el grupo control de punción con aguja (PA; ver **Fig. 21**) en este estudio. De este modo, se pudo analizar comparativamente los efectos

producidos, a nivel histológico y molecular, y con los mismos tiempos, en el tendón Aquileo de la rata tras la aplicación de la PA y la de la terapia EPI.

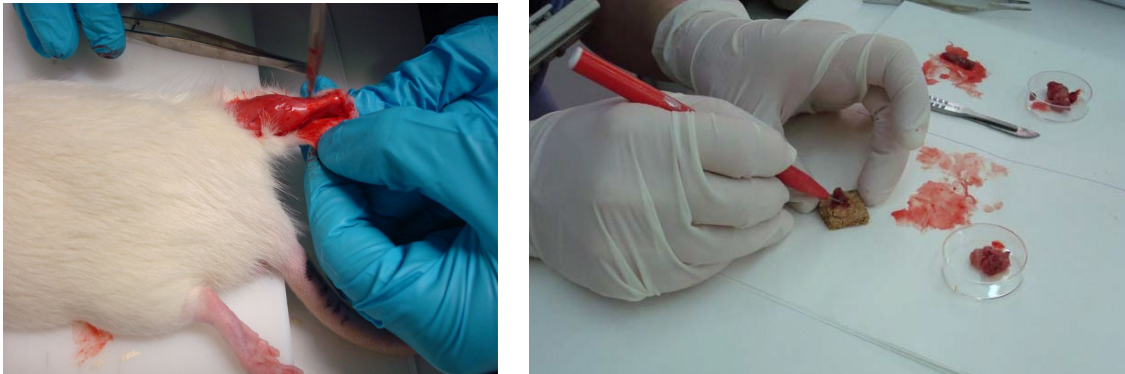
En relación con el protocolo de actuación del tratamiento con PA, la sedación, preparación y colocación de la rata fue el mismo que para el procedimiento de intervención de la técnica EPI. Para la punción se usaron las mismas agujas que en las actuaciones con EPI, agujas estériles de acupuntura, de 0.3 mm de diámetro y 0.25 mm de longitud (Agupunt, Barcelona, España), sólidas, con punta flexible y no cortante. Asimismo, se realizaron 3 punciones intratendón a 2 mm de la unión osteotendinosa en el tendón de Aquiles, con una angulación de 70° con la punta de la aguja dirigida hacia el calcáneo. Este protocolo de punción se realizó:

- 3 veces, con un intervalo de una semana entre intervención e intervención, en el **grupo PA**, y posterior eutanasia (con el mismo método descrito anteriormente) a la semana de la última aplicación.
- Una única vez en el **grupo 1T+PA** y posterior eutanasia a las 3 h.
- 3 veces, con un intervalo de una semana entre intervención e intervención, en el **grupo 2T+PA**, y posterior eutanasia a la semana de la última aplicación.

### 3. MATERIAL BIOLÓGICO Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Tras cada tratamiento (EPI y PA), durante los tiempos estipulados, se llevó a cabo la eutanasia de las ratas y la toma de las muestras de tejido (tendón de Aquiles). Este procedimiento de extracción se realizó tratando de minimizar el daño, tanto a la rata como al tendón, manipulando lo mínimo posible el tejido. Así, los 2 tendones de Aquiles de cada una de las patas traseras de las ratas fueron extraídos mediante disección con bisturí estéril quirúrgico, con un abordaje desde la inserción osteotendinosa en calcáneo hasta la unión músculo-tendinosa en gemelo y sóleo (**Fig. 23**). Seguidamente, las muestras de tejido se prepararon de formas distintas dependiendo del tipo de estudios que se querían realizar con ellas, histológicos o moleculares. Por un lado, las biopsias destinadas a estudios histológicos fueron sumergidas rápidamente en 2-metilbutano (isopentano; Panreac QUIMICA, España), congelados en flotación sobre nitrógeno líquido directamente en O.C.T. (Tissue-Tek®,

VWR International Eurolab; medio de montaje donde se encastra el tejido para su posterior corte en criostato) y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Por su parte, las muestras tendinosas destinadas a los estudios de expresión génica se embebieron en 1 mL de Trizol® y se congelaron a  $-80^{\circ}$  hasta su uso.



**Figura 23.** Extracción de tendón de Aquiles y preparación de la muestra para uso histológico.

### 3.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Las muestras de los tendones encastradas en medio O.C.T., adecuando su orientación durante el proceso de congelación para lograr un corte óptimo, se seccionan en el criostato (Modelo HM550, Thermo Fisher Scientific) con un grosor de  $10\ \mu\text{m}$ , adhiriendo cada una de estas secciones en portaobjetos con poli-L-lisina (Menzel-Glazer) y almacenándolos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (técnicas histológicas).

#### 3.1.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

Una de las técnicas más utilizadas en la histología animal es la tinción de hematoxilina y eosina [366]. Las características de sus compuestos hacen posible observar al microscopio óptico las células individualizadas y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada. De la planta leguminosa *Haematoxylum campechianum* se extrae una sustancia que al oxidarse adquiere un color morado, y para aumentar su capacidad colorante (actuar como mordiente) se combina con iones metálicos de hierro o aluminio, consiguiéndose así la **hematoxilina**. Este colorante se une intensamente a las cargas negativas (aniones), como los ácidos nucleicos (ADN y ARN) tiñendo de color azul los núcleos. Por su parte, la **eosina** de color rosa, rojo o fucsia, dependiendo del tiempo de la tinción y de los lavados que se dé a la muestra, se obtiene de la interacción

del bromo con la fluoresceína, conteniendo cargas negativas que producen que este colorante se una a compuestos con cargas positivas, es decir, básicos, como el citoplasma.

Basándose en esta capacidad de tinción diferenciada, se decidió utilizar esta tinción de hematoxilina-eosina en el estudio de esta tesis doctoral aprovechando la posibilidad que ofrece dicho tinte de poner de manifiesto características generales y aspectos estructurales especiales del tejido tendinoso y muscular, permitiendo observar la morfología del colágeno, los núcleos de los tenocitos y las fibras musculares [195].

Las soluciones utilizadas en el protocolo de tinción fueron:

- Solución de **hematoxilina** de Carazzi: 1 g de hematoxilina cristalizada (C.I. 75290), 50 g de sulfato alumínico, 0.2 g de yodato potásico, 200 mL de glicerina, una cucharada de postre de cristales de timol y 800 mL de agua destilada. Se tritura el sulfato alumínico en un mortero hasta reducirlo a polvo. Seguidamente, el polvo junto al resto de componentes pesados y el agua destilada se disuelven en un agitador, y se añaden finalmente la glicerina y los cristales de timol.
- Solución de **eosina**: 1% de eosina amarillenta (C.I. 45380; 0.5 g en 50 mL), floxina B 1% (0.5 g en 50 mL), 2 mL de ácido acético glacial y 375 mL de etanol 96°.

Por su parte, el procedimiento de tinción fue el siguiente:

1. Fijación en formol 4X durante 10 s.
2. Hidratación de las secciones de tejido depositadas en portaobjetos con agua destilada durante 5 min.
3. Tinción con la solución de hematoxilina de Mayer durante 5 min.
4. Lavados en agua corriente durante 15 min para diferenciar.
5. Tinción con la solución de eosina al 0.2% durante 2 min.

6. Deshidratación en una batería de alcoholes (etanol 70°, etanol 96°, etanol absoluto, mezcla al 50% de etanol absoluto y xileno, y un último paso en xileno) durante 5 min cada paso.
7. Montaje en medio de montaje.

### 3.1.2. TINCIÓN CON SAFRANINA O

La safranina (también llamada dimetil safranina, safranina O ó rojo básico 2), es un colorante biológico que se usa para diferenciar una estructura celular previamente teñida con otro colorante. Al ser una molécula cargada positivamente (catión) es capaz de combinarse con elementos celulares de cargas negativas. Como colorante de contraste se puede utilizar en distintas técnicas histológicas que detectan células enterocromafines del tracto gastrointestinal, el protoplasma y núcleo de microorganismos patógenos. Asimismo, se utiliza en la identificación de procesos degenerativos como la osteoartritis y tendinopatías, ya que éste se une por cargas a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato (ambos con carga negativa) de los glicosaminoglicanos (GAGs), como el queratán sulfato y las condroitinas, que se encuentran en el tejido conectivo del cartílago y los tendones [367].

El protocolo de tinción con la **safranina O** empleado en esta tesis doctoral fue el utilizado por Zhang y Wang (2010) [368], mediante el cual se puede detectar células individuales de tejido cartilaginoso, proteínas mucinas de los tejidos epiteliales y los gránulos de los mastocitos del tejido conjuntivo. En el caso de la tinción de este tipo de células, éstas se tiñen de color naranja a rojo, los núcleos de negro y el citoplasma de gris verdoso.

Las soluciones utilizadas en el protocolo de tinción fueron:

- Solución de **hematoxilina férrica** de Weigert, compuesta de dos soluciones que se mezclan a partes iguales: solución A, hematoxilina [10 g de hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) y 500 mL de etanol 80°] y, la solución B, cloruro de hierro [20 g cloruro de hierro (III), 5 mL de ácido clorhídrico al 37% y 475 mL de agua destilada].

- Solución de **colorante verde rápido** (*Fast Green FCC*) al 0.02%: 0.05 g de *fast green* en 250 mL de agua destilada.
- Solución de ácido acético al 1%: 1 mL de ácido acético glacial en 100 mL de etanol al 70°.
- Solución de **safranina O** al 1%: mezcla de 1 g de colorante safranina O (C.I. 50240; Sigma, USA; Cat. # HT904) y 100 mL de agua destilada.
- Solución de alcohol ácido al 1%: mezcla de 500 mL de etanol 70° y 5 mL de ácido clorhídrico al 1%.

Seguidamente el procedimiento de tinción fue el siguiente:

1. Fijación en formol 4X durante 10 s.
2. Hidratación de las secciones de tejido depositadas en portaobjetos con agua destilada durante 5 min.
3. Tinción con la solución de hematoxilina férrica de Weigert durante 5 min.
4. Lavados abundantes (al menos 4 cambios en cubetas distintas) en agua destilada hasta que el exceso del tinte desaparezca.
5. Diferenciación con alcohol-ácido durante 2 s.
6. Enjuagues abundantes (al menos 3 cambios) en agua destilada.
7. Tinción con la solución de verde rápido al 0.02% durante 1 min.
8. Lavado en ácido acético al 1% durante 30 s.
9. Tinción con la solución del 1% de safranina O durante 10 min.
10. Enjuagues breves en etanol 95°.
11. Deshidratación en etanol 95°, 2 cambios en etanol absoluto y 3 cambios en xilol durante 1 min cada cambio.
12. Montaje empleando medio de resina.

### 3.1.3. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES AL MICROSCOPIO

En la adquisición de las imágenes obtenidas al microscopio se empleó un microscopio de campo claro Olympus AX-70 al que estaba acoplado un cámara digital Olympus Apogee. Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS4 empleando únicamente los parámetros de brillo y contraste.



## 3.2. TÉCNICA DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 3.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN

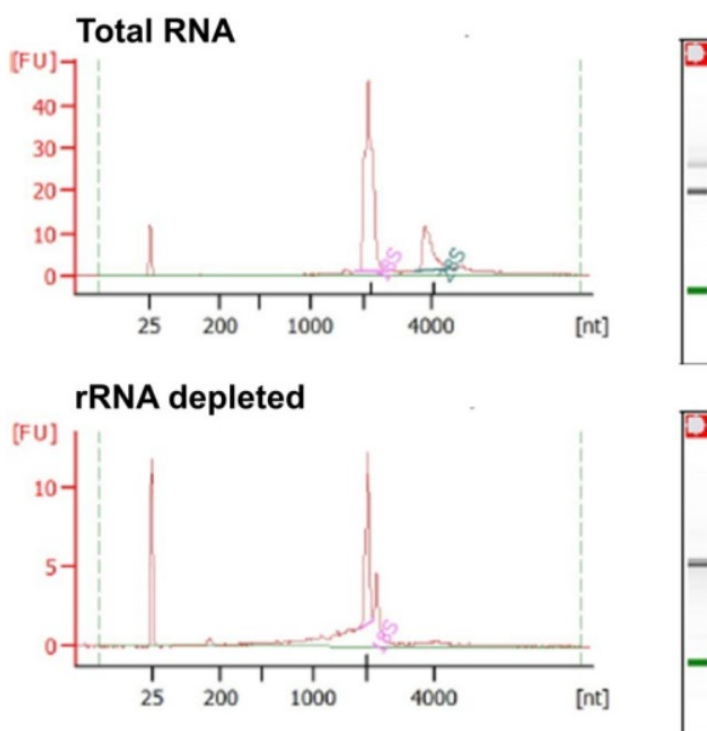
Para la extracción de los ARNs total de tejido se empleó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (1987) [369], usando el reactivo Trizol® (Gibco-Brl). Para ello, se utilizó 1 mL de Trizol® por cada 100 mg de tejido, y se procedió a su homogeneización mediante el homogeneizador *Polytron (T10 basic Ultra-Turrax, Ika, Alemania)*. Tras incubación del preparado durante 5 min a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva de los ARNs totales por separación de fases mediante la adición de 200 µL de cloroformo por cada mL de Trizol® y centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4°C. El ARN obtenido en la fase acuosa superior se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del Trizol® utilizado en el primer paso y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Seguidamente, tras retirar el isopropanol, el precipitado obtenido se lavó con un volumen de etanol 70° igual al del Trizol® utilizado en el primer paso y se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4°C. Posteriormente, después de eliminar el sobrenadante y secar el precipitado que contiene los ARNs, se resuspendió en agua ultrapura libre de ARNasas, incubándolo a 60°C durante 10 min para favorecer su disolución.

### 3.2.2. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN

Cada muestra de ARN total se purificó empleando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de fabricante. Por otra parte, la concentración de los ARNs totales se determinó por espectrofotometría con un equipo *NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific)*. Este instrumento realiza esta cuantificación empleando un análisis espectrográfico, basándose en que los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta con un patrón determinado. En concreto, la muestra se somete a luz ultravioleta en la longitud de onda de 260 nm y el instrumento mide la cantidad de luz que atraviesa la muestra: cuanta más luz absorba la muestra, medida a través de su absorbancia, mayor es la concentración de ácidos nucleicos. Se realizan medidas espectrofotométricas en el rango ultravioleta (UV), a 230, 260 y 280 nm, y se determina la relación  $A_{260}/A_{280}$ , cuyo

dato estima la pureza de la muestra de ARNs, un valor en torno a 2.0 correspondería a una pureza del 100%.

Adicionalmente, se comprobó la integridad (no degradación) de las muestras de ARN totales mediante el chip "RNA 6000 NanoLabChip" (Agilent, Palo Alto, CA, USA) empleando el bioanalizador Agilent 2100 que visualiza, a través de una representación denominada electroferograma, las bandas de ARN ribosómico 18S y 28S, en el caso de muestras procedentes de eucariotas (**Fig. 24**). El algoritmo matemático que describe la integridad de las muestras de ARN total se determina según la escala RIN (*RNA integrity number*), estableciéndose como criterio de muestras de ARN totales óptimas ("íntegras", no degradadas) las que muestran una escala de RIN superior a 8.

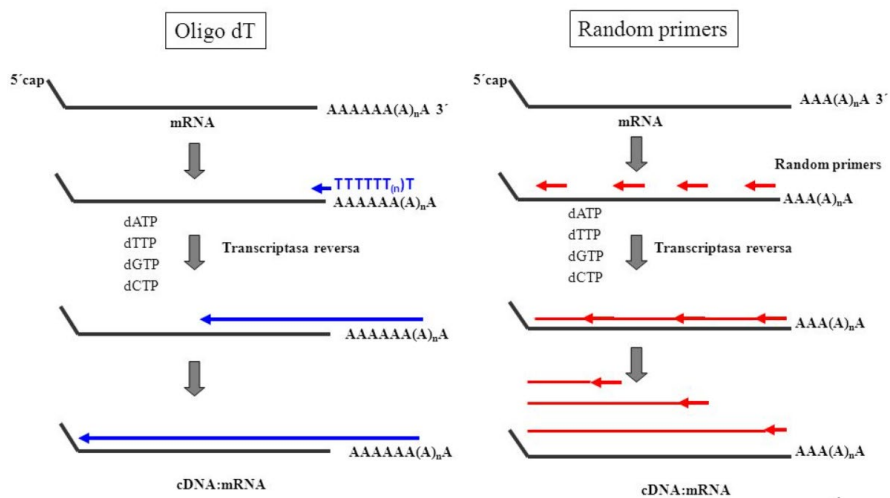


**Figura 24.** Electroferograma de 2 muestras de RNA: la imagen de arriba muestra un RNA "íntegro" (no degradado), con un RIN > 8.0, y la imagen de abajo, una muestra con un RNA degradado, RIN ~ 5.0.

### 3.2.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

Es una reacción enzimática consistente en la síntesis de ADN complementario (ADNc) utilizando como molde cada uno de los ARNs mensajeros (ARNm), contenidos

en los preparados purificados de ARNs totales, producto de la transcripción de genes y macromolécula diana en los estudios de expresión génica. Para llevar a cabo esta reacción enzimática se utilizó el kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcripción System* (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturizó por calor (a 70°C) y durante 5 min una solución de 1 µg de RNA total y 0.5 µg de una mezcla de 2 tipos de oligonucleótidos cebadores, *random* hexámeros y oligonucleótidos (dT)<sub>15</sub>, tras lo cual se enfrió a 4°C. Seguidamente a esta solución se añadió una mezcla que contenía 1 µL de la enzima transcriptasa reversa *ImProm-II<sup>TM</sup>*, 4 µL del tampón *5X ImProm-II<sup>TM</sup>*, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, una mezcla de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) 0.5 mM, 20 U del inhibidor de ribonucleasas *Recombinant RNasin<sup>®</sup>* y agua ultrapura libre de ARNasas hasta un volumen final de 20 µL. La reacción se sometió durante 5 min a 25°C, lo que permite que los oligonucleótidos cebadores anillaran con el ARN molde (ARNm) y, posteriormente, se incubó a 42°C durante 60 min para que la retrotranscriptasa sintetizará los ADNc (ver esquema general en **Fig. 25**). Finalmente, la enzima se inactivó incubando la mezcla de reacción durante 15 min a 70°C.



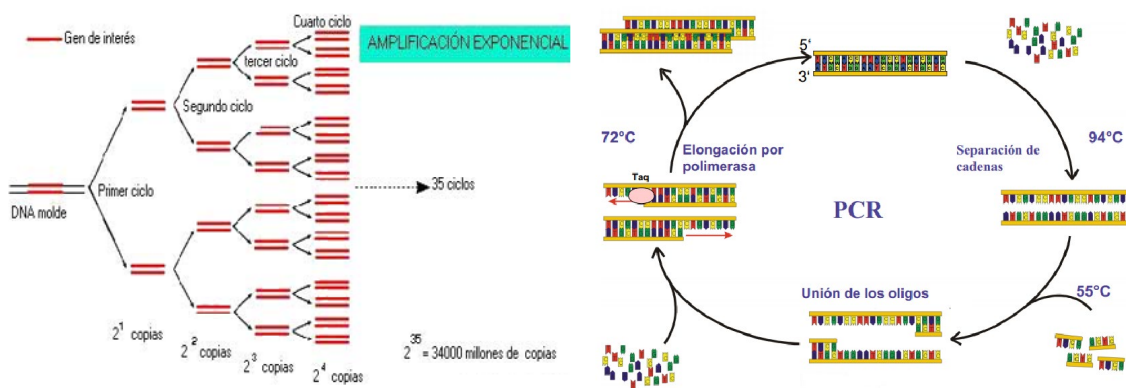
**Figura 25.** Esquema representativo de la síntesis de ADNc a partir de 2 tipos de cebadores, en la imagen de la izquierda se utiliza el oligonucleótido (dT)<sub>15</sub> y, en la de la derecha, los random hexámeros.

### 3.2.4. PCR CUANTITATIVA

La PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real es una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional preparada para poder cuantificar las muestras de

ADN amplificadas obtenidas con la repetición de un número de ciclos determinado (de 30 a 40 habitualmente), a su vez constituido cada uno de ellos, por 3 mismas etapas en condiciones de temperatura diferentes ([370]; ver **Fig. 26**).

- (1) *desnaturalización* o separación de las cadenas de ADN a 94 ó 95°C,
- (2) *anillamiento* o unión de los oligonucleótidos cebadores específicos del ADN molde entre los 50°C y los 65°C, dependiendo de la composición del oligonucleótido, y
- (3) *elongación* o síntesis de la cadena complementaria al ADN molde por la acción de una DNA polimerasa entre los 68°C y 72°C.

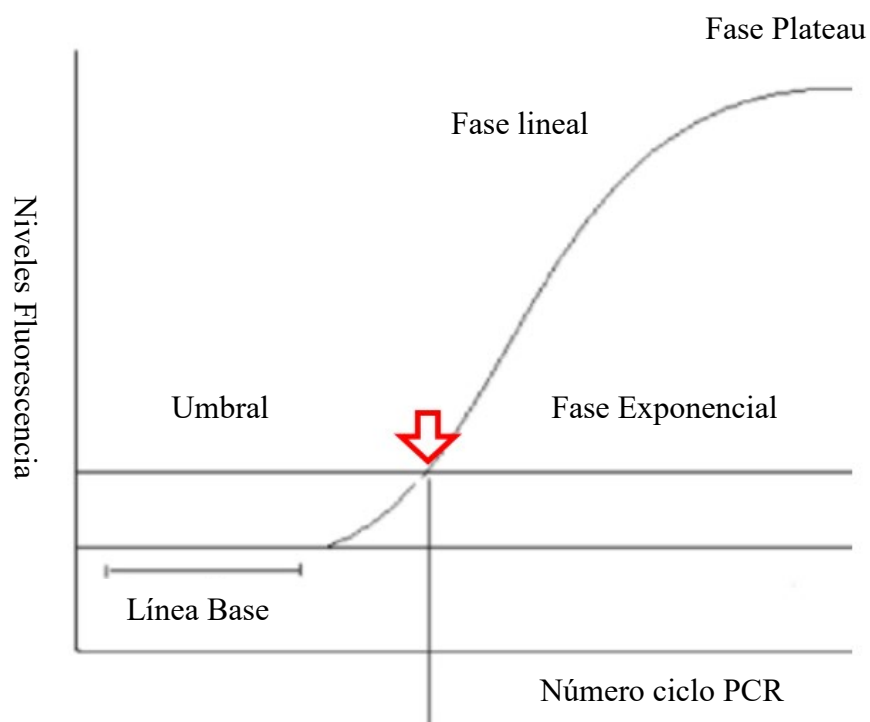


**Figura 26.** Esquema de la técnica de PCR convencional en la repetición de un número de ciclos para amplificar un determinado gen de interés (ADN molde) (izq.). Esquema de las 3 etapas que constituyen un ciclo de la PCR (drcha.).

Por su parte, la qPCR consiste esencialmente en una PCR convencional a la que se le añade una sonda fluorescente que permite la cuantificación de los productos de PCR generados a lo largo de toda la PCR, ciclo a ciclo, mediante un análisis "a tiempo real". Este sistema, por tanto, requiere de un termociclador al cual se le acopla un sistema de detección de fluorescencia (Fluorímetro).

Como se muestra en la **Figura 27**, de las 4 fases de una PCR: base, exponencial, lineal y "plateau", la PCR tradicional utiliza para su análisis la última de ellas, mientras que la qPCR utiliza la fase exponencial como área de detección de las muestras. Así, el parámetro fundamental de análisis en una qPCR es el **ciclo umbral** (*threshold cycle, Ct*), el cual se define como el ciclo al cual la fluorescencia es estadísticamente significativa

por encima del fondo de ruido (*background*), concretamente, cuando la fluorescencia supera 10 veces más la del fondo. De este modo, el Ct determina el ciclo inicial de amplificación en la fase exponencial y es inversamente proporcional al número de copias iniciales del molde.

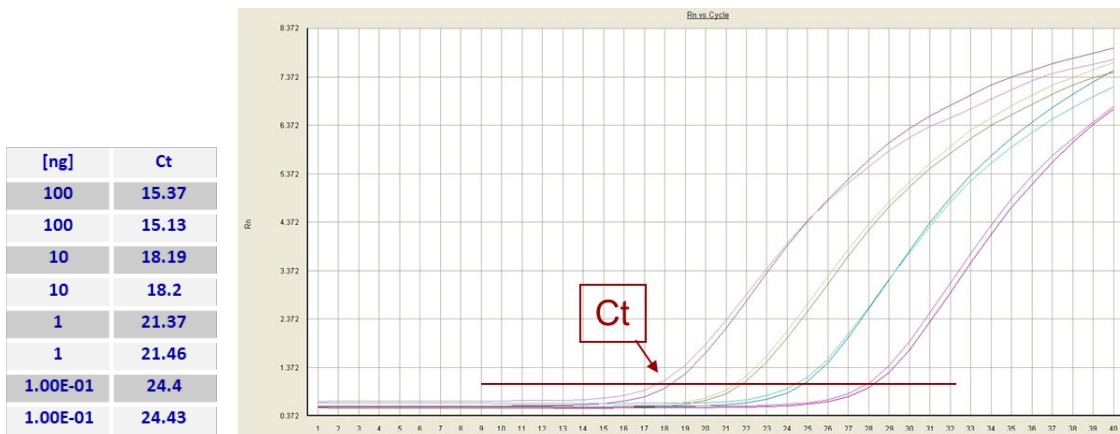


**Figura 27.** La qPCR utiliza la fase exponencial como área de detección de las muestras a través de su parámetro fundamental, el ciclo umbral (*Ct*), marcado con la flecha roja.

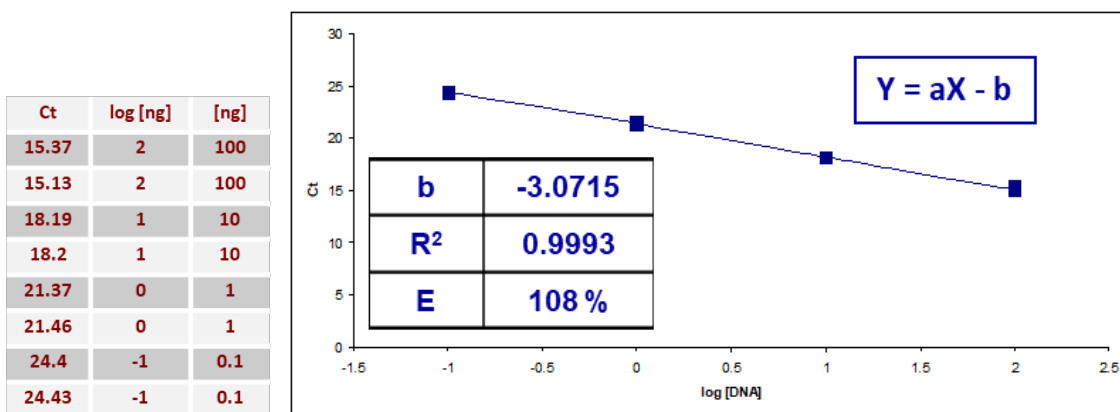
Previamente a la realización de la cuantificación de las muestras de ADN amplificadas, se realizó un análisis de la eficiencia de los oligonucleótidos cebadores específicos para cada uno de los genes a estudiar (ver al final de este apartado la **Tabla 2**). De este modo, se estableció el rango dinámico de expresión de cada pareja de oligonucleótidos cebadores y también su **Eficiencia (E)**. Mediante este análisis también se determinó el rango de concentración óptima a la cual se podía realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica para cada uno de los genes. Para ello, y de forma específica, se realizó una dilución de concentraciones seriadas del ADNc (100, 10, 1 y 0.1 ng) de cualesquiera de las muestras y grupos experimentales empleados en esta tesis doctoral y se calcularon los Ct obtenidos para cada una de las concentraciones dispuestas (**Figura 28A**). Seguidamente, se representó el logaritmo decimal de las concentraciones producto de las diluciones seriadas y los Ct obtenidos

en cada caso (**Figura 28B**), obteniendo una recta de regresión donde la pendiente (b) está directamente relacionada con la Eficiencia (E), calculada según:  $E = 10^{(-1/b)}$ .

(A)



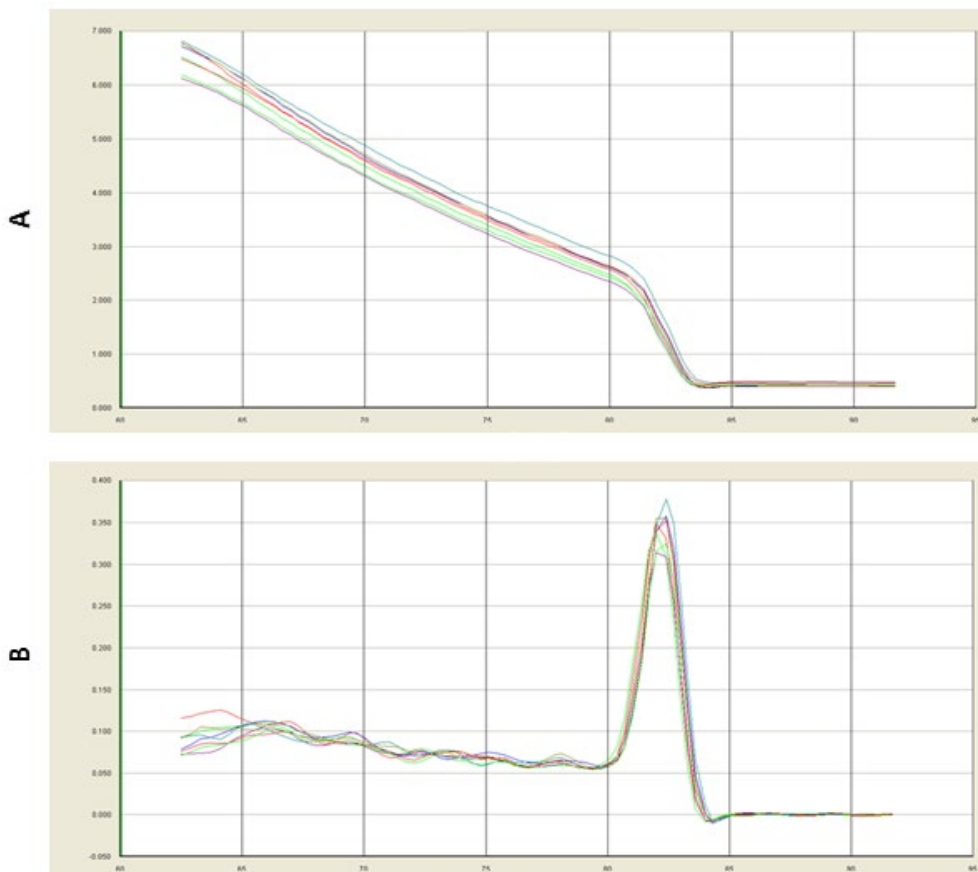
(B)



**Figura 28 (A y B).** Ejemplo de método de análisis de la Eficiencia y rango dinámico de una pareja de oligonucleótidos cebadores específicos para un gen a estudiar.

Por otra parte, para la cuantificación de las muestras de ADN amplificadas se empleó la sonda fluorescente inespecífica SYBR-Green I, fluorocromo que se une a la doble hebra de ADN, cuya especificidad viene determinada por el diseño óptimo de los oligonucleótidos cebadores. Por tanto, para determinar la especificidad de los productos de PCR generados empleando este tipo de sonda, se realizó a posteriori de la repetición de ciclos, un análisis de curva de desnaturalización. Como se observa en la **Figura 29A**, tal curva se obtiene al analizar el nivel de fluorescencia (equivalente a la concentración de ADN amplificado en las qPCRs) según aumenta la temperatura grado

a grado (en el ejemplo de la figura, de 60°C a los 95°C); en un determinado momento, el nivel de fluorescencia cae bruscamente siendo indicativo de la temperatura exacta a la cual se desnaturaliza el ADN amplificado. Si en una determinada muestra únicamente se observa un único pico de desnaturalización en la representación de la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura frente a la temperatura significará que el producto de ADN amplificado es único y, por lo tanto, específico (**Figura 29B**); por el contrario, si se detectan varios picos, se habrán obtenido una mezcla de productos de PCR, ADN amplificados, siendo la qPCR inespecífica e inválida para su uso en la cuantificación.



**Figura 29.** Curva de desnaturalización de varias réplicas de un mismo tipo de muestra. (A) El eje de las ordenadas marca la fluorescencia frente al eje de abscisas, la temperatura. (B) El eje de ordenadas representa la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura frente al eje de abscisas, la temperatura. En esta última gráfica se observa un único pico, por lo tanto, los productos de qPCRs obtenidos son todos exactamente iguales, es una qPCR específica.

El procedimiento experimental de la qPCR consistió en mezclar en un volumen final de 20  $\mu$ L: 10  $\mu$ L de *Máster Mix* (PCR Master Mix Power SYBR-Green, Applied

Biosystems), 0.8 µL de cada correspondiente pareja de oligonucleótido cebador (ver **Tabla 2**), 7.4 µL de agua ultrapura y 1 µL de la correspondiente muestra de ADNc, específicas de cada uno de los grupos experimentales utilizados en este trabajo, en la concentración establecida según el rango dinámico de expresión génica de cada pareja de oligonucleótidos cebadores (todos los empleados en esta tesis doctoral se han utilizado a 100 ó 10 ng/µL). La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador acoplado a un fluorímetro *QuantStudio7 Flex Real-Time PCR System* (ThermoFisher) utilizando las siguientes condiciones: 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 30 s a 60°C. Al final de éstas, se obtuvieron los Ct correspondientes a cada muestra (replicada 3 veces para minimizar los posibles errores de pipeteo) en cada grupo experimental (con un mínimo de 5 muestras y un máximo de 6 muestras por cada uno de estos grupos) y, seguidamente, se ejecutó el programa específico para analizar la curva de desnaturalización mencionada anteriormente y se verificó la especificidad de los productos de PCR obtenidos. Asimismo, en los análisis de qPCR del conjunto de todas las muestras para cada pareja de oligonucleótidos cebadores se añadieron controles negativos, constituidos por la misma mezcla de reacción mencionada al principio de este párrafo con la excepción del ADNc.

El tipo de análisis de datos empleado para la cuantificación de las qPCRs fue el de cuantificación relativa, a una condición dada ("control"), utilizando el método de las Ct, útil en el caso de que las Eficiencias (E) de las rectas patrón de los rangos dinámicos sean muy similares entre las qPCRs de muestras a comparar (variación máxima de un 10%). De este modo, la E de la qPCR para cada par de cebadores, junto con los valores del Ct obtenidos, fueron usados para calcular la expresión relativa de cada transcrito ("*fold change*": FC), de acuerdo a la ecuación  $E^{-\Delta Ct \text{ "condición 1"} - \Delta Ct \text{ "condición 2"}}$ , donde la E se refiere a la eficiencia de la PCR,  $\Delta Ct$  de cada "condición" ("condición 1", por ejemplo el grupo experimental EPI y, "condición 2", el control) es igual a la Ct del "gen de interés" – Ct del "control interno, gen endógeno o *housekeeping*" [371, 372].

Finalmente, para determinar el gen endógeno óptimo a utilizar en la cuantificación de las qPCRs se analizaron los perfiles de expresión de 3 genes codificantes de la  $\beta$ -actina ( $\beta$ -act), la proteína ribosómica RPL19 (*Rpl19*) y el gliceraldehido 3-fosfatasa deshidrogenasa (*Gapdh*). Los niveles de expresión de cada



uno de ellos se midieron por retrotranscripción qPCR (RT-qPCR) en todos los grupos experimentales empleados en esta tesis doctoral y se utilizó el programa *NormFinder* [373] para calcular las variaciones de expresión génica intra e intergrupales, concluyendo qué gen es el más estable y, en este estudio, se determinó que era el gen de la *Gapdh* (**Tabla 2**).

## Material y Métodos

Gen	N° GenBank*	Secuencia oligonucleótido cebador cadena arriba	Localización cadena arriba *	Secuencia oligonucleótido cebador cadena abajo	Localización cadena abajo *	Tamaño amplicón	E†
<i>Scx</i>	NM_001130508	GAGAACACCCAGCCCAAACA	700-720	CGAATCGCCGTCTTTCTGTC	769-788	89	2.00
<i>Vegf</i>	NM_031836	GCAATGATGAAGCCCTGGAG	1271-1290	GCTGGCTTTGGTGAGGTTTG	1338-1357	87	1.97
<i>Cox2</i>	S67722	CCCATGGGTGTGAAAGGAAA	566-586	GGGATCCGGGATGAACTCTC	636-655	90	1.96
<i>Col1a1</i>	NM_053304	GCCTCAGCCACCTCAAGAGA	3681-3701	GGCTGCGGATGTTCTCAATC	3801-3820	140	2.06
<i>Col3a1</i>	NM_032085	CCAGGACAAAGAGGGGAACC	1194-1213	CCATTTACCTTTCCACCA	1277-1297	103	1.99
<i>Mmp2</i>	NM_031054	ACACCTGACCTGGACCCTGA	615-634	TTCCCCATCATGGATTCGAG	700-719	105	1.98
<i>Mmp9</i>	NM_031055	GCAGGGCCCCTTTCTTATTG	1659-1679	CTGGCCTGTGTACACCCACA	1769-1788	130	2.02
<i>β-act</i>	NM_031144	AGCCATGTACGTAGCCATCC	415-434	ACCCTCATAGATGGGCACAG	510-529	115	1.98
<i>Gapdh</i>	NM_017008	ACATGCCGCCTGGAGAAACCT	805-824	GCCCAGGATGCCCTTTAGTGG	874-894	90	1.96
<i>Rpl19</i>	NM_031103	TCGCCAATGCCAACTCTCGTC	123-143	AGCCCGGGAATGGACAGTCAC	191-211	89	2.07

**Tabla 2.** Oligonucleótidos cebadores empleados en las qPCRs. (\*) Localización de oligonucleótido en la secuencia del GenBank correspondiente. (†) Eficiencia (E) del oligonucleótido cebador. Abreviaturas: Escleraxis (*Scx*), factor de crecimiento vascular endotelial (*Vegf*), cyclo-oxygenase 2 (*Cox2*), colágenos tipo I y tipo III (*Col1a1* y *Col3a1*), metaloproteinasas de la matriz 2 y 9 (*Mmp2* y *Mmp9*), β-actina (*β-act*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y 6oS ribosomal protein L19 (*Rpl19*).

# IV. RESULTADOS



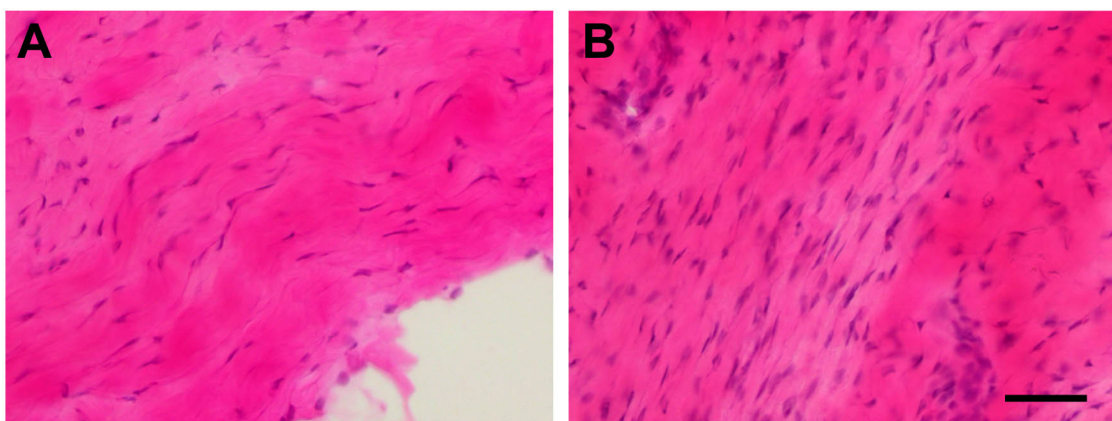
Con el objeto de conocer, en primer lugar, las variaciones histológicas detectadas al comparar los distintos grupos experimentales empleados en esta tesis doctoral y, en segundo lugar, analizar los perfiles de expresión génica mostrados en los mismos grupos experimentales, desde un punto de vista didáctico se analizaron pormenorizadamente 4 tipos de comparativas:

- **C vs. 1T:** Mediante esta comparativa se pudo determinar el efecto que tuvo, a nivel histológico y molecular, la inyección de colagenasa transcurrida una única semana (1T).
- **C vs. EPI vs. PA:** En esta comparativa se pudieron observar las variaciones histológicas y moleculares al realizar un tratamiento con EPI en un tendón sano durante 3 semanas consecutivas, frente a un mismo tejido que no recibió tratamiento alguno (grupo control, C) o el que recibió durante ese mismo tiempo, tratamiento con punción con la misma aguja que se emplea en la EPI sin aplicar corriente eléctrica alguna (grupo punción con aguja, PA).
- **1T vs. 1T+EPI vs. 1T+PA:** Con esta comparativa se pudieron determinar las histologías y perfiles moleculares de los genes diferencialmente expresados en las ratas con tendinopatías tratadas con EPI, una semana post-inyección de colagenasa, con una única sesión y sacrificadas a las 3 horas (1T+EPI) frente a los que, en los mismos tiempos, no recibieron tratamiento alguno, tendinosas (1T), o recibieron un único tratamiento con punción con aguja tal y como se indicó anteriormente (1T+PA).
- **2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA:** En esta comparativa se pudieron detectar las variaciones histológicas y diferencias de expresión en los genes estudiados en los grupos con tendinopatía tratados con EPI durante 3 semanas consecutivas post-inyección de colagenasa (2T+EPI) frente a los que, en los mismos tiempos, no recibieron tratamiento alguno, tendinosos (2T), o recibieron el tratamiento con 3 sesiones de punción con aguja (2T+PA).

## 1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO COMPARATIVO

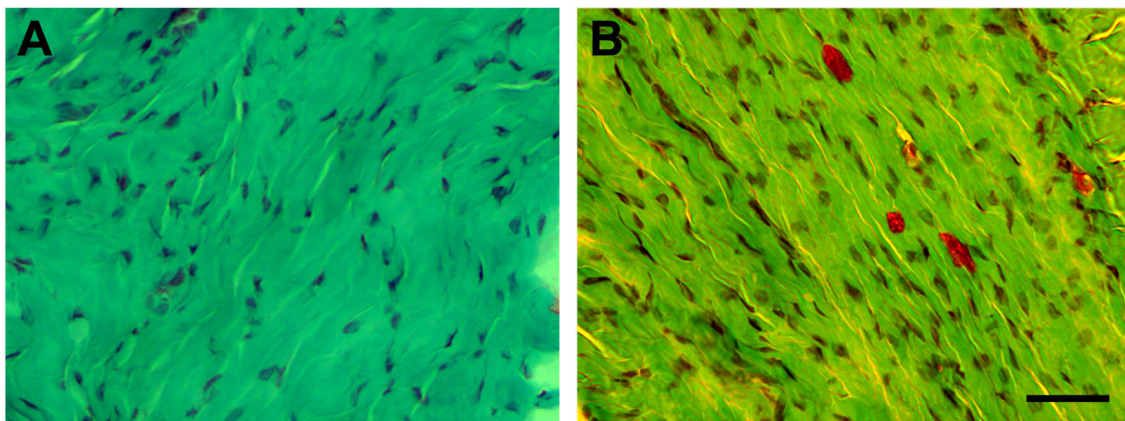
### 1.1. C vs. 1T

Como se observa en las **Figuras 30 y 31**, tanto en la tinción con hematoxilina-eosina como en la de la safranina O, se pudo detectar que la inyección de colagenasa intratendinosa en el tendón de Aquiles transcurrida una semana (1T) en comparación con la del grupo control (C), provocaba un daño tisular significativo. En concreto, la imagen con tinción de *hematoxilina-eosina* de un tendón sano, muestra una estructura con un patrón celular altamente organizado, donde las células tendinosas, es decir, los tenocitos, aparecen alineadas y empaquetadas entre los haces de colágeno, constituidos por fibrillas de diámetro variable y alineados con respecto al eje longitudinal del tendón determinado por la dirección de tracción (**Fig. 30A**). Por el contrario, en la muestra representativa del tendón de Aquiles tras una semana de la inyección de colagenasa intratendinosa (grupo 1T), se observa un notable aumento del número de tenocitos, así como una apreciable desalineación de las fibras de colágeno y un incremento de la vascularización (**Fig. 30B**); por consiguiente, la comparativa entre ambas imágenes, constata un daño tisular significativo, detectándose una notable alteración con pérdida de organización de la ECM.



**Figura 30.** Tinción de secciones del tendón de Aquiles con hematoxilina-eosina en 2 grupos experimentales: C y 1T. (A) Tendón de Aquiles normal; (B) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana. La barra de escala es 50  $\mu\text{m}$ .

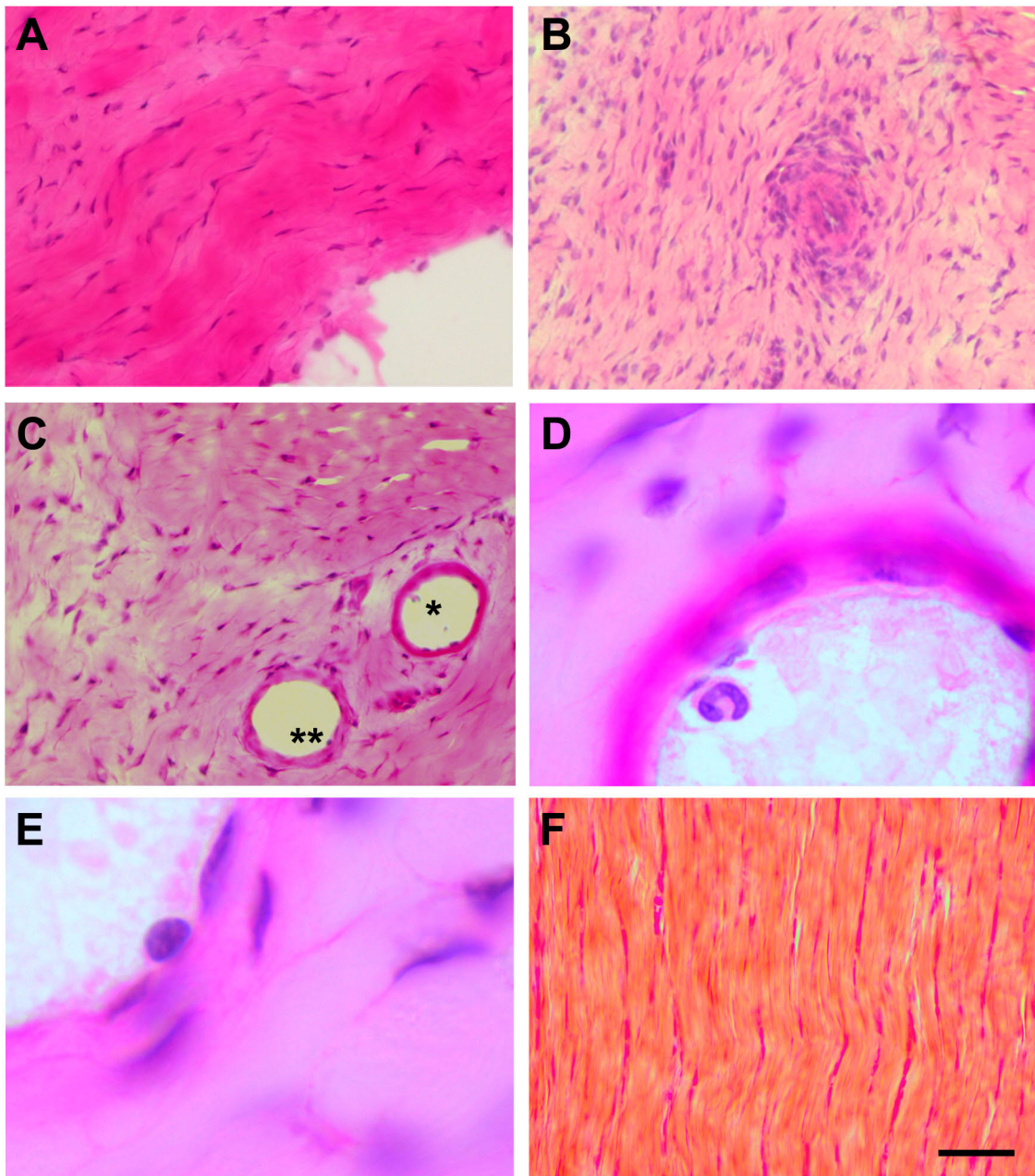
Por otra parte, el empleo de la tinción con safranina O (**Fig. 31**) fue útil para detectar la formación de tejido nuevo no tendinoso, particularmente la formación de tejido similar al cartílago, detectándose células de este tipo en el tejido con tendinopatía (ver las células teñidas de rojo en la **Fig. 31B**).



**Figura 31.** Tinción de las secciones del tendón de Aquiles con Safranina O en 2 grupos experimentales: C y  $\pm$ T. (A) Tendón de Aquiles normal; (B) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana. La barra de escala es 50  $\mu$ m.

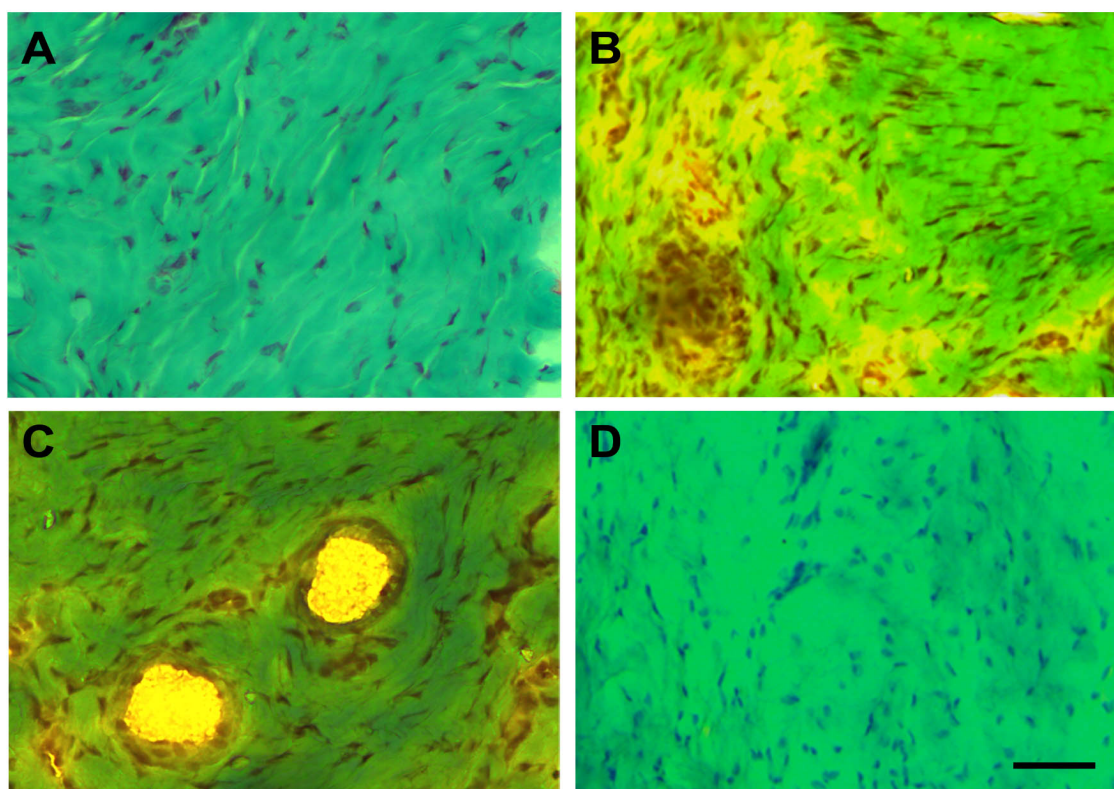
### 1.2. C vs. EPI vs. PA

Al analizar las imágenes histológicas del grupo de ratas con tendón de Aquiles sano que recibió tratamiento con 3 sesiones de EPI, en ambas tinciones, tanto en la hematoxilina-eosina (**Fig. 32**) como en la Safranina O (**Fig. 33**), se objetivó la presencia de infiltrado tisular con células inflamatorias, en concreto, leucocitos tipo linfocitos y monocitos, y nuevos vasos sanguíneos, de pequeño tamaño, correspondientes a neoangiogénesis (**Figs. 32 B-E; 33 B-C**). Por su parte, en la imagen histológica del grupo tratado con 3 sesiones de punción con aguja (PA), no se observaron cambios reseñables en las características histológicas del colágeno ni la presencia de células inflamatorias, destacando solamente la presencia de algún vaso sanguíneo aislado (**Figs. 32F y 33 D**).



**Figura 32.** Tinción de secciones del tendón de Aquiles con hematoxilina-eosina en 3 grupos experimentales: C, EPI y PA. (A) Tendón de Aquiles normal; (B-E) tendón de Aquiles normal tratado durante 3 semanas consecutivas con EPI. En la imagen C, la zona del asterisco muestra aumentada en (D) un leucocito tipo linfocito, y la zona con 2 asteriscos muestra aumentada en (E) un leucocito tipo monocito. (F) tendón de Aquiles normal tratado durante 3 semanas consecutivas con la técnica de punción. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A-C y F) y 10  $\mu\text{m}$  (D-E).

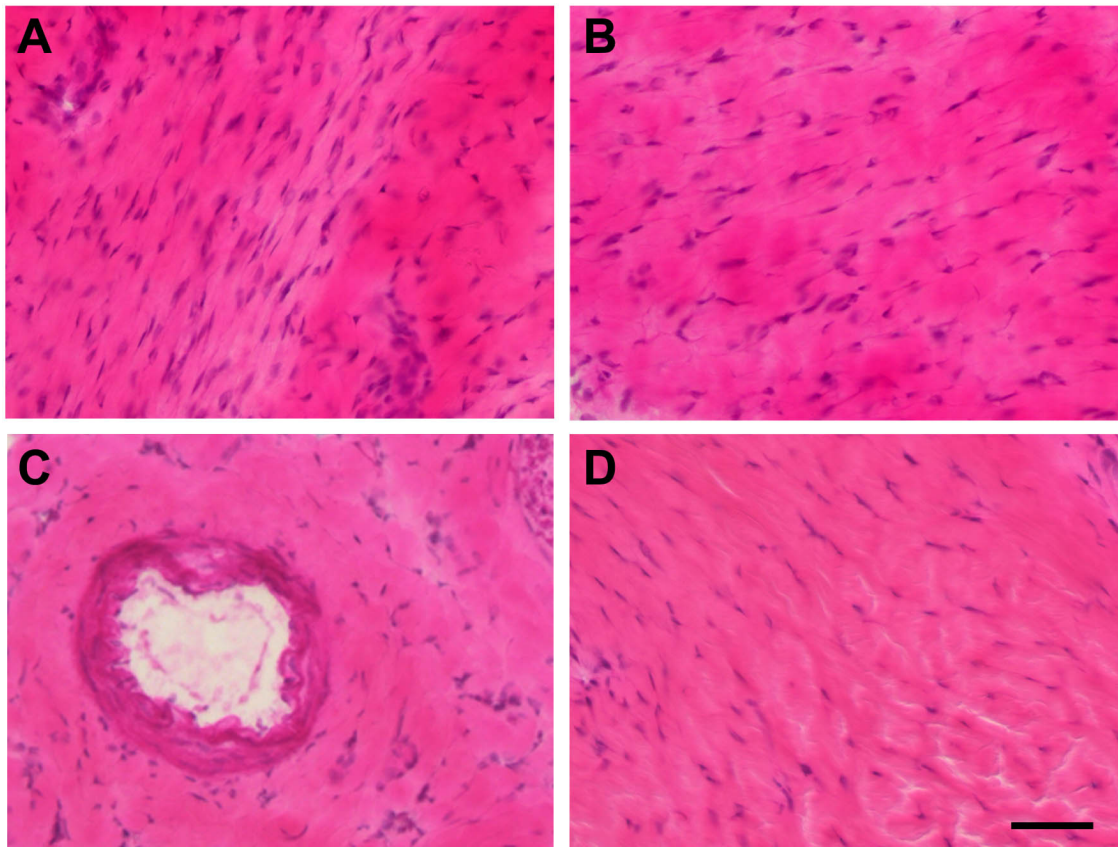




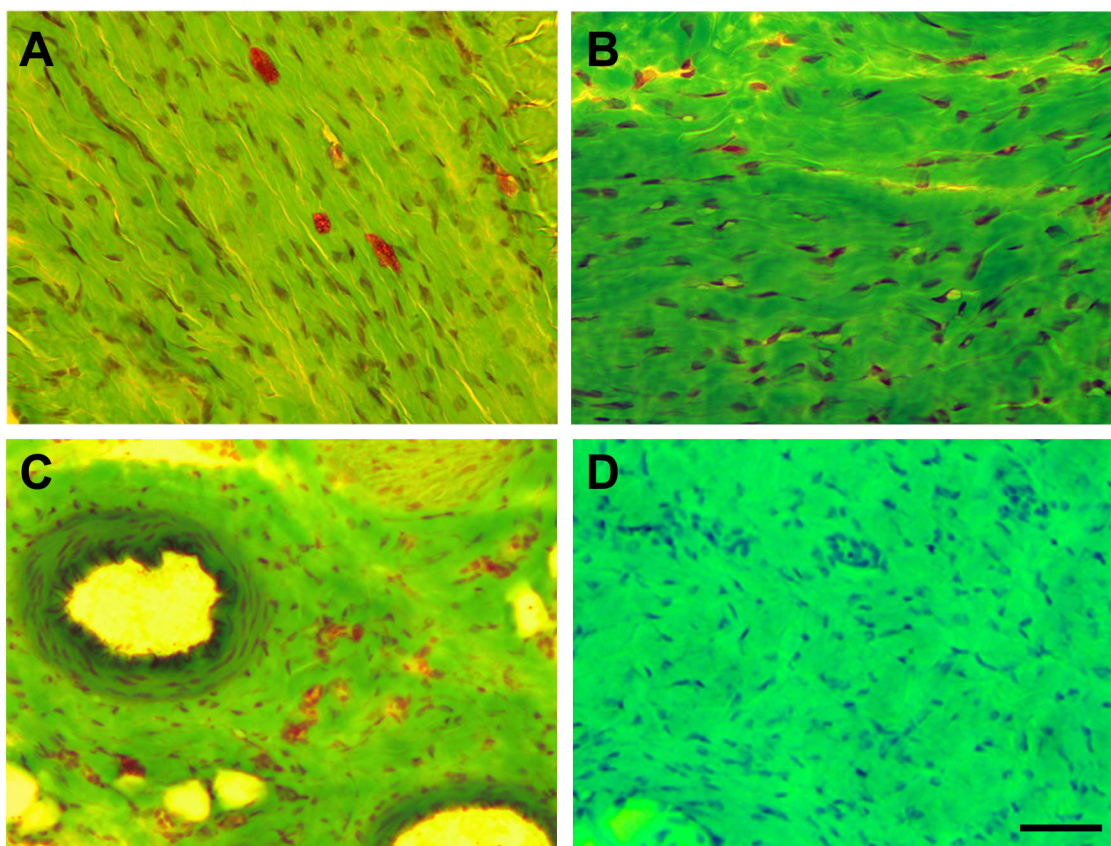
**Figura 33.** Tinción de las secciones del tendón de Aquiles con Safranina O en 3 grupos experimentales: C, EPI y PA. (A) Tendón de Aquiles normal; (B-C) tendón de Aquiles normal tratado durante 3 semanas consecutivas con EPI; (D) tendón de Aquiles normal tratado durante 3 semanas consecutivas con la técnica de punción. La barra de escala es 50  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. 1T vs. 1T+EPI vs. 1T+PA

El análisis de las imágenes obtenidas, con el mismo tipo de tinciones mencionadas anteriormente, en este tipo de comparación demostró que, una única sesión de tratamiento con EPI una semana post-inyección de colagenasa (1T+EPI), no producía un cambio especialmente significativo sobre las características histológicas del colágeno ni sobre el aumento de la vascularización que mostraba el grupo de ratas con tendinopatía que no había recibido tratamiento (1T) ya que, en ambos grupos experimentales, se apreciaba la desalineación de las fibras de colágeno y la neoangiogénesis (*Figs. 34A-C; 35A-C*). Sin embargo, sí se objetivó en el grupo 1T+EPI la presencia de células inflamatorias, células que no estaban presentes en el grupo 1T. Por su parte, no se observaron diferencias histológicas apreciables entre el grupo de ratas con tendinopatía tratadas con una única sesión de punción con aguja (1T+PA) respecto al grupo 1T (*Figs. 34A, D; 35A, D*).



**Figura 34.** Tinción de secciones del tendón de Aquiles con hematoxilina-eosina en 3 grupos experimentales: 1T, 1T+EPI y 1T+PA. (A) Tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana; (B-C) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana y tratado con una sola sesión de EPI; (D) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana y tratado con una sola sesión de punción con aguja. La barra de escala es 50  $\mu\text{m}$ .

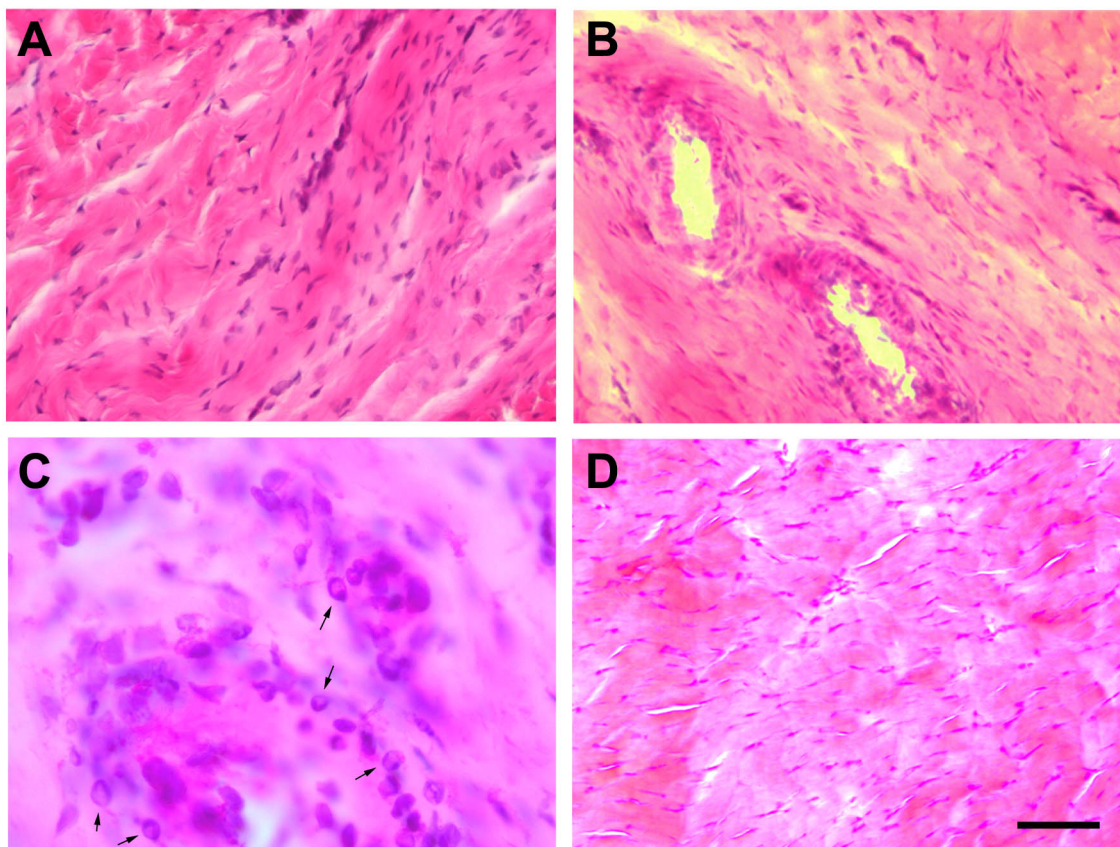


**Figura 35.** Tinción de las secciones del tendón de Aquiles con Safranina O en 3 grupos experimentales: 1T, 1T+EPI y 1T+PA. (A) Tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana; (B-C) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de una semana y tratado con una sola sesión de EPI; (D) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa y después de una semana tratado con una sola sesión de punción con aguja. La barra de escala es 50  $\mu\text{m}$ .

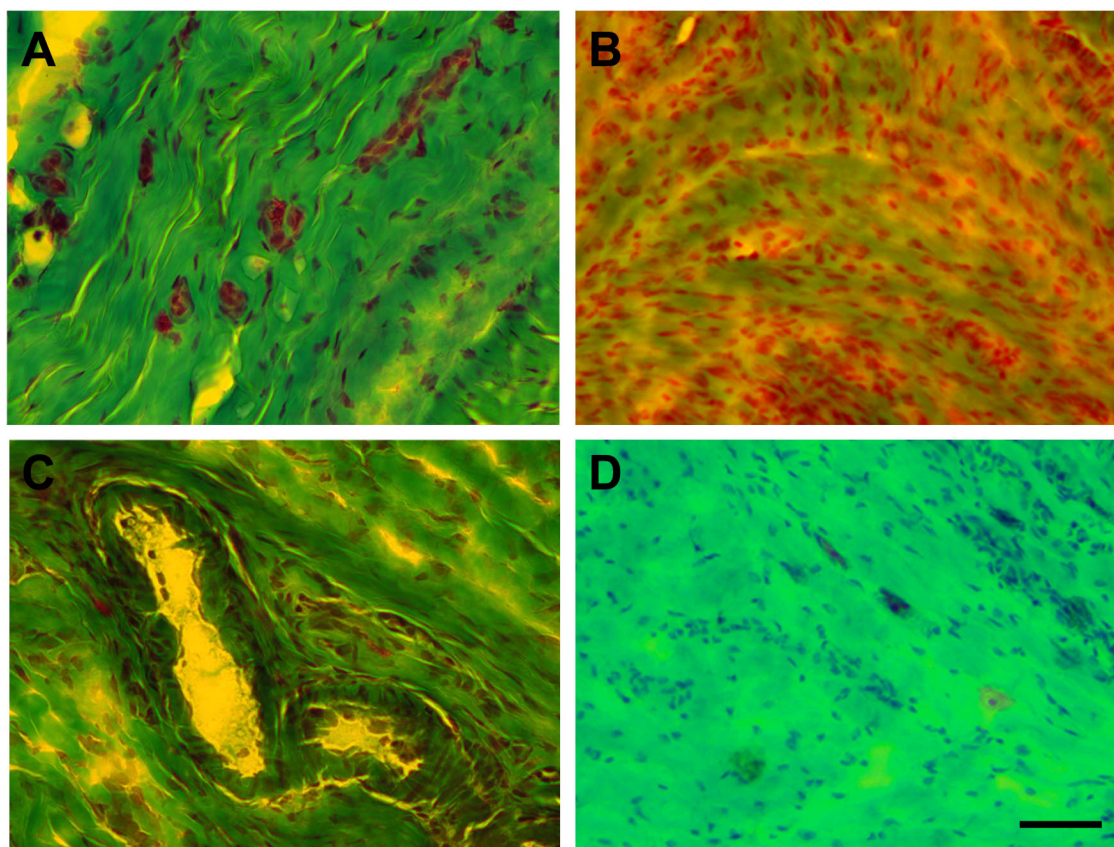
#### 1.4. 2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA

En primer término, en el análisis al microscopio de las muestras con tinción de hematoxilina-eosina y con safranina O del grupo 2T (animales con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con la inyección de colagenasa en el primer día de experimentación y sacrificados a la cuarta semana) se observó un notable incremento del número de células (tenocitos), una pérdida de organización de la ECM con desalineación de las fibras de colágeno y una marcada neovascularización (**Figs. 36A; 37A**). Por consiguiente, estos hallazgos se correspondían a una imagen histológica compatible con una desorganización y degeneración tendinosa sin signos inflamatorios.

Por otra parte, el análisis comparativo de las muestras histológicas del mencionado grupo experimental (2T) respecto a las del grupo de tendones de Aquiles con tendinopatía post-inyección de colagenasa tratados con EPI durante 3 semanas consecutivas (2T+EPI) y las del grupo tratado, en los mismos tiempos, únicamente con punción con aguja (2T+PA), mostró que, a nivel histológico, no se apreciaban cambios significativos en las características generales de las fibras de colágeno ni sobre el aumento de la vascularización en el grupo 2T+EPI ni en el grupo 2T+PA, respecto al grupo 2T. Pero cabe destacar, la presencia únicamente en el primero de los grupos (2T+EPI) de marcados signos inflamatorios, en concreto, de células tipo leucocitos (*Figs. 36B-C; 37B-C*). Además, en dicho grupo, eran detectables los sitios de inyección del tratamiento con EPI (*Figs. 36B; 37C*).



**Figura 36.** Tinción de secciones del tendón de Aquiles con hematoxilina-eosina en 3 grupos experimentales: 2T, 2T+EPI y 2T+PA. (A) Tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de un mes; (B-C) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa y después tratado con EPI durante 3 semanas consecutivas. En la imagen C se muestra con flechas algunas células tipo leucocitos detectadas, (D) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa y después tratado con punción durante 3 semanas consecutivas. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  (A-B, D) y 20  $\mu\text{m}$  (C).



**Figura 37.** Tinción de las secciones del tendón de Aquiles con Safranina O en 4 grupos experimentales: 2T, 2T+EPI y 2T+PA. (A) Tendón de Aquiles inyectado con colagenasa después de un mes; (B-C) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa y después tratado con EPI durante 3 semanas consecutivas; (D) tendón de Aquiles inyectado con colagenasa y después tratado con punción durante 3 semanas consecutivas. La barra de escala es 50  $\mu\text{m}$ .

## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Previo a la presentación de los resultados obtenidos en el análisis de las variaciones de expresión de los genes mostradas entre los distintos grupos experimentales sometidos a estudio, una breve reseña de los siete genes elegidos en los estudios a realizar en esta tesis doctoral.

- Ciclooxygenasa 2 (**Cox2**): es un importante mediador de los procesos inflamatorios e inductor de la expresión de proteínas como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP);

- **Mmp2, Mmp9, Col1a1 y Col3a1**: son 4 componentes claves en la ECM de los tendones;
- Factor de crecimiento endotelial vascular (**Vefg**): es un potente estimulador de la angiogénesis y de la permeabilidad vascular;
- Esclerasis (**Scx**): es un gen clave en el desarrollo embrionario de los tenocitos y, en la edad adulta, también en los procesos de remodelación del tendón.

En primer lugar, analizando la expresión génica de estos genes seleccionados empleando los resultados obtenidos con la técnica de RT-qPCR, se demostró que el tendón de Aquiles, independientemente de su estado u opción de tratamiento, expresaba todos estos genes (**Figs. 38-41**). Seguidamente se indican los resultados obtenidos del análisis exhaustivo de las comparativas anteriormente citadas.

### 2.1. C vs. 1T

Como se puede observar en la **Figura 38**, en el grupo de ratas tendinopáticas una semana después de la inyección de colagenasa (1T) se detectó un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de todos los genes a estudio (*Cox2, Mmp2, Mmp9, Col1a1, Col3a1, Vefg y Scx*) en comparación con la expresión obtenida en el grupo control (C) (ver también los datos numéricos en la **Tabla 3**).

### 2.2. C vs. EPI vs. PA

Analizando los niveles de expresión génica del grupo de ratas con tendón de Aquiles sano que recibieron tratamiento con EPI frente a los niveles del grupo que no recibió tratamiento alguno (EPI vs. C), se demuestra que el tratamiento con EPI produce un incremento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *Cox2, Mmp9, Col1a1, Col3a1 y Scx* (**Fig. 39A, C-E, G; Tabla 4**). Por otra parte, *Mmp2 y Vefg* también presentaban un incremento de su expresión, aunque no era estadísticamente significativo (**Fig. 39B, F; Tabla 4**).

En el caso de la comparativa del efecto génico que se produjo en los tendones sanos tratados con EPI respecto al grupo tratado con punción con aguja (EPI vs. PA), se detectó que los genes *Cox2, Mmp9, Col1a1, Col3a1 y Scx* estaban sobreexpresados

significativamente en el grupo EPI (**Fig. 39 A, C-E, G; Tabla 4**). En el caso de *Mmp2*, su nivel de expresión también estaba incrementado, aunque no era estadísticamente significativo (**Fig. 39B; Tabla 4**). Por su parte, en el gen *Vefg* no se apreciaba ningún tipo de variación de su expresión en la misma comparativa (**Fig. 39F; Tabla 4**).

Finalmente, la comparación del grupo de ratas con tendones sanos respecto al grupo tratado con punción (C vs. PA) mostró que, en el grupo tratado con la punción con aguja, los genes *Cox2*, *Mmp2*, *Col3a1* y *Scx* presentaban un incremento de su expresión estadísticamente significativo; no obstante, este incremento no era tan alto como el que se presentaba en el caso del tratamiento con EPI (**Fig.39A-B, E, G; Tabla 4**). *Mmp9*, *Col1a1* y *Vegf* también presentaban un ligero incremento en la misma comparativa, pero sin significación estadística (**Fig.39C-D, F; Tabla 4**).

### 2.3. 1T vs. 1T+EPI vs. 1T+PA

Las ratas con tendinopatía tratadas con EPI durante una única sesión una semana después de la inyección de colagenasa (1T+EPI) mostraron unos niveles de expresión estadísticamente significativos de *Vefg* y *Scx*, aumentados y disminuidos, respectivamente, respecto a los detectados en el grupo tendinopático sin tratar (1T+EPI vs. 1T) (**Fig. 40F-G; Tabla 5**). Asimismo, en la misma comparativa, los niveles de expresión de *Cox2* y *Mmp2* también se detectaron aumentados y disminuidos, respectivamente, aunque estas variaciones no fueron estadísticamente significativas ( $p$  valor: 0.052 y 0.06, respectivamente) (**Fig. 40A-B; Tabla 5**). Finalmente, tampoco hubo cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión génica de *Mmp9*, *Col1a1* y *Col1a3* en esta primera comparativa (**Fig. 40C-E; Tabla 5**).

Por otra parte, analizando la comparativa de los niveles de expresión de los 7 genes a estudio entre el grupo tendinopático tratado con EPI una semana post-inyección de colagenasa (1T+EPI) y el tratado, del mismo modo, con una única sesión de punción con aguja (1T+PA), se determinó un incremento de la expresión de *Cox2* y *Vefg* a favor del grupo 1T+EPI, aunque sólo el segundo de ellos fue estadísticamente significativo ( $p$  valor 0.059 y  $< 0.001$ , respectivamente) (**Fig. 40A, F; Tabla 5**). Por el contrario, en esta misma comparación, mostraron un descenso estadísticamente significativo los valores de *Mmp2* y *Scx* en las ratas tratadas con EPI respecto a la

tratadas con la punción con aguja (1T+EPI vs. 1T+PA) (**Fig. 40B, G; Tabla 5**). El resto de los genes (*Mmp9*, *Col1a1* y *Col3a1*) estaban ligeramente desregulados, pero ninguno lo estaba estadísticamente significativos (**Fig. 40C-E; Tabla 5**).

Finalmente, la comparativa de las ratas con tendinopatía tratadas con la punción con aguja (1T+PA) respecto a las no tratadas (1T) mostró que no había ningún tipo de variación de expresión en ninguno de los genes estudiados (**Fig. 40; Tabla 5**).

#### 2.4. 2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA

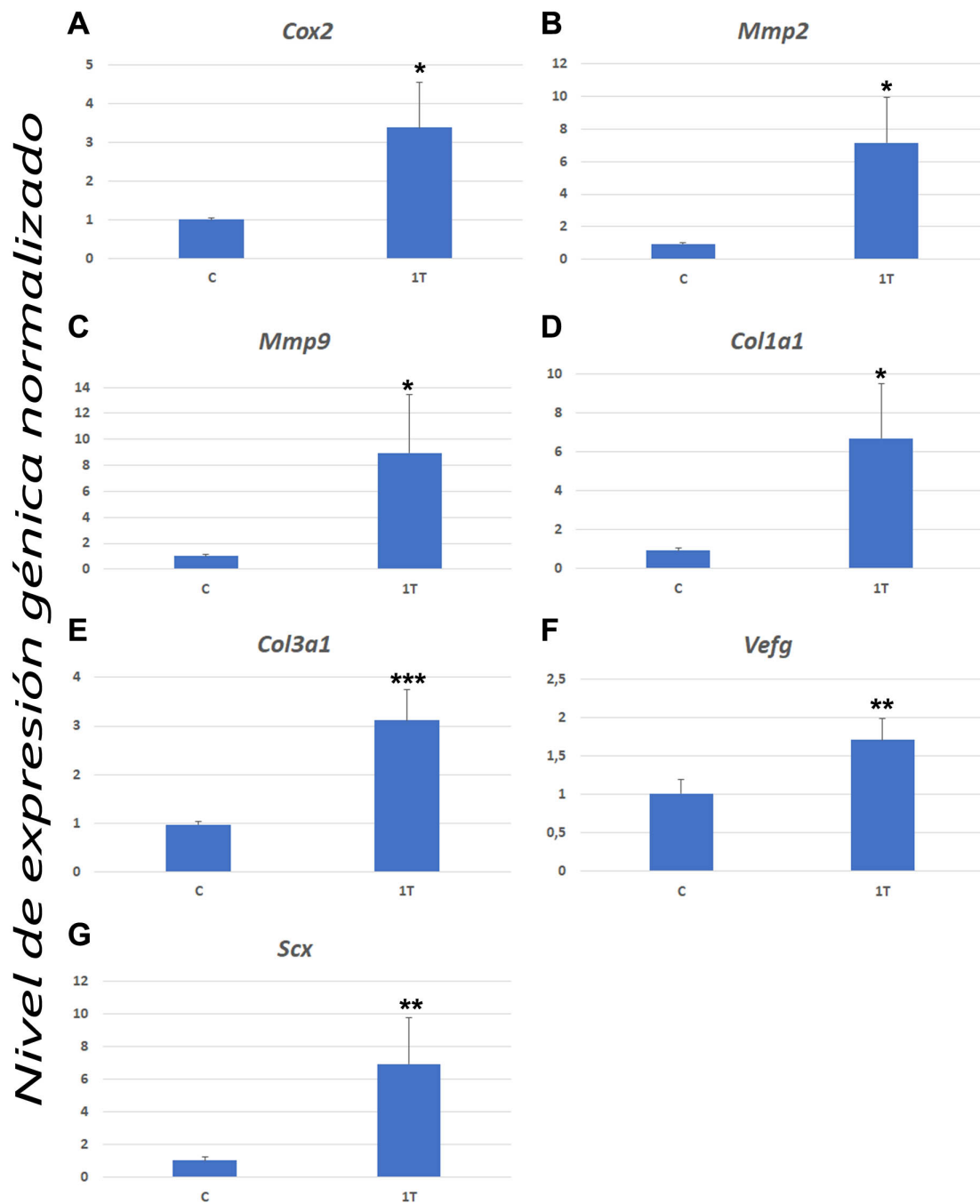
En la comparación del grupo con tendinopatía tratado con EPI durante el mismo tiempo y forma respecto al mismo grupo patológico que no había recibido tratamiento alguno (2T+EPI vs. 2T) se detecta que los genes *Cox2*, *Mmp9* y *Vefg* estaban sobreexpresados estadísticamente en el grupo tratado con EPI con respecto al grupo no tratado (2T) (**Fig. 41A, C, F; Tabla 6**). También, en esta misma comparación, *Mmp2*, *Col1a1*, *Col1a3* y *Scx* presentaban incrementados sus niveles de expresión, aunque no eran estadísticamente significativos ( $p$  valor 0.079, 0.071, 0.067 y 0.469 respectivamente) (**Fig. 41B, D, E, G; Tabla 6**).

Analizando la comparación entre el grupo con tendinopatía tratado durante 3 semanas consecutivas con punción con aguja frente a la misma patología no tratada (2T+PA vs. 2T), los niveles de expresión de *Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1* y *Vefg* estaban incrementados estadísticamente significativos al ser tratados con la punción en comparación a no serlo (**Fig. 41B, C, D, F; Tabla 6**). Por su parte, *Cox2* también presentaba este tipo de variación, aunque su desregulación no era estadísticamente significativa ( $p$  valor de 0.0531) (**Fig. 41A; Tabla 6**). En el caso de los genes *Col3a1* y *Scx* se demuestra que no hay ningún tipo de variación en sus niveles de expresión (**Fig. 41E, G; Tabla 6**).

Finalmente, la comparación del grupo de ratas con tendinopatía tratadas con EPI o con punción con aguja durante 3 semanas consecutivas (2T+EPI vs. 2T+PA) mostró que las expresiones de *Mmp9*, *Col3a1* y *Vefg* estaban incrementadas en el caso del tratamiento con EPI frente al de PA (**Fig. 41C, E-F**); no obstante, sólo las variaciones génicas de *Mmp9* y *Col3a1* eran estadísticamente significativas,  $p$  valor de 0.021 y 0.006,



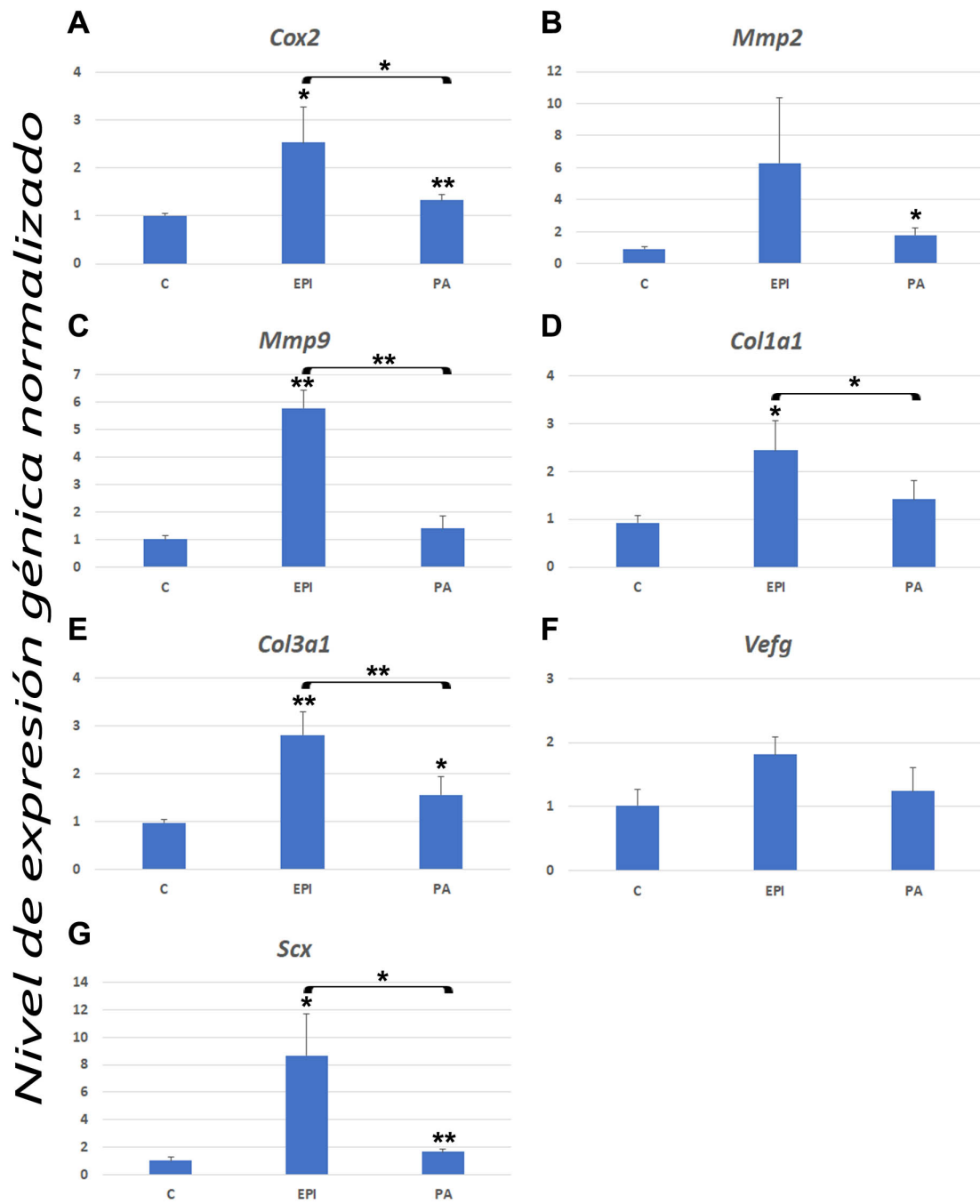
respectivamente, frente al caso de *Vegf* con un p valor de 0.058 (**Tabla 6**). En este tipo de comparación, el resto de los genes estudiados (*Cox2*, *Mmp2*, *Col1a1* y *Scx*) presentaban también ligeros incrementos en su expresión, pero no eran estadísticamente significativos (**Fig. 4.1A-B, D, G; Tabla 6**).



**Figura 38.** Análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 2 grupos experimentales: C y 1T. Los niveles de expresión se cuantificaron empleando la técnica de RT-qPCR, utilizando el modelo de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y normalizando los datos frente al nivel de expresión obtenido del gen *Gapdh*. Cada barra representa fold change (FC)  $\pm$  desviación estándar (D.E.). Los datos estadísticos se obtuvieron mediante análisis con el test t-Student y los valores de p estadísticamente significativos fueron: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

	<b>G.E.</b>	<b>FC</b>	<b>D.E.</b>	<b>p valor</b>
<b>Cox2</b>	<b>C</b>	1,001	0,049	
	<b>1T</b>	3,367	1,184	<i>2,82E-02</i>
<b>Mmp2</b>	<b>C</b>	0,941	0,106	
	<b>1T</b>	7,137	2,783	<i>2,12E-02</i>
<b>Mmp9</b>	<b>C</b>	1,004	0,128	
	<b>1T</b>	8,972	4,478	<i>1,66E-02</i>
<b>Col1a1</b>	<b>C</b>	0,923	0,158	
	<b>1T</b>	6,691	2,801	<i>2,62E-02</i>
<b>Col3a1</b>	<b>C</b>	0,967	0,062	
	<b>1T</b>	3,119	0,631	<i>4,31E-04</i>
<b>Vefg</b>	<b>C</b>	1,011	0,183	
	<b>1T</b>	1,708	0,274	<i>1,01E-02</i>
<b>Scx</b>	<b>C</b>	1,023	0,221	
	<b>1T</b>	6,935	2,851	<i>3,90E-03</i>

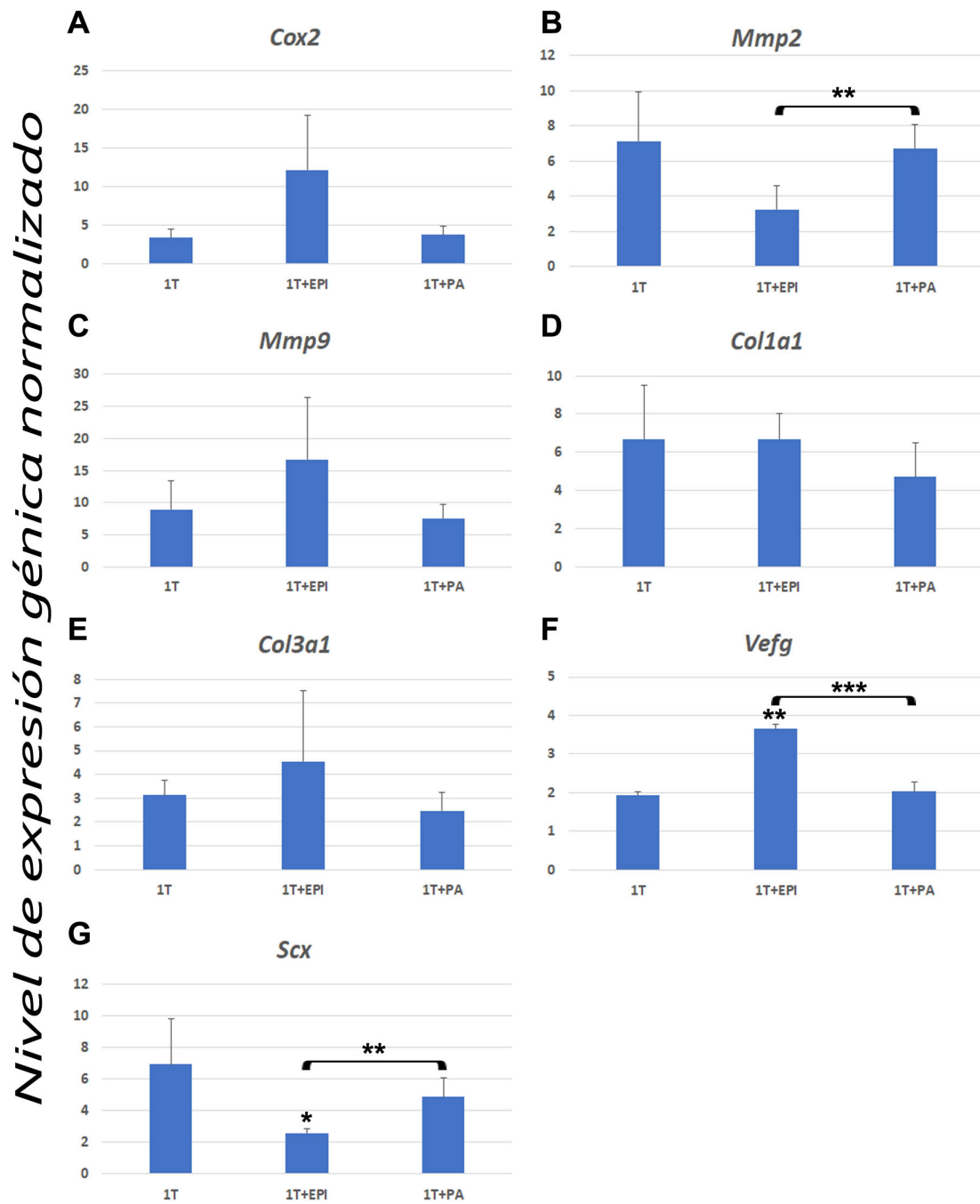
**Tabla 3.** Datos obtenidos del análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 2 grupos experimentales: C y 1T. Abreviaturas: grupos experimentales (G.E.), fold change (FC); desviación estándar (D.E.) y los valores estadísticos de p en la comparativa.



**Figura 39.** Análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 3 grupos experimentales: C, EPI y PA. Los niveles de expresión se cuantificaron empleando la técnica de RT-qPCR, utilizando el modelo de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y normalizando los datos frente al nivel de expresión obtenido del gen *Gapdh*. Cada barra representa fold change (FC)  $\pm$  desviación estándar (D.E.). Los datos estadísticos se obtuvieron mediante análisis con el test t-Student y los valores de p estadísticamente significativos fueron: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

	G.E.	FC	D.E.	p valor C vs.	p valor EPI vs.
<b>Cox2</b>	C	1,001	0,049		
	EPI	2,525	0,740	2,62E-02	
	PA	1,323	0,127	1,12E-02	4,91E-02
<b>Mmp2</b>	C	0,941	0,106		
	EPI	6,293	4,100	1,52E-01	
	PA	1,782	0,461	1,22E-02	1,98E-01
<b>Mmp9</b>	C	1,004	0,128		
	EPI	5,759	0,650	6,46E-03	
	PA	1,395	0,451	1,95E-01	2,15E-03
<b>Col1a1</b>	C	0,923	0,158		
	EPI	2,437	0,622	1,02E-02	
	PA	1,412	0,397	6,72E-02	3,53E-02
<b>Col3a1</b>	C	0,967	0,062		
	EPI	2,806	0,493	5,23E-03	
	PA	1,552	0,380	2,90E-02	5,78E-03
<b>Vefg</b>	C	1,017	0,258		
	EPI	1,815	0,266	9,31E-02	
	PA	1,244	0,356	4,17E-01	1,04E-01
<b>Scx</b>	C	1,023	0,221		
	EPI	8,655	3,041	1,53E-02	
	PA	1,643	0,241	1,59E-03	1,93E-02

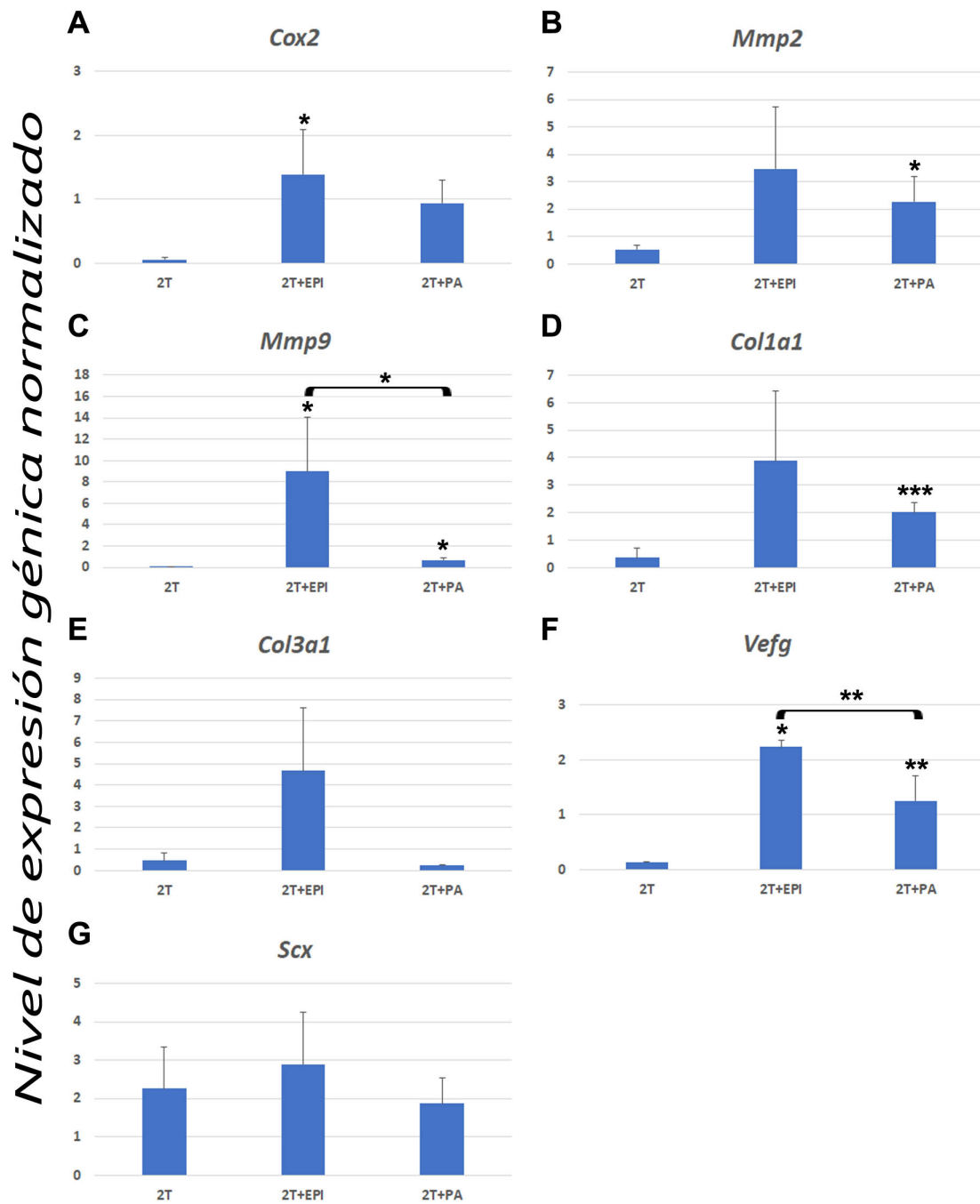
**Tabla 4.** Datos obtenidos del análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 3 grupos experimentales: C, EPI y PA. Abreviaturas: grupos experimentales (G.E.), fold change (FC); desviación estándar (D.E.) y los valores estadísticos de p en las distintas comparativas.



**Figura 40.** Análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 4 grupos experimentales: 1T, 1T+EPI y 1T+PA. Los niveles de expresión se cuantificaron empleando la técnica de RT-qPCR, utilizando el modelo de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y normalizando los datos frente al nivel de expresión obtenido del gen *Gapdh*. Cada barra representa fold change (FC)  $\pm$  desviación estándar (D.E.). Los datos estadísticos se obtuvieron mediante análisis con el test t-Student y los valores de p estadísticamente significativos fueron: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ .

	<b>G.E.</b>	<b>FC</b>	<b>D.E.</b>	<b>p valor 1T vs.</b>	<b>p valor 1T+EPI vs.</b>
<b>Cox2</b>	<b>1T</b>	3,367	1,184		
	<b>1T+EPI</b>	12,156	7,098	5,29E-02	
	<b>1T+PA</b>	3,763	1,134	6,47E-01	5,98E-02
<b>Mmp2</b>	<b>1T</b>	7,137	2,783		
	<b>1T+EPI</b>	3,270	1,312	6,05E-02	
	<b>1T+PA</b>	6,725	1,366	8,04E-01	7,28E-03
<b>Mmp9</b>	<b>1T</b>	8,972	4,478		
	<b>1T+EPI</b>	16,720	9,614	2,11E-01	
	<b>1T+PA</b>	7,546	2,266	5,49E-01	1,59E-01
<b>Col1a1</b>	<b>1T</b>	6,691	2,801		
	<b>1T+EPI</b>	6,680	1,345	9,94E-01	
	<b>1T+PA</b>	4,711	1,789	2,74E-01	1,02E-01
<b>Col3a1</b>	<b>1T</b>	3,119	0,631		
	<b>1T+EPI</b>	4,539	2,997	3,08E-01	
	<b>1T+PA</b>	2,468	0,771	1,69E-01	1,54E-01
<b>Vefg</b>	<b>1T</b>	1,940	0,089		
	<b>1T+EPI</b>	3,654	0,117	3,66E-03	
	<b>1T+PA</b>	2,025	0,263	5,91E-01	4,69E-04
<b>Scx</b>	<b>1T</b>	6,935	2,851		
	<b>1T+EPI</b>	2,573	0,292	1,37E-02	
	<b>1T+PA</b>	4,877	1,226	1,48E-01	4,47E-03

**Tabla 5.** Datos obtenidos del análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 3 grupos experimentales: 1T, 1T+EPI y 1T+PA. Abreviaturas: grupos experimentales (G.E.), fold change (FC); desviación estándar (D.E.) y los valores estadísticos de p en las distintas comparativas.



**Figura 41.** Análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 4 grupos experimentales: 2T, 2T+EPI y 2T+PA. Los niveles de expresión se cuantificaron empleando la técnica de RT-qPCR, utilizando el modelo de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y normalizando los datos frente al nivel de expresión obtenido del gen *Gapdh*. Cada barra representa fold change (FC)  $\pm$  desviación estándar (D.E.). Los datos estadísticos se obtuvieron mediante análisis con el test t-Student y los valores de p estadísticamente significativos fueron: \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01; \* p < 0.05.



	G.E.	FC	D.E.	p valor 2T vs.	p valor 2T+EPI vs.
<b>Cox2</b>	2T	0,056	0,031		
	2T+EPI	1,392	0,697	3,14E-02	
	2T+PA	0,937	0,365	5,31E-02	3,14E-01
<b>Mmp2</b>	2T	0,523	0,163		
	2T+EPI	3,468	2,251	7,97E-02	
	2T+PA	2,275	0,911	3,23E-02	3,82E-01
<b>Mmp9</b>	2T	0,040	0,006		
	2T+EPI	8,977	5,069	1,69E-02	
	2T+PA	0,658	0,225	1,20E-02	2,15E-02
<b>Col1a1</b>	2T	0,364	0,345		
	2T+EPI	3,875	2,547	7,13E-02	
	2T+PA	2,009	0,336	3,16E-05	2,41E-01
<b>Col3a1</b>	2T	0,452	0,348		
	2T+EPI	4,654	2,972	6,70E-02	
	2T+PA	0,219	0,026	1,65E-01	5,84E-02
<b>Vefg</b>	2T	0,133	0,001		
	2T+EPI	2,229	0,117	2,51E-02	
	2T+PA	1,248	0,462	5,73E-03	6,98E-03
<b>Scx</b>	2T	2,256	1,087		
	2T+EPI	2,886	1,373	4,76E-01	
	2T+PA	1,860	0,672	4,69E-01	2,37E-01

**Tabla 6.** Datos obtenidos del análisis de los niveles de expresión de 7 genes en 3 grupos experimentales: 2T, 2T+EPI y 2T+P. Abreviaturas: grupos experimentales (G.E.), fold change (FC); desviación estándar (D.E.) y los valores estadísticos de p en las distintas comparativas.



# V. DISCUSIÓN



## 1. EFECTIVIDAD DE LA INDUCCIÓN DE LA TENDINOPATÍA

En primer lugar, el punto de partida de la investigación llevada a cabo en esta tesis doctoral fue el comprobar si la inyección de colagenasa realizada había sido efectiva en la inducción de una tendinopatía en el tendón de Aquiles de la rata.

En este contexto, es necesario fijar que es ampliamente conocido que en las tendinopatías por sobreuso se produce un fallo funcional de adaptación a la carga correlacionado con una degradación tisular y celular [165, 166]. Se produce un desequilibrio en la expresión y contenido de las MMPs, se altera la formación de colágeno, con una disposición desorganizada y al azar [4, 27, 167], y se desarrolla una hipervascularidad con nuevos vasos en un intento fallido de aumentar el aporte de oxígeno y nutrientes [4, 170]. Asimismo, Riley (1994) [374] y otros investigadores como Jelinsky y cols. (2011) [375] han observado que muestras de tendones con tendinopatía presentaban hiper celularidad y ausencia de células inflamatorias.

Por otra parte, la bibliografía disponible cuenta con diversos estudios que reportan análisis de variaciones de expresión génica en muestras de tendones degenerados en humanos. Así, Riley (1994) [374] comprobó en muestras obtenidas en el quirófano de tendones con tendinopatía la presencia de un aumento significativo en la expresión de los genes de colágeno *COL1A1* y *COL3A1*. Posteriormente, otras publicaciones mostraron resultados coincidentes y, además, detectaron también un aumento significativo de la expresión de algunas MMPs de ECM, como las gelatinasas *MMP2* y *MMP9*, encargadas de degradar fragmentos de colágeno, desnaturalizándolo [180, 374-384].

En el estudio de las tendinopatías, ante las evidentes limitaciones para la obtención de muestras en humanos, la alternativa es la utilización de un modelo animal validado que permita profundizar más en su etiología, en sus fases incipientes y en los mecanismos moleculares de esta patología. En estos modelos, las tendinopatías se pueden inducir mediante 2 procedimientos, produciendo una sobrecarga mecánica extrínseca o mediante la introducción en el tendón no patológico del animal de sustancias químicas registradas en muestras humanas con tendinopatías, como son: la

enzima colagenasa, las citoquinas y/o las prostaglandinas [352]. El primero de los procedimientos, la inducción con sobrecarga mecánica, habitualmente realizada con cinta de correr forzada, no ha demostrado un éxito universal en el modelo animal de tendinopatía, tal vez porque la carga mecánica no sea el único factor que conduce a este tipo de lesión tendinosa [359, 362]. Por ello, para la realización de este trabajo se decidió usar el modelo de inducción de una lesión tendinosa con colagenasa que, como se mencionó anteriormente, es una metaloproteinasa con una gran capacidad de degradación del colágeno de la ECM, generando en el tendón unas características estructurales, histológicas y moleculares, similares a las observadas en las tendinopatías humanas. En concreto, la inyección de esta enzima en tendones no patológicos de rata produce una degeneración y distorsión de la arquitectura del tendón junto con una desregulación de la expresión de genes relacionados con la ECM como, por ejemplo, los que codifican los distintos tipos de colágeno [17, 180, 253, 374-391].

De este modo, en esta tesis doctoral, se aplicó una inyección de la enzima colagenasa en el tendón de Aquiles sano de 6 grupos experimentales de ratas (1T, 1T+EPI, 1T+PA, 2T, 2T+EPI y 2T+PA), siendo el grupo más representativo que determinó claramente el efecto que se producía tras esta inyección el grupo 1T, animales con una tendinopatía en el tendón de Aquiles inducida con esta inyección de colagenasa el primer día de experimentación y sacrificados a la semana. Por consiguiente, a nivel histológico, tanto con hematoxilina-eosina como con safranina O, los análisis de muestras representativas de este grupo experimental en comparación a las del grupo control mostraron notables cambios; así, en el grupo patológico se observó una desaparición del patrón celular organizado de tenocitos perfectamente alineados con respecto al eje longitudinal y empaquetados entre los haces de colágeno presente en un tendón sano, mostrándose también unos daños tisulares significativos, como la hiper celularidad, una apreciable desalineación de las fibras de colágeno y un incremento de la vascularización (hipervascularización). Estos cambios histopatológicos coinciden con los presentados en diversos estudios, cuyo modelo de tendinopatía muestra en el tendón patológico un incremento en la celularidad,

desorganización del conectivo denso regular que lo conforma y aumento en la formación de vasos sanguíneos [385, 391-393].

Por otra parte, los análisis de las variaciones de expresión génica detectadas en el grupo tendinopático, demostraron que en muestras del grupo 1T había un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los genes analizados en este trabajo (*Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Vefg* y *Scx*; **Fig. 38; Tabla 3**), resultado que coincide con el patrón de expresión de esta serie de genes en las tendinopatías en humanos [17, 253, 385-391]. Las gelatinasas *Mmp2* y *9* son enzimas encargadas de degradar los fragmentos de colágeno desnaturalizado más pequeños liberados por la actividad de la enzima colagenasa, y éstas muestran aumentada su expresión favoreciendo la degradación tisular de la ECM [50]. Por su parte, Davis y cols. (2013) [52] propusieron que la sobreexpresión de estas gelatinasas podría ser perjudicial en la curación de las tendinopatías, ya que, sobre todo la *Mmp9*, podría tener un papel importante como inhibidor de la regeneración del tendón en este tipo de patologías. Respecto a los genes que codifican los distintos tipos de colágeno, la sobreexpresión de *Col1a1*, pero sobre todo la de *Col3a1*, se correlacionan con la pérdida de organización de la ECM presente en estas lesiones tendinosas. Por su parte, el incremento de los niveles de expresión de *Vefg* se relaciona con la hipervascularidad presente en las tendinopatías basada en la presencia de nuevos vasos sanguíneos, pero, descritos por los autores como no funcionales [4, 44, 170-173].

En definitiva, los resultados obtenidos tanto a nivel histológico como molecular en la comparativa del grupo experimental 1T frente a su control ponen de manifiesto el éxito de la inducción de la tendinopatía con la enzima colagenasa realizada para este trabajo de investigación y, por lo tanto, nuestro modelo animal para el estudio de la técnica EPI puede ser considerado un modelo válido.

## 2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA EPI EN TENDÓN SANO

Según Sánchez-Ibáñez, creador de la técnica EPI, el flujo de la corriente catódica de la electrolisis produciría una reacción cáustica intratisular en el tejido

tratado que conduciría hipotéticamente a una **respuesta inflamatoria** local y aguda. Así, después de la reacción electroquímica local, tendría lugar un proceso de destrucción del tejido y, tras éste, una respuesta inflamatoria con la aparición de linfocitos polimorfonucleares y mononucleares en el foco de la lesión iatrogénica, fagocitando los productos de desecho causados por la destrucción electroquímica [13, 339].

Al analizar las **imágenes histológicas** del grupo de ratas con tendón de Aquiles sano que recibió tratamiento con EPI, con ambas tinciones, tanto con hematoxilina-eosina (**Fig. 32**) como con safranina O (**Fig. 33**), se objetivó la presencia de infiltrado tisular con células inflamatorias, en concreto, leucocitos tipo linfocitos y monocitos (**Fig. 32C-E**). Este infiltrado de leucocitos es un signo histológico que se manifiesta en las fases iniciales de un proceso inflamatorio [119]. Asimismo, también se observaron nuevos vasos sanguíneos, de pequeño tamaño, correspondientes a neoangiogénesis (**Figs. 32 B-C y 33 B-C**).

Respecto a la valoración de los **niveles de expresión** de los 7 **genes** a estudio del grupo de ratas con tendón de Aquiles sano que recibieron 3 sesiones de tratamiento con la técnica EPI frente al que no recibió tratamiento alguno (EPI vs. C), se muestra que la aplicación de la técnica EPI produce un incremento estadísticamente significativo de la expresión de los genes *Cox2*, *Mmp9*, *Col1a1*, *Col3a1* y *Scx* (**Fig. 39A, C-E, G; Tabla 4**). Por otra parte, *Mmp2* y *Vefg* también presentaban este incremento de su expresión, aunque no era estadísticamente significativo (**Fig.39B, F; Tabla 4**). En este punto, cabe señalar que se determinó la realización de 3 sesiones de EPI ya que los protocolos publicados, en diferentes estudios clínicos de pacientes con tendinopatías por sobreuso tratados con EPI, coinciden en que los mejores resultados se obtienen con este promedio de sesiones por paciente [14-19, 351].

Respecto a los resultados moleculares obtenidos en el estudio, es de destacar el hecho de que corroboran la hipótesis propuesta referente a la respuesta inflamatoria aguda que produce este tipo de terapia. Se ha estudiado, en diferentes modelos animales, el perfil de expresión génica que se produce cuando tiene lugar una respuesta inflamatoria tras una lesión aguda tendinosa, centrándose en la expresión de genes



relacionados con procesos inflamatorios y de mantenimiento de la ECM. Así, Eliasson (2009) [394] mostró que, tras seccionar los tendones de 110 ratas, la expresión de la enzima *Cox2*, gen codificante de una enzima inducible responsable de la producción de prostaglandinas en los procesos inflamatorios [395], al igual que en esta tesis doctoral, también aumentaba significativamente al inicio, descendiendo paulatinamente a partir del duodécimo día post-sección. Estos datos coinciden con los mostrados en otros trabajos publicados, que reportan que tras lesiones agudas tendinosas tiene lugar una sobreexpresión de varios genes proinflamatorios, como son el del factor de necrosis tumoral alfa (*Tnf $\alpha$* ), la interleucina 1 (*Il-1 $\beta$* ) y el propio *Cox2* [396].

Por otra parte, Oshiro (2003) [397] y Manning (2014) [396] analizaron cambios de expresión génica tras seccionar el tendón rotuliano en diferentes modelos animales (canes y ratas) y, ambos estudios, observaron que en las primeras horas del proceso inflamatorio desencadenado tras la sección se detectaba un aumento en la expresión de algunos genes *Mmps*, entre ellos el *Mmp2* y *Mmp9*, del mismo modo que se muestran sobreexpresados en este estudio tras la aplicación de 3 sesiones de EPI. Este patrón está relacionado con la degradación del colágeno que tiene lugar en la ECM tras la lesión.

Respecto a los cambios que tienen lugar en una lesión aguda en la expresión de los genes codificantes de los distintos tipos de colágeno, Loiselle y cols. (2009) [398] evidenciaron niveles altos de expresión del *Col1a1* y *Col3a1* tras la sección y reparación con sutura en el tendón del flexor largo de los dedos en modelos murinos, aumento que podría estar relacionado con la nueva síntesis de colágeno necesaria para lograr una óptima restauración de la arquitectura de la ECM. Estos resultados coinciden con los publicados por Juneja y cols. (2013) [399] en un trabajo de similares características y concuerdan con la sobreexpresión de estos genes mostrada en este trabajo tras las 3 sesiones con EPI en tendones sanos.

Finalmente, en lo concerniente a los procesos de vascularización observados en las lesiones agudas tendinosas de modelos animales, la literatura científica hace hincapié en que los niveles de expresión del gen *Vefg* se incrementan inicialmente de forma significativa, manteniéndose estos niveles al menos durante las 3 semanas

siguientes, argumentando que la razón estaría en la neovascularización necesaria para llevarse a cabo los procesos de cicatrización [396, 400]. En este trabajo, el hecho de no haber sido detectado un incremento estadísticamente significativo en la expresión de este gen tras el tratamiento con EPI (**Fig.39B, F; Tabla 4**) se puede justificar por el insuficiente tamaño de muestra empleado y, se puede hipotetizar que, tal incremento bien pudiera ser estadísticamente significativo si se aumentara el tamaño de muestra, avalando así la formación de nuevos vasos sanguíneos normofuncionales en el proceso de curación del tendón tras someterse a este tipo de terapia.

Por todo lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral en la comparativa EPI vs. C en cuanto a variaciones de expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios postlesión tendinosa, son coincidentes a los obtenidos por los trabajos mencionados [394, 396-400], ya que muestran un perfil génico similar al que se manifiesta en un proceso inflamatorio postlesión tendinosa aguda.

En conclusión, tanto las imágenes obtenidas en el análisis al microscopio de las muestras del tejido del grupo EPI donde se advierte la presencia de un infiltrado tisular con leucocitos tipo linfocitos y monocitos, como el análisis del patrón génico expresado en el grupo EPI, permiten afirmar que la técnica EPI tiene capacidad de desencadenar una respuesta inflamatoria aguda, tal y como defienden su autor, Sánchez-Ibáñez, y otros trabajos publicados [13, 339, 345, 401].

Por otra parte, cabe mencionar que en la terapia EPI se combina la punción con aguja y el paso de la corriente galvánica, es decir, el efecto mecánico propio de la punción más el efecto electroterápico de la corriente. Por consiguiente, la necesidad de diferenciar qué mecanismos fisiológicos se desencadenan por la estimulación mecánica con la aguja y cuáles por el efecto de la corriente galvánica, determinó nuestra metodología de trabajo, justificando la obligatoriedad de hacer un grupo control de punción con aguja (grupo experimental denominado PA). Así, en los análisis histológicos del grupo experimental tratado con 3 sesiones de punción con aguja no se observaron cambios reseñables en las características histológicas del colágeno ni la presencia de células inflamatorias (**Figs. 32F y 33D**). Por su parte, en el análisis

molecular, al comparar el grupo de ratas con tendones sanos respecto al grupo tratado con punción con aguja (C vs. PA) se determinó que algunos de los genes estudiados en este trabajo y expresados en reacciones orgánicas inflamatorias, como *Cox2*, *Mmp2*, *Col3a1* y *Scx* también estaban sobreexpresados, desde el punto de vista estadístico, en el grupo PA, aunque este aumento era notablemente menor que el que se presentaba en el caso del tratamiento con EPI (vs. C) (**Fig. 39A-B, E, G; Tabla 4**). Confrontando estos datos con las publicaciones anteriormente mencionadas [394, 396-400], se aprecia que la punción con aguja también provocaría una respuesta inflamatoria sobre el tejido tratado, pero esta respuesta molecular es mucho menor que la producida por el tratamiento con EPI, extrapoliándose como conclusión, que la causa de tal diferencia residiría en la aplicación de la corriente galvánica. Estos resultados van en la línea de los obtenidos por Valera-Garrido y cols. (2013) [401], donde compararon histológicamente la respuesta orgánica tras la aplicación de la técnica EPI con la respuesta tras la aplicación de punción con aguja en tendones sanos de ratas y concluyeron, mediante análisis histológico, que la técnica EPI provoca una respuesta inflamatoria aguda significativamente mayor que la punción con aguja.

### 3. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA EPI EN TENDÓN CON TENDINOPATÍA

Respecto al análisis de las imágenes al microscopio obtenidas con las tinciones empleadas en este trabajo, hematoxilina-eosina y safranina O, al comparar el grupo con tendinopatía sin tratamiento alguno con el grupo tratado con EPI con una sesión (1T vs. 1T+EPI), se observó que una única sesión de tratamiento con EPI no producía ningún tipo de cambio significativo en las características histológicas del colágeno ni en el grado de vascularización del tejido. En ambos grupos experimentales se mantenía la desalineación de las fibras de colágeno y la neoangiogénesis (**Figs. 34A-C; 35A-C**). Sin embargo, había un cambio muy destacable a nivel celular únicamente presente en el grupo 1T+EPI, y era la presencia de células inflamatorias. Este resultado refuerza el argumento expuesto anteriormente de que la técnica EPI desencadena una reacción inflamatoria aguda tras su aplicación. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias histológicas apreciables entre el grupo de ratas con tendinopatía tratadas

con una única sesión de punción con aguja (1T+PA) respecto al grupo 1T (**Figs. 34A, D; 35A, D**).

Pero en el caso de los análisis de los resultados obtenidos a nivel molecular, éstos demostraron que una única sesión de EPI era capaz de desencadenar una reacción orgánica inflamatoria aguda y una hipervascularización en el tejido tendinopático. Así, los incrementos de expresión de *Cox2* y *Vefg* en muestras del grupo 1T+EPI frente a las del grupo 1T, corroboran la presencia de ambos tipos de reacciones (**Fig. 40A, F; Tabla 5**). A este respecto cabe indicar que la sobreexpresión de *Cox2* no es estadísticamente significativa en los resultados (*p* valor de 0.053), pero parece muy probable que con un incremento del tamaño de muestra sí pudiera lograrse ese mismo tipo de variación, pero con significación estadística. Estos perfiles de expresión coinciden con los publicados por otros autores en procesos inflamatorios en las lesiones tendinosas agudas [394, 396, 398, 400] y refuerzan el argumento expuesto en el apartado anterior referente a que la técnica EPI desencadena una reacción inflamatoria aguda tras su aplicación.

En el caso de los perfiles de expresión génica de *Mmp2* y *Mmp9*, al analizar la misma comparativa (1T+EPI vs. 1T), cabe destacar que se detectaron apreciables desregulaciones, un descenso y un incremento, respectivamente, aunque en ninguna de las 2 variaciones se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (**Fig. 40B-C; Tabla 5**). Asimismo, tanto con el gen *Col1a1* como con el *Col3a1* no se determinó ningún tipo de variación en sus expresiones génicas (**Fig. 40D-E; Tabla 5**). Estos últimos resultados parecen estar en desacuerdo con los obtenidos por otras publicaciones en las que se reportaron sobreexpresiones de *Mmp2*, -3, -9 y -14 [396, 397] y de *Col1a1* [398]. Tal vez la razón de que nuestros resultados no coincidan, esté en que los citados trabajos evidencian cambios en estos genes en el marco de un proceso inflamatorio producido sobre un tendón sano y, en el caso que se enmarca en esta tesis doctoral, se está ante una tendinopatía donde los niveles de *Mmps*, en concreto *Mmp2* y *Mmp9*, y de *Col1a1*, ya estaban sobreexpresados en la comparativa 1T vs. C (**Fig. 38B-D; Tabla 3**), dato de partida que podría ser determinante para explicar que el incremento producido por la reacción inflamatoria en estos genes sea menor (**Fig. 40B-D; Tabla 5**).

La conclusión anterior, deducida mediante el análisis molecular del grupo experimental 1T+EPI frente a 1T, demuestra que la técnica EPI desencadena una reacción inflamatoria aguda tras una única sesión, pero, tal y como se mencionó en anteriores apartados, los protocolos publicados en diferentes estudios clínicos de pacientes con tendinopatías por sobreuso tratados con EPI coinciden en que los mejores resultados se obtienen con un promedio de 3 sesiones por paciente [14-19, 351]. Por lo tanto, con el fin de lograr un mayor paralelismo con la práctica clínica diaria, en esta tesis doctoral se decidió llevar a cabo un estudio más exhaustivo de los cambios, tanto histológicos como moleculares, producidos tras la aplicación de la técnica EPI en el tendón de rata con tendinopatía durante 3 semanas consecutivas (2T+EPI), sacrificando a las ratas al mes de iniciado este tipo de tratamiento, con una sesión semanal, coincidiendo así con los parámetros de periodicidad que llevan a cabo algunos de los autores referenciados [15, 17-19]. A este respecto es de destacar el hecho de que hay discrepancias en la literatura respecto a cuál debe ser la temporalidad entre sesiones. Según Sánchez-Ibáñez [14] y Valera y cols. [17-19], la indicación sería semanal, ya que consideran que a los 7 días ya ha descendido el pico máximo de la primera fase de la respuesta inflamatoria provocada por la EPI. Sin embargo, hay otros autores que defienden la prescripción de una sesión cada 2 semanas, basándose en que, según la fisiopatología del proceso de cicatrización del tejido blando, en este tiempo ya habría un mínimo o nulo infiltrado celular inflamatorio en la zona de aplicación, sumado a que la fase álgica post-punción ya habría desaparecido y se conseguiría una mejor tolerancia del paciente a la técnica [351].

En primer lugar, se describieron el conjunto de características histológicas que se observaron en los análisis de distintas muestras representativas del grupo tendinopático 2T mediante los dos tipos de tinciones empleadas en este trabajo. En éstas, se mostraba un notable incremento del número de células (tenocitos), una pérdida de organización de la ECM con desalineación de las fibras de colágeno y una marcada neovascularización (**Figs. 36A y 37A**), es decir, las imágenes histológicas eran compatibles con una degeneración tendinosa sin signos inflamatorios y características estructurales similares a las descritas en tendones humanos y de modelo de animales con tendinopatía [253, 385, 387-392]. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez

más, el logro de la inducción de la tendinopatía con la enzima colagenasa realizada para este estudio, en este caso analizando exclusivamente muestras del grupo 2T.

En cuanto a los análisis comparativos de las muestras de dicho grupo experimental (2T) con las del grupo con tendinopatía tratado con EPI durante 3 semanas consecutivas (2T+EPI vs. 2T), e incluso con las del grupo tratado durante el mismo tiempo y forma pero con punción con aguja (2T+PA vs. 2T), mostraban que, a nivel histológico, no se apreciaban cambios significativos en las características de la ECM, fundamentalmente en la organización de las fibras de colágeno, ni en el grado de vascularización entre estos grupos experimentales (*Figs.36 y 37*), pero, interesantemente, en distintas muestras del grupo 2T+EPI sí se apreciaba la presencia de leucocitos tipo linfocitos y monocitos, esto es, se objetivaban signos histológicos de procesos inflamatorios (*Figs.36C y 37C*). Una vez más, el hallazgo de células inflamatorias, sólo presentes en los grupos tratados con la técnica EPI (Grupo EPI, Grupo 1T+EPI y Grupo 2T+EPI), reafirma la hipótesis lanzada por el creador de la técnica: la EPI, gracias al efecto provocado por el paso de la corriente galvánica, desencadena una respuesta inflamatoria aguda [339, 342]. Por otra parte, el hecho de no apreciarse cambios histológicos destacables en la comparativa 2T+EPI vs. 2T podría tener su justificación en que el espacio temporal del estudio (4 semanas) no conllevaría suficiente tiempo para poderse visualizar cambios significativos en la estructura global de la ECM y, específicamente, en la estructura y organización del colágeno y en la (neo)vascularización. Para que estos cambios se produzcan y sean tangibles al microscopio, consideramos imprescindible la combinación del estímulo biológico provocado tras la aplicación de la técnica EPI junto con, como sucede en la práctica clínica diaria, trabajo activo que provoque una carga tendinosa suficiente para producir cambios en la estructura del tendón y serían a largo plazo. De hecho, algunos estudios en tendinopatías en humanos sugieren que los cambios macroscópicos que se pueden apreciar en imágenes ecográficas tras tratamiento con EPI de una lesión tendinosa, sobre todo en la organización estructural del colágeno, no se muestran antes de las 20 semanas post-intervención [17-19]. La ampliación del marco temporal de estudio tras la aplicación de la técnica EPI es uno de los proyectos que se pretenden llevar cabo en futuras investigaciones.

Respecto al análisis de los resultados obtenidos a nivel molecular al comparar los grupos 2T+EPI vs. 2T, éste demostró que los genes *Cox2*, *Mmp9* y *Vefg* estaban sobreexpresados de forma estadísticamente significativa en el grupo tratado con EPI (**Fig. 41 A, C, F; Tabla 6**). Además, en esta misma comparación, *Mmp2*, *Col1a1*, *Col1a3* y *Scx* también se presentaban incrementados, aunque no estadísticamente significativos (**Fig. 41 B, D, E, G; Tabla 6**), pero parece muy probable que con un incremento del tamaño de muestra sí se pudieran obtener sobreexpresiones estadísticamente significativas de estos genes (*p* valores de 0.79, 0.71 y 0.67, respectivamente; **Tabla 6**).

Seguidamente, y dada la importancia de las comparativas de este apartado 2T vs. 2T+EPI vs. 2T+PA, se discuten detalladamente los análisis de los resultados obtenidos, desglosando las distintas implicaciones que conllevarían las variaciones de expresión descritas para cada uno de los genes estudiados en esta tesis doctoral.

#### Cyclo-oxigenase 2 (*Cox2*)

Como se acaba de indicar, la regulación positiva de *Cox2* en la comparativa 2T+EPI vs. 2T (**Fig. 41A; Tabla 6**) pone de manifiesto una vez más la relación entre la electrolisis y una reacción inflamatoria aguda, relación que fue corroborada por el grupo de Gravante y cols. (2010) [402]. Hay que destacar a este respecto que la enzima *Cox2* está implicada de forma directa con los procesos de cicatrización, y su sobreexpresión génica es parte indispensable en los procesos de curación [403].

Por otra parte, el grupo de ratas con tendinopatía tratadas con 3 sesiones de punción con aguja (2T+PA) también mostraba un incremento de expresión de *Cox2* respecto al grupo con tendinopatía que no había recibido tratamiento (2T) (**Fig. 41A; Tabla 6**), pero estos niveles de expresión en modo alguno se acercaban a ser estadísticamente significativos. Este hecho vuelve a avalar el efecto, clave y beneficioso, producido por la ablación electrolítica de la corriente galvánica frente a únicamente el estímulo mecánico de la punción con aguja.

Los modelos fisiopatológicos publicados en la literatura muestran que en las tendinopatías por sobreuso se produce un proceso degenerativo con aumento de la

sustancia mixoide y alteración en la formación de los distintos tipos de colágeno. Ante esto, hay autores que sugieren que el planteamiento terapéutico debe ir encaminado a desencadenar una respuesta inflamatoria aguda sobre el tejido degenerado que favorezca que los mecanismos de curación y/o reparación del tejido blando sean reactivados [55, 130]. Por tanto, el análisis de la desregulación de la expresión génica de *Cox2*, junto con los hallazgos histopatológicos de células inflamatorias en los tejidos tratados con EPI, justificaría plenamente con la mencionada indicación, el uso de la técnica EPI en el tratamiento de las tendinopatías.

Finalmente, cabe resaltar que los niveles de expresión de *Cox2* son substancialmente bajos en el grupo de ratas con tendinopatía de semanas de evolución que no había recibido tratamiento alguno (2T) (**Fig. 41A; Tabla 6**), reseña importante que sugiere que esta patología a largo plazo no cursa con actividad inflamatoria, dato que ya habían postulado y demostrado numerosos autores [2, 12, 93-99].

#### **Metaloproteinasas de la ECM (*Mmp2* y *Mmp9*).**

Es conocido que una correcta regulación de los niveles de expresión, tanto génica como proteica, de las MMPs es necesaria para mantener las propiedades estructurales de la ECM de los tendones. A este respecto, distintas publicaciones han demostrado el incremento de expresión génica de *Mmp9* y *Mmp13* en los primeros momentos tras una lesión aguda de tendón, disminuyendo paulatinamente a partir del 3<sup>er</sup> día post-lesión según Oshiro y cols. (2003) [397] o del 7<sup>o</sup> día según Loisel y cols. (2009) [398]. A raíz de estos resultados, se considera que estas MMPs participan de forma activa, como enzimas catalíticas de las fibras de colágeno, en la descomposición de la estructura de la ECM afectada por el daño tendinoso [396-398]. Interesantemente, en nuestro estudio, en la comparativa del grupo tratado con EPI (2T+EPI) respecto al no tratado (2T), *Mmp9* también estaba sobreexpresada de forma significativa (**Fig. 41 C; Tabla 6**).

Por otra parte, los genes *Mmp2*, *Mmp3*, *Mmp4* y *Mmp14* también se han referenciado con expresión elevada durante los 28 días posteriores a una lesión aguda tendinosa [167, 168, 397, 399, 404, 405]. En la literatura se apunta a que, en este tipo de lesiones, estas MMPs participan en la degradación inicial de la ECM pero que la



permanencia de su sobreexpresión en el tiempo sugiere que también desempeñan un papel fundamental en la renovación del colágeno y, por consiguiente, en la remodelación de la estructura de la ECM durante los procesos de reparación y regeneración tendinosa [167, 168, 397, 399, 404, 405]. En nuestro trabajo, *Mmp2* también mostró un incremento, aunque no fuera estadísticamente significativo, en su nivel de expresión (2T+EPI vs. 2T) (**Fig. 41B, Tabla 6**).

Como conclusión, la demostración, en esta tesis doctoral, del incremento de los niveles de expresión de *Mmp2* y *Mmp9* en el grupo 2T+EPI frente al de 2T (**Fig. 41B-C; Tabla 6**) es determinante para poder asumir que la terapia EPI activa la sobreexpresión de estos genes codificantes de enzimas que hidrolizan el colágeno e intervienen, inicialmente en la desorganización generalizada de la estructura del ECM y, posteriormente, en los procesos de reparación y regeneración del tendón.

Por otra parte, en lo que respecta a la comparación entre el grupo de ratas con tendinopatía tratadas con EPI y el grupo tratado con punción con aguja de la misma forma (2T+EPI vs. 2T+PA), el análisis de los resultados mostró que las expresiones génicas de *Mmp2* y *Mmp9* estaban incrementadas en el caso del tratamiento con EPI, estadísticamente significativo sólo en el caso de la *Mmp9*. (**Fig. 41 B, C; Tabla 6**). Aunque no está demostrado qué procesos fisiopatológicos se desencadenan tras la punción con aguja, sí se conoce que la estimulación mecánica del tejido conjuntivo produce una deformación de la ECM inducida por el movimiento de la aguja [406-409], produciéndose una ruptura mecánica de las fibras y/o de las placas motoras y una estimulación de los fibrocitos [410]. Este proceso justificaría el aumento producido, tras las 3 punciones con aguja, de la expresión génica de la *Mmp2* en este trabajo doctoral, pero el hecho de que las expresiones génicas de ambas *Mmps* hayan sido mayores en el grupo al que se ha aplicado la técnica EPI frente al de PA, se interpreta como clínicamente muy relevante, ya que sugiere que la corriente galvánica produciría una mayor actividad catalítica de la ECM, y con ella, un mayor estímulo en los procesos que conllevan los mecanismos fisiológicos de regeneración del tejido al relacionarse con la renovación del colágeno y remodelación de la ECM.

### Colágenos tipo I y tipo III (*Col1a1* y *Col3a1*)

Juneja y cols. (2013) [399], al analizar los niveles de expresión génica de algunos tipos de colágeno en un modelo de reparación de una lesión aguda de tendón en ratas, observaron que *Col1a1* y *Col3a1* se sobreexpresaban exponencialmente hasta el intervalo del 14<sup>o</sup> al 21<sup>o</sup> día post-lesión, reduciéndose posteriormente su expresión de forma paulatina hasta el 35<sup>o</sup> día. Un estudio anterior de Loiseau y cols. (2009) [398] demostró también que, en un modelo de curación de tendón murino tras sección y sutura, en las 2 primeras semanas del proceso de reparación había niveles altos de expresión del *Col3a1*, siendo gradualmente substituido en las 2 semanas siguientes por un incremento de la expresión de *Col1a1*. Ambas publicaciones defienden que, este patrón de expresión en el proceso de cicatrización de la estructura tendinosa tiene su justificación en la biología de reparación del tejido blando, donde tras una primera fase inflamatoria, se produce un aumento en la síntesis de colágeno para lograr una óptima restauración de la arquitectura de la ECM, proceso este último, que tiene lugar durante las fases de reparación fibroblástica y de remodelación tisular [37, 121, 126].

En nuestro estudio, los análisis moleculares en el grupo de ratas con tendinopatía tras 3 sesiones de la técnica EPI en comparación con el grupo de ratas con tendinopatía no tratado (2T+EPI vs. 2T), muestran el incremento de la expresión génica descrito en las publicaciones referenciadas anteriormente, es decir, tanto del *Col1a1* como *Col3a1*, especialmente en el caso del *Col3a1* (**Fig. 41D-E; Tabla 6**), aunque éstos no alcanzan resultados estadísticamente significativos, debido probablemente al postulado, ya mencionado, en el que se sugiere que el espacio temporal en el que se engloba este estudio no es lo suficientemente amplio. Pero estos resultados, teniendo presentes los estudios reportados, pueden ser interpretados como muy positivos en cuanto a un beneficio óptimo de la terapia EPI, si se correlaciona el incremento de expresión de ambos genes con la proliferación y síntesis de nuevos tipos de colágenos, proteína fibrosa necesaria para la remodelación de la ECM degenerada en las tendinopatías.

Debido a las limitaciones en el espacio temporal ya mencionadas, no se ha podido determinar la evolución de la expresión de dichos genes a tiempos mayores a

las 4 semanas. No obstante, se plantea la hipótesis que, una vez finalizadas las sesiones de EPI y, coincidiendo temporalmente con la última fase del proceso de reparación del tejido blando (fase de remodelación), podría tener lugar una disminución gradual de la expresión génica de *Col3a1* a favor de un aumento del *Col1a1*, tal y como reportaron los trabajos mencionados [398, 399]. El colágeno tipo 3 es un colágeno más inmaduro, cuya función principal es la de sostén, aportando más elasticidad que resistencia; por su parte, el colágeno tipo 1, con una disposición de sus fibras más ordenada en paralelo y con un mayor número de enlaces cruzados, proporciona una mayor resistencia a la carga [37, 127]. Por consiguiente, esta conversión progresiva tendría un efecto totalmente beneficioso en la curación del tendón lesionado, al mejorar sus propiedades biomecánicas y su capacidad de soportar tensiones. Además, es conocido que el estímulo mecánico desempeña un papel fundamental a favor de la síntesis del colágeno tipo 1 [126, 411], por lo que se sugiere que si la sobreexpresión del *Col3a1* que tiene lugar tras 3 sesiones de EPI se combinase con un estímulo mecánico óptimo producido por ejercicios activos, se podrían obtener mejores resultados en el tratamiento de las tendinopatías, al favorecer dicho estímulo la síntesis de un tipo de colágeno con mayor adaptación biomecánica para soportar la actividad y la carga, el *Col1a1*.

Finalmente, en relación con el análisis de los resultados obtenidos con el grupo de ratas con tendinopatía tratadas con tres sesiones de punción con aguja (2T+PA) lo único destacable es que sólo el estímulo mecánico también produce un incremento en la expresión del *Col1a1* respecto al grupo no tratado (2T), aunque éste es menor que el expresado en el tratado con EPI (2T+EPI) (**Fig. 41D; Tabla 6**).

### **El factor de crecimiento endotelial (Vefg)**

Numerosos autores han descrito una hipervascularización con la presencia de vasos no funcionales como uno de los grandes cambios histopatológicos que tienen lugar en las tendinopatías por sobreuso [44, 171-173, 177-179, 204-206]. La técnica Color Power- Doppler, técnica ecográfica de monitorización no invasiva que permite registrar la hipervascularización mediante la captación del flujo sanguíneo en movimiento, resulta útil en el diagnóstico de este tipo de patologías [178, 179, 412]. Así, mediante esta técnica, diferentes trabajos han determinado una prevalencia de

hipervascularización entre un 70% y 75% de los tendones con tendinopatía [223, 413], no pudiéndose dar actualmente una explicación plausible al hecho de que haya en torno a un 25% o 30% de tendones, que aun presentando imagen ecográfica de tendinopatía (engrosamiento del tendón, zonas anecoicas, irregularidades corticales), no tienen asociada una imagen de hipervascularidad al realizar la evaluación ultrasónica.

También es conocido que el aumento de vasos sanguíneos parece estar correlacionado con una mayor presencia de factores de crecimiento neurales, como el factor de crecimiento nervioso (NGF, *nerve growth factor*) y, con ellos, una neoinervación tendinosa que produce una sobreexpresión de neurotransmisores neurotóxicos relacionados con el dolor, como el glutamato, la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, *calcitonin gene related peptide*) [171, 174, 175]. Por consiguiente, muchos autores afirman que la presencia de hipervascularización y dolor en los tendones con tendinopatía guarda una relación directa, reportándose que tendones hipervasculares cursan con más dolor que los tendones con tendinopatía que no presentan imagen con signos de hipervascularidad [174, 175, 177, 414]. En concordancia con esta línea de investigación, Alfredson y colaboradores plantearon la hipótesis de que el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso con un esclerosante vascular, como el polidocanol (un polímero que se forma por la etoxilación del dodecanol), podría actuar eliminando el dolor por un efecto indirecto a través de la isquemia que provocaría esta sustancia en el tejido [204, 238]. De este modo, su grupo de investigación reportó la efectividad de este tipo de tratamiento al determinar una prevalencia de pacientes asintomáticos en el 75% de los pacientes con tendinopatía de tendón rotuliano tratados con infiltraciones de polidocanol, porcentaje clínicamente muy relevante [204, 238].

Respecto al efecto de la terapia EPI, diferentes estudios clínicos publicados han demostrado un efecto beneficioso de la técnica sobre la hipervascularización y el dolor en el tratamiento de pacientes con tendinopatías por sobreuso [14-17, 19, 348, 349]. No obstante, en la actualidad no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo biológico que subyace a tal mejoría, aunque existen diversas hipótesis al respecto. En concreto, nuestro grupo de investigación realizó un estudio clínico [351] sobre los cambios que se producían en la clínica dolorosa y en el grado de vascularización en tendones de

pacientes con tendinopatía rotuliana tras la aplicación de 3 sesiones de EPI complementadas con ejercicio excéntrico, para determinar si ambos parámetros guardaban algún tipo de relación. Se comprobó una disminución de la sintomatología dolorosa en más de un 70% de los casos de la muestra, así como la desaparición, dentro de dicho porcentaje, de la imagen ecográfica de hipervascularidad en el 28.6% de los pacientes. En paralelo a este grupo experimental, se realizó en otro grupo de pacientes con tendinopatía rotuliana un tratamiento de fisioterapia convencional basado en técnicas de electroterapia y también asociado a ejercicio excéntrico, y en dicho grupo la sintomatología dolorosa desapareció en un 36% de los casos y la imagen de hipervascularidad en el 8.6%, una mejoría en ambos parámetros significativamente menor que la obtenida en el grupo tratado con EPI. Los resultados obtenidos con este trabajo son similares a los mostrados por el grupo de Valera y cols. [19] y resultan clínicamente muy relevantes, ya que refuerzan la afirmación realizada por las publicaciones previamente mencionadas que asocian la hipervascularización y el dolor y, consolidan también, la correlación entre ausencia de vasos y una disminución de la sensación de dolor [174, 175, 177, 414]. Sánchez-Sánchez (2011) [351] hipotetiza que esta correlación está provocada porque, en el caso del tratamiento con EPI, la electrolisis además de destruir el tejido fibrótico degenerado en la zona de aplicación elimina también los vasos sanguíneos afuncionales y su hiperinervación vinculada, con la consiguiente disminución de la percepción dolorosa. Asimismo, una hipótesis similar es defendida por el autor de la técnica, Sánchez-Ibáñez, que justifica que los buenos resultados clínicos disminuyendo la sintomatología dolorosa obtenidos con la terapia con EPI podrían ser debidos al efecto polar del electrodo negativo, el cual provocaría la destrucción de los terminales sinápticos nociceptivos [342, 344].

Según lo expuesto en los párrafos anteriores, tanto el tratamiento de las infiltraciones de polidocanol como la terapia EPI presentan la capacidad de disminuir el dolor en las tendinopatías, con un porcentaje de mejoría similar en las dos (70-75% de los pacientes). No obstante, ambos tratamientos presentan una diferencia clave; el polidocanol no muestra influencia sobre la regeneración tendinosa, por tanto, es una técnica que alivia el síntoma doloroso de las tendinopatías, pero no es determinante en la curación del tendón. Sin embargo, la técnica EPI, además de aliviar el dolor, también

estimularía la curación al provocar un aumento de vascularización en la zona lesionada, que en este caso favorecería la regeneración tendinosa [345].

En esta tesis doctoral, se han valorado los posibles cambios en el grado de vascularización del tendón con tendinopatía mediante el análisis de los niveles de expresión de *Vefg*. Así, al comparar el grupo de ratas con tendinopatía tras 3 sesiones de EPI (2T+EPI) con el grupo con el mismo tipo de patología sin tratar (2T) se objetivó un incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de este gen (**Fig. 41F; Tabla 6**). Este resultado coincide con lo mostrado por Abat y cols. (2014) [345] en la única publicación realizada hasta el momento, en la que se analizaron las variaciones de expresión de algunos genes relacionados con algunas funciones determinantes como los procesos apoptóticos, con los genes codificantes de las proteínas citocromo C y el *Smac/Diablo* (*second mitochondria-derived activator of caspases*), y los procesos de neovascularización, con el mismo *Vegf* y el gen codificante de uno de sus receptores, *Vegfr-2*, tras tratamiento con la técnica EPI. A este respecto, es conocido que algunos factores de crecimiento como el *Vefg*, el factor de crecimiento tipo insulina (*Igfl*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Pdgf*) están sobreexpresados después de una lesión aguda de tendón y participan activamente en múltiples etapas del proceso de curación [167, 168, 400, 415]. En el caso concreto del *Vefg*, potente estimulador de la angiogénesis y de la permeabilidad, se ha detectado sobreexpresado después del inicio del proceso inflamatorio y, especialmente, durante las fases de proliferación y remodelación del tendón [415, 416, 416, 417].

Por consiguiente, en nuestro estudio, el incremento de la expresión de este gen tras la aplicación de 3 sesiones de EPI se puede correlacionar con un estímulo clave para la formación de nuevos vasos sanguíneos normofuncionales en el tendón con tendinopatía, influyendo positivamente en el proceso de curación de éste. Asimismo, el tratamiento con esta misma técnica podría también disminuir la hiperinervación, destruyendo los terminales sinápticos nociceptivos vinculados a la tendinopatía, con la consiguiente disminución de la percepción dolorosa. Este último postulado deberá comprobarse con futuros experimentos moleculares y bioquímicos.

### Escleraxis (Scx)

El gen *Scx* codifica el factor de transcripción escleraxis (SCX) y es utilizado como marcador específico de tendones y ligamentos [418-420]. Se expresa fundamentalmente en etapas progenitoras tempranas a la formación de tendones, aunque también en adultos [418, 421, 422]. Es considerado la proteína clave que regula el destino de las células del tendón [418], ya que ratones *knock-out* (KO) para este gen, es decir, carentes de su expresión, exhiben una apreciable reducción en la formación de los tendones con una alteración de la ECM y un descenso o incluso ausencia de la expresión de otros genes relacionados con la formación y desarrollo de este tejido blando, como los genes de colágeno *Col1a1* y el *Col1a4* [423]. Por todo esto, se considera que SCX podría regular la transcripción de, al menos, el gen *Col1a1*, entre otros genes codificantes de los componentes de la ECM en los fibroblastos del tendón [424-426].

Adicionalmente, se ha demostrado que SCX, junto con otros factores de transcripción como SOX9, MKX (*Mohawk homeobox*), EGR1 y EGR2 (*Early growth response protein 1 y 2*), participa también activamente en los procesos de reparación y regeneración del tendón [394, 398, 405, 427, 428]. Así, por ejemplo, se detectaron, en tejidos tendinosos lesionados, niveles de expresión elevados de *Scx* que se mantenían incrementados hasta la 4<sup>o</sup> semana post lesión [398, 405]. Por su parte, Tan y cols. (2014) [429] determinaron, en modelos murinos, que la reparación de lesiones agudas tendinosas con una suplementación exógena de la proteína SCX era significativamente mejor histológica y biomecánicamente, por lo que hipotetizaron que ésta promovía la curación del tejido tendinoso.

En esta tesis doctoral, comparando los perfiles de expresión génica de *Scx* entre los grupos experimentales 2T vs 2T+EPI, los resultados mostraron que *Scx* estaba incrementada en el grupo tratado con 3 sesiones de EPI, aunque la variación no era estadísticamente significativa. No obstante, es importante destacar el hecho de que en las comparativas C vs EPI y C vs 2T+EPI, los niveles de este gen se muestran altamente elevados en los grupos tratados con la técnica EPI (**Figs. 39-41G; Tablas 4,6**). Este resultado se puede interpretar como favorable y clínicamente muy relevante, por su

relación directa con la activación de la transcripción del *Col1a1* e indirecta con el estímulo de los procesos de reparación de la ECM.

Por otra parte, es importante mencionar que SCX también parece jugar un papel importante en la mejora en la adaptación de los tendones adultos a la carga. Así, Maeda (2011) [430] demostró que la expresión de *Scx* podría depender de la señalización mecánica, a más estímulo mecánico mayor sería su expresión. Mendias y cols. (2012) [419] también reportaron en un modelo murino que un entrenamiento con ejercicio en cinta de correr durante 6 semanas conllevaba un aumento en la expresión génica de *Scx* y de *Col1a1*. Además, Eliasson y cols. (2009) [394] demostraron que, al someter a carga durante el proceso de reparación a un grupo de tendones seccionados, la expresión génica de *Scx* se elevaba, así como la expresión de *Col1a1* y *Col3a1*. Todos estos estudios resultan muy interesantes, al mostrar una correlación entre estímulo mecánico, aumento en la expresión de *Scx* y aumento en la expresión de *Col1a1*. En lo que respecta a este trabajo doctoral también parece existir esta correlación entre los niveles de expresión altos de *Scx* y *Col1a1*, fundamentalmente en los grupos experimentales tratados con la técnica EPI (**Figs. 39 y 41**).

Continuando con la relación de *Scx* y adaptación a la carga del tendón, Mallarias (2013) [5] publicó un estudio con una extensa revisión bibliográfica defendiendo que todos los tipos de contracción, isométrica, concéntrica y excéntrica, son beneficiosos y, lo más importante, necesarios en cualquier protocolo que pretenda recuperar con éxito una lesión tendinosa. Más específicamente, se considera que este tipo de ejercicios son una parte del tratamiento imprescindible para conseguir una buena respuesta reparadora que estimule la formación de colágeno [300, 301]. Por lo tanto, la correlación entre el estímulo mecánico y los incrementos de expresión de *Scx* y *Col1a1*, podría ser uno de los procesos biológicos que diera respuesta a los resultados positivos conseguidos con los protocolos de ejercicio que forman parte de la vía adaptativa en el tratamiento de las lesiones tendinosas en humanos [315-317, 431, 432]. Este hecho justificaría el por qué hay mejoría con los distintos tipos de contracción, no exclusivamente con los ejercicios excéntricos, ya que lo más importante, tal y como defienden Cook y cols. en su modelo *Continuum*, sería el estímulo mecánico de carga, estímulo que aumentaría la síntesis de los distintos componentes de la ECM y mejoraría



la alineación óptima del colágeno en formación, aumentando así la capacidad para soportar la carga del tendón [103, 164, 318].

A este respecto, es de destacar el hecho que, hasta el momento actual, los mejores resultados publicados sobre pacientes con tendinopatía tratados con la técnica EPI se han obtenido al combinar la electrolisis con protocolos de ejercicio activo [14-17, 19, 348, 349]. La respuesta a esta mejoría clínica podría estar en que, si se añade a la regulación positiva del gen "pro-regenerador" SCX, incentivada con la aplicación de la EPI tal y como se demuestra en esta tesis doctoral, una mayor expresión de este mismo gen provocada exclusivamente por el propio estímulo de la carga con ejercicios, se podría a su vez incrementar, aún más, la transcripción de *COL1A1*, favoreciendo la reordenación de la ECM con el consiguiente beneficio en la curación del tendón. Este postulado es clínicamente muy relevante, ya que daría una respuesta a los buenos resultados clínicos publicados y justificaría plenamente la indicación terapéutica de la técnica EPI combinada con ejercicio activo en el tratamiento de las tendinopatías.

Para finalizar este apartado, cabe mencionar que varios estudios han descrito la presencia en los tendones humanos y de ratón de una población celular única, las denominadas células madre progenitoras del tendón (TSPC: *Tendon stem/progenitor cells*) [27, 33]. Este hallazgo resulta muy interesante, ya que las TSPCs poseen características universales de células madre, como clonogenicidad, multipotencia y capacidad de autorrenovación, y varios estudios han sugerido que podrían tener incluso capacidad de reversión del proceso degenerativo presente en las tendinopatías. Estos estudios indican además que el gen SCX, que participa en la regeneración de la matriz, también desempeña un papel en la regeneración de las TSPC, e hipotetizan la posibilidad de que a mayor expresión de SCX, mayor presencia de TSPCs y mayor capacidad de reversión del proceso degenerativo de las tendinopatías [33, 34, 433]. Analizar la posible implicación de las células TSPCs tras aplicar la técnica EPI en tendones patológicos es sin duda una de las nuevas líneas de investigación a llevar a cabo en el futuro.

#### 4. TERAPIA CON EPI FRENTE A OTROS TRATAMIENTOS FISIOTERÁPICOS

En el tratamiento conservador de las tendinopatías, dentro de cada vía de abordaje expuestas detalladamente en el marco teórico, hay un gran abanico de técnicas fisioterápicas con objetivos similares. Todas ellas se prescriben actualmente para el tratamiento de las tendinopatías, pero no todas cuentan con la misma evidencia clínica. En concreto, algunas de las técnicas, como en el caso de la ultrasonoterapia, aunque ha sido prescrita durante décadas, en la actualidad se ha concluido que no presenta buenos resultados que la sigan avalando [162, 220-223]. Por otra parte, otras técnicas más novedosas, como las ondas de choque extracorpóreas, están destacando en la actualidad por tener resultados clínicos notablemente significativos [14-16, 213-219]. Seguidamente, se detallan algunas de las técnicas fisioterápicas utilizadas en el tratamiento de las tendinopatías junto con los resultados clínicos que han mostrado.

En el caso de las **corrientes interferenciales**, técnica electroterápica indicada en el tratamiento de las tendinopatías con fines analgésicos, sus efectos beneficiosos se basan en el estímulo de las fibras nociceptivas A $\delta$ . Según la teoría de control del dolor de Melzack y Wall (1965) [225], el estímulo de este tipo de fibras bloquearía la sensación de dolor. No obstante, a pesar de este postulado, el número de estudios clínicos sobre los verdaderos efectos beneficiosos que produce este tipo de terapia son escasos y con resultados poco concluyentes. Las afirmaciones sobre su eficacia se han limitado tradicionalmente a menciones académicas en libros de texto de electroterapia [226, 227], o a un único artículo descriptivo [434]. Aun así, es una técnica presente en los servicios de fisioterapia que se prescribe, como se indicó anteriormente, en el tratamiento del dolor en las tendinopatías por sobreuso.

El **ultrasonido terapéutico o ultrasonoterapia** se emplea clínicamente en los servicios de fisioterapia en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso con el fin de lograr una reagudización de la lesión tendinosa, desencadenando de forma controlada un proceso reactivo en el propio tendón que estimule la síntesis de las fibras de colágeno, su óptima alineación y la reorganización de su ECM [221, 246, 247]. A pesar de ser asumida esta base teórica, sin embargo, existen algunos estudios donde

se cuestiona su eficacia clínica, sugiriéndose incluso por algunos autores, un efecto beneficioso muy bajo o nulo [220, 223, 248-250]. Así, por ejemplo, Robertson y Baker (2001) [249] revisaron, mediante un metaanálisis de todos los estudios publicados referentes a esta técnica, su efectividad en la curación y en la regeneración del tejido blando, no pudiéndose demostrar ningún tipo de beneficio superior al placebo. A su vez, D'Vaz y cols. (2006) [248] en un estudio con pacientes diagnosticados de tendinopatía epicondílea concluyeron que no se obtenían beneficios en la aplicación de esta técnica, ni en la mejoría del dolor ni en la funcionalidad, mayores que en el grupo placebo. Ambos trabajos coinciden con los resultados publicados posteriormente por Warden y cols. (2008) [223] con pacientes diagnosticados de tendinopatía crónica patelar.

La técnica **láser** de uso terapéutico en las tendinopatías, cuyo fin es lograr la estimulación de la estructura tendinosa, reporta en la literatura mejores resultados clínicos con la modalidad de láser de baja intensidad [255]. Al igual que ocurre con los ultrasonidos, esta técnica tiene justificada su aplicación terapéutica en los teóricos efectos fisiológicos que produce, tales como un incremento de la capacidad regeneradora del tejido al estimular la síntesis de colágeno y de factores de crecimiento tisular [251-254, 435]. En este caso, 2 trabajos publicados por Reddy y colaboradores empleando esta técnica en el tratamiento de las tendinopatías, demostraron un incremento de la tasa de producción de colágeno en los tendones patológicos al combinar este tipo de terapia con una carga mecánica precoz [256, 257]. Asimismo, otras publicaciones también reportaron los efectos beneficiosos de la aplicación del láser al reducir sensiblemente el síntoma doloroso [258, 259]. Sin embargo, en la bibliografía también se encuentran varios artículos que ponen en duda su eficacia en el tratamiento de este tipo de lesiones, señalando que únicamente superan levemente los efectos clínicos obtenidos con placebo [260-262, 436].

El **masaje transverso profundo (MTP)** está indicado en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso con el objetivo de provocar una hiperemia que reagudice el proceso patológico, además de eliminar las adherencias y fibrosis presentes en los procesos cicatriciales [263]. Ha sido considerada una de las técnicas de elección para tratar este tipo de patologías [265, 266], aunque hay discrepancias respecto a su

efectividad. Así, Gehlsen y cols. (1999) [264] reportaron que esta técnica sí era efectiva para el tratamiento de las lesiones crónicas de los tendones, pero otros autores no han podido adjudicarle en sus estudios efectos beneficiosos clínicos con valor estadístico óptimo [266, 267, 437, 438].

Con respecto a los tratamientos basados en **programas de ejercicios**, son numerosos los estudios publicados en la literatura que destacan los beneficios de las intervenciones de programas de entrenamiento excéntrico, de manera aislada o combinándolos con otras técnicas fisioterápicas [6, 10], describiéndolos como una de las mejores opciones terapéuticas para el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso [305, 310-315, 431]. Sin embargo, autores como Naugle y cols. (2012) [316], Cook y cols. (2014) [318] y Rio y cols. (2015) [317] demostraron los beneficios del ejercicio isométrico en el tratamiento de este tipo de patología, señalando su potente efecto analgésico en el dolor tendinoso y beneficio en el mantenimiento de la capacidad del tendón de someterse a cargas [88]. A raíz de estos resultados, en la actualidad se conoce que todos los tipos de contracción, isométrica, concéntrica y excéntrica, son beneficiosos y lo más importante, totalmente necesarios en cualquier protocolo que pretenda recuperar con éxito una lesión tendinosa [5, 8]. Siguiendo esta misma línea, el grupo de investigación de Cook describió su modelo *Continuum* (**Fig. 17**), donde se prescriben ejercicios activos con los distintos tipos de contracción, no exclusivamente con ejercicios excéntricos, ya que consideran que lo necesario es el estímulo de carga, estímulo que busca aumentar la síntesis y mejorar la alineación de las fibras de colágeno en formación, aumentando así la capacidad para soportar carga del tendón [103, 164, 318]. Esta tesis doctoral avala el argumento de todos estos trabajos y, tal y como se indicó en el apartado en el que se mencionó en detalle el gen *Scx*, ya se postulaba el por qué se produce una mejoría con los distintos tipos de contracción y no exclusivamente con ejercicios excéntricos; además, también se hipotetizaba la razón por la cual podría ser más efectiva la combinación de los ejercicios con la técnica EPI que los ejercicios solos en el tratamiento de las tendinopatías.

Pero dentro de todo este abanico de técnicas terapéuticas pertenecientes a la fisioterapia, a la que se le atribuye un mecanismo fisiológico de actuación más parecido al de la técnica EPI es a la terapia con **ondas de choque extracorpóreas (TOCH)**. Este

tipo de terapia presenta la capacidad de desencadenar una respuesta inflamatoria aguda con un aumento del metabolismo celular y de vascularización en la zona tisular del impacto, así como de estimular la liberación en la zona de la lesión de factores de crecimiento que favorezcan una respuesta regeneradora de este tejido [270, 271, 390]. Así, Vetrano y cols. (2011) [439] reportaron un aumento significativo en la concentración de colágeno tipo I después de la aplicación de las TOCH, dato clínicamente significativo y que es similar al obtenido en esta tesis doctoral tras la aplicación de la técnica EPI (incremento de la expresión de *Col1a1* y *Col3a1*). Asimismo, en la actualidad, hay una gran variedad de estudios que avalan el uso de las TOCH en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso, reportando hasta un 70% de mejoría de este tipo de patologías [213, 215, 272-278, 278, 279, 440, 441]. Sin embargo, también existen otros trabajos, aunque en bastante menor número, que desaconsejan su utilización, ya que los supuestos beneficios clínicos obtenidos no son estadísticamente significativos comparándolos con grupos control o los que contienen únicamente placebo [280, 281]. Interesantemente, en un estudio relativamente reciente, Santamato y cols. (2016) sugieren que la combinación de TOCH y ejercicios reporta mejores resultados en el tratamiento de las tendinopatías que las TOCH aplicadas de forma aislada [442]. Esto iría en la misma línea de tratamiento que defiende actualmente la combinación de la terapia EPI con ejercicios, combinación que consideramos necesaria y que se ha justificado en apartados anteriores.

A este respecto cabe señalar también que al realizar una comparativa entre los distintos tipos de técnicas fisioterápicas que se emplean en el tratamiento de las tendinopatías, el trabajo de Stasinopoulos y cols. (2004) [9] concluyó que, clínicamente, las fricciones sobre el tendón, base de la técnica MTP, eran menos efectivas que el trabajo activo en el tratamiento de las tendinopatías. Posteriormente, Warden y cols. (2008) [223] confirmaron esta misma teoría, reportando no sólo que el MTP era menos efectivo, sino que también lo era la terapia con ultrasonidos [223]. Respecto a la terapia con láser, también se determinó que su efectividad era mayor si se acompañaba de ejercicios [10].

En definitiva, por todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que las técnicas fisioterápicas que actualmente muestran mejores resultados clínicos para el

tratamiento de las tendinopatías por sobreuso son los ejercicios, las TOCH y, como se postula en esta tesis doctoral, la terapia con EPI, más concretamente, la combinación de ejercicios con alguna de estas 2 técnicas regeneradoras (TOCH y EPI), con mejorías clínicas de un 70-75% en el caso de la combinación con las TOCH [213, 215, 272-278, 278, 279, 440, 441] y de un 80-85% en la combinación con la técnica EPI [16, 20, 351]. Por consiguiente, se deduce que los tratamientos que incluyen un trabajo activo son clínicamente más efectivos si van precedidos de una técnica fisioterápica con suficiente poder regenerativo, como las TOCH y la EPI, que parecen tener un mecanismo de actuación similar al desencadenar una respuesta aguda estimulativa. La gran ventaja de la terapia con EPI frente a la TOCH es que se aplica con una simple aguja, su aplicación es más focal, por lo que tiene un menor margen de error. Además, aunque ambas técnicas son dolorosas, el tiempo de ejecución de la EPI es más corto por lo que la tolerancia por parte del paciente a la técnica es mayor.

## 5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones de este estudio, como ya se ha mencionado anteriormente, es el espacio temporal en el que se engloba (4 semanas), tiempo que podría ser insuficiente para poder visualizar algunos cambios significativos de la reparación del tendón a nivel histológico [17-19], así como también para poder determinar la evolución de la expresión de los genes empleados y compararla con los estudios publicados con espacios temporales más largos [398, 399]. La ampliación del marco temporal tras la aplicación de la técnica EPI en las tendinopatías es uno de los proyectos que se pretenden llevar cabo en futuras investigaciones.

Por otra parte, el diseño del plan de trabajo se ajustó al menor número de muestra posible para minimizar el número de animales utilizados, pero es posible que un mayor número de muestra podría mejorar la significancia de los resultados obtenidos; y tal y como se ha ido indicado en algunos apartados de la discusión, éstos pudieran llegar a ser estadísticamente significativos, con la consiguiente repercusión funcional.

Finalmente, otra de las limitaciones es la propia utilización del modelo animal empleado en esta tesis doctoral que, a pesar de ser un modelo validado para el estudio

de las tendinopatías, los resultados y conclusiones obtenidas deben considerarse con la debida cautela ya que quizás no podrían ser del todo extrapolables a lo que acontece verdaderamente en las personas con este tipo de patología [352, 353].





# VI. CONCLUSIONES



### **PRIMERA**

La inyección de la enzima colagenasa fue efectiva en la inducción de la tendinopatía en el tendón de Aquiles en ratas ya que generó, en este tejido, unas características estructurales, histológicas y moleculares similares a las descritas en las tendinopatías en humanos. Por lo tanto, el modelo animal empleado en este trabajo es totalmente válido.

### **SEGUNDA**

La técnica EPI produce inicialmente una respuesta inflamatoria local y aguda, objetivada en el tendón por la presencia de infiltrado tisular con células inflamatorias del tipo leucocitos (linfocitos y monocitos), neoangiogénesis e incremento de la expresión del gen proinflamatorio *Cox2* y los genes *Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1* y *Col3a1*, éstos últimos, relacionados con los procesos de regeneración del colágeno y remodelación de la matriz extracelular de este tejido. Estas respuestas se producen tanto en un tendón sano como en uno con tendinopatía, corroborando así, el postulado del creador de esta técnica terapéutica.

### **TERCERA**

La técnica de punción con aguja produce un proceso inflamatorio sobre el tendón, sólo apreciable en este trabajo a nivel molecular, aunque notablemente menor que el mismo proceso generado por la técnica EPI, extrapolándose, por lo tanto, que la causa de tal diferencia reside en la ablación electrolítica que produce la aplicación de la corriente galvánica. Este hecho es determinante en la óptima recuperación del tejido tendinoso.

### **CUARTA**

La técnica EPI produce en un tendón con tendinopatía un incremento de la expresión génica de *Vefg* que está directamente relacionado con los procesos de neoangiogénesis. A este respecto, se postula que la formación de nuevos vasos sanguíneos normofuncionales es un estímulo molecular clave e imprescindible para que se lleve a cabo el proceso de curación de este tejido.

#### **QUINTA**

La técnica EPI produce un incremento de la expresión génica del factor de transcripción pro-regenerativo *Scx*, el cual, a su vez, activa la transcripción de al menos uno de los genes de colágeno, *Col1a1*, e indirectamente estimula los procesos de reparación de la matriz extracelular del tendón. Por lo tanto, estos hechos se pueden interpretar, desde el punto de vista clínico, como muy relevantes en el fin de lograr un óptimo proceso de curación del tendón con tendinopatía.

#### **SEXTA**

La técnica fisioterápica EPI, al ser demostrado que provoca inicialmente una respuesta inflamatoria y presenta un alto poder regenerativo del tejido tendinoso, puede considerarse una de las terapias de elección preferente en el tratamiento de las tendinopatías por sobreuso.

# VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Alcántara-Martos T, Delgado-Martínez, A.D., Aznar-Zafra S, Fernández-Rodríguez JC, Fernández-Jaén T: Tendinopatías. *Trauma Fund MAPFRE* 2011, 22(1):12-21.
2. Kannus P: Etiology and pathophysiology of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):78-85.
3. Maffulli N, Wong J, Almekinders LC: Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med* 2003, 22(4):675-692.
4. Xu Y, Murrell GA: The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* 2008, 466(7):1528-1538.
5. Malliaras P, Kamal B, Nowell A, Farley T, Dhamu H, Simpson V, Morrissey D, Langberg H, Maffulli N, Reeves ND: Patellar tendon adaptation in relation to load-intensity and contraction type. *J Biomech* 2013, 46(11):1893-1899.
6. Manias P, Stasinopoulos D: A controlled clinical pilot trial to study the effectiveness of ice as a supplement to the exercise programme for the management of lateral elbow tendinopathy. *Br J Sports Med* 2006, 40(1):81-85.
7. Stasinopoulos D, Johnson MI: Effectiveness of extracorporeal shock wave therapy for tennis elbow (lateral epicondylitis). *Br J Sports Med* 2005, 39(3):132-136.
8. Stasinopoulos D, Stasinopoulos I: Comparison of effects of eccentric training, eccentric-concentric training, and eccentric-concentric training combined with isometric contraction in the treatment of lateral elbow tendinopathy. *J Hand Ther* 2017, 30(1):13-19.
9. Stasinopoulos D, Stasinopoulos I: Comparison of effects of exercise programme, pulsed ultrasound and transverse friction in the treatment of chronic patellar tendinopathy. *Clin Rehabil* 2004, 18(4):347-352.
10. Stasinopoulos D, Stasinopoulos I, Pantelis M, Stasinopoulou K: Comparing the effects of exercise program and low-level laser therapy with exercise program and polarized polychromatic non-coherent light (bioptron light) on the treatment of lateral elbow tendinopathy. *Photomed Laser Surg* 2009, 27(3):513-520.
11. Stasinopoulos DI, Johnson MI: Effectiveness of low-level laser therapy for lateral elbow tendinopathy. *Photomed Laser Surg* 2005, 23(4):425-430.
12. Almekinders LC, Temple JD: Etiology, diagnosis, and treatment of tendonitis: an analysis of the literature. *Med Sci Sports Exerc* 1998, 30(8):1183-1190.
13. Sánchez- Ibañez J: ¿Fascitis o Fasciosis plantar? Bases biológicas de su tratamiento mediante electrólisis percutánea intratisular (EPI). *Podología Clínica* 2004, 5:22-29.
14. Abat F, Diesel WJ, Gelber PE, Polidori F, Monllau JC, Sanchez-Ibanez JM: Effectiveness of the Intratissue Percutaneous Electrolysis (EPI®) technique and isoinertial eccentric exercise in the treatment of patellar tendinopathy at two years follow-up. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014, 4(2):188-193.
15. Abat F, Gelber PE, Polidori F, Monllau JC, Sanchez-Ibanez JM: Clinical results after ultrasound-guided intratissue percutaneous electrolysis (EPI®) and eccentric exercise in the treatment of patellar tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015, 23(4):1046-1052.
16. Abat F, Sanchez-Sanchez JL, Martin-Nogueras AM, Calvo-Arenillas JI, Yajeya J, Mendez-Sanchez R, Monllau JC, Gelber PE: Randomized

- controlled trial comparing the effectiveness of the ultrasound-guided galvanic electrolysis technique (USGET) versus conventional electro-physiotherapeutic treatment on patellar tendinopathy. *J Exp Orthop* 2016, 3(1):34-016-0070-4.
17. Valera-Garrido F, Minaya-Munoz F, Medina-Mirapeix F: Ultrasound-guided percutaneous needle electrolysis in chronic lateral epicondylitis: short-term and long-term results. *Acupunct Med* 2014, 32(6):446-454.
18. Minaya-Muñoz F, Valera-Garrido F, Sánchez-Ibáñez JM, Medina-Mirapeix F: Estudio del coste efectividad de la electrólisis percutánea intratisular (EPI®) en las epicondilalgias. *Fisioterapia* 2012, 34(5):208-215.
19. Valera-Garrido F, Minaya-Muñoz F, Sánchez-Ibáñez JM: Efectividad de la electrólisis percutánea Intratisular (EPI) en las tendinopatías crónicas del tendón rotuliano. *Trauma Fund MAPFRE* 2010, 21(4):227-236.
20. Sánchez-Ibáñez JM, Fernández ME, Moreno C, Marti D, Belon P: Ultrasound-Guided EPI® Technique and Eccentric Exercise, New Treatment for Achilles and Patellar Tendinopathy Focused on the Region-Specific of the Tendon. *Orthop Muscular Syst* 2015, 4(4):1-6.
21. Sánchez-Ibáñez JM, Fernández ME, Monllau JC, Alonso-Díez A, Sánchez-García J, Sánchez-Sánchez JL: New treatments for degenerative tendinopathy, focused on the region-specific of the tendon. *Reumatology* 2015, 5(4):173-185.
22. Jozsa L, Kannus P: Humans tendons: anatomy, physiology and pathology.; Champaign, IL : Human Kinetics, 1997.
23. Kannus P: Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000, 10(6):312-320.
24. O'Brien M: Anatomy of tendons. In *Tendon Injuries. Basic science and clinical medicine*. Edited by Maffulli N, Renström, Leadbetter, MD. London: Springer; 2005:3-13.
25. Perugia L, Postacchini F, Ippolito ET: En *The Tendons: Biology, Pathology, Clinical Aspects*. Edited by Milan: Kurtis; 1986:9-36.
26. O'Brien M: Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):55-61.
27. Riley G: The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43(2):131-142.
28. Wang JH, Guo Q, Li B: Tendon biomechanics and mechanobiology - a minireview of basic concepts and recent advancements. *J Hand Ther* 2012, 25(2):133-141.
29. Kirkendall DT, Garrett WE: Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):62-66.
30. Almekinders LC, Banes AJ, Ballenger CA: Effects of repetitive motion on human fibroblasts. *Med Sci Sports Exerc* 1993, 25(5):603-607.
31. Viidik A: Functional properties of collagenous tissues. *Int Rev Connect Tissue Res* 1973, 6:127-215.
32. Jurado A, Medina I: Estructura del tendón. En *Tendón. Valoración y tratamiento de fisioterapia*. Edited by Barcelona: Paidotribo; 2008:7-37.
33. Bi Y, Ehrlichou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF: Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007, 13(10):1219-1227.
34. Lui PP, Chan KM: Tendon-derived stem cells (TDSCs): from basic science to potential roles in tendon pathology and tissue engineering applications. *Stem Cell Rev* 2011, 7(4):883-897.



35. Leadbetter WB: Cell-matrix response in tendon injury. *Clin Sports Med* 1992, 11(3):533-578.
36. Scott JE: Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J* 1992, 6(9):2639-2645.
37. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ: Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004, 37(6):865-877.
38. Tsuzaki M, Yamauchi M, Banes AJ: Tendon collagens: extracellular matrix composition in shear stress and tensile components of flexor tendons. *Connect Tissue Res* 1993, 29(2):141-152.
39. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M: Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998, 16(8):457-470.
40. Riley GP, Goddard MJ, Hazleman BL: Histopathological assessment and pathological significance of matrix degeneration in supraspinatus tendons. *Rheumatology (Oxford)* 2001, 40(2):229-230.
41. Wenstrup RJ, Florer JB, Cole WG, Willing MC, Birk DE: Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome. *J Cell Biochem* 2004, 92(1):113-124.
42. Tanzer ML: Cross-linking of collagen. *Science* 1973, 180(4086):561-566.
43. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ: Advances in collagen cross-link analysis. *Methods* 2008, 45(1):65-74.
44. Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M: Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 1999, 27(6):393-408.
45. Butler DL, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RF: Biomechanics of ligaments and tendons. *Exerc Sport Sci Rev* 1978, 6:125-181.
46. O'Brien M: Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin Sports Med* 1992, 11(3):505-520.
47. Yoon JH, Halper J: Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005, 5(1):22-34.
48. Hardingham TE, Fosang AJ: Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992, 6(3):861-870.
49. Trebault A, Chan EK, Midwood KS: Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans* 2007, 35(Pt 4):695-697.
50. Magra M, Maffulli N: Matrix metalloproteinases: a role in overuse tendinopathies. *Br J Sports Med* 2005, 39(11):789-791.
51. Sbardella D, Tundo GR, Fasciglione GF, Gioia M, Bisicchia S, Gasbarra E, Ippolito E, Tarantino U, Coletta M, Marini S: Role of metalloproteinases in tendon pathophysiology. *Mini Rev Med Chem* 2014, 14(12):978-987.
52. Davis ME, Gumucio JP, Sugg KB, Bedi A, Mendias CL: MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. *J Appl Physiol (1985)* 2013, 115(6):884-891.
53. Passi A, Negrini D, Albertini R, Misericocchi G, De Luca G: The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS Lett* 1999, 456(1):93-96.
54. Rodriguez JA, Orbe J, Paramo JA: Metalloproteinases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol* 2007, 60(9):959-967.
55. Fu SC, Chan BP, Wang W, Pau HM, Chan KM, Rolf CG: Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis.

- Acta Orthop Scand 2002, 73(6):658-662.
56. Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA: Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 2002, 21(2):185-195.
57. Mayer L: The physiological method of tendon transplantation. *Historical anatomy and physiology of tendons. Surgery, Gynaecology and Obstetrics* 1916, 22:182-197.
58. Smith JW: Blood Supply of Tendons. *Am J Surg* 1965, 109:272-276.
59. Clark MG, Clerk LH, Newman JM, Rattigan S: Interaction between metabolism and flow in tendon and muscle. *Scand J Med Sci Sports* 2000, 10(6):338-345.
60. Rathbun JB, Macnab I: The microvascular pattern of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br* 1970, 52(3):540-553.
61. Chen TM, Rozen WM, Pan WR, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI: The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clin Anat* 2009, 22(3):377-385.
62. Kvist M, Hurme T, Kannus P, Jarvinen T, Maunu VM, Jozsa L, Jarvinen M: Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *Am J Sports Med* 1995, 23(3):359-364.
63. Tempfer H, Traweger A: Tendon Vasculature in Health and Disease. *Front Physiol* 2015, 6:330.
64. Astrom M, Westlin N: Blood flow in the human Achilles tendon assessed by laser Doppler flowmetry. *J Orthop Res* 1994, 12(2):246-252.
65. Jozsa L, Balint J, Kannus P, Jarvinen M, Lehto M: Mechanoreceptors in human myotendinous junction. *Muscle Nerve* 1993, 16(5):453-457.
66. Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TA, Balint J, Jarvinen M: Number and morphology of mechanoreceptors in the myotendinous junction of paralysed human muscle. *J Pathol* 1996, 178(2):195-200.
67. Ackermann PW, Salo PT, Hart DA: Neuronal pathways in tendon healing. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009, 14:5165-5187.
68. Lieber RL, Friden J: Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle Nerve* 2000, 23(11):1647-1666.
69. Kannus P, Jozsa L, Natri A, Jarvinen M: Effects of training, immobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):67-71.
70. Fukunaga T, Kubo K, Kawakami Y, Fukashiro S, Kanehisa H, Maganaris CN: In vivo behaviour of human muscle tendon during walking. *Proc Biol Sci* 2001, 268(1464):229-233.
71. Almekinders LC, Vellema JH, Weinhold PS: Strain patterns in the patellar tendon and the implications for patellar tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002, 10(1):2-5.
72. Hamilton B, Purdam C: Patellar tendinosis as an adaptive process: a new hypothesis. *Br J Sports Med* 2004, 38(6):758-761.
73. Muramatsu T, Muraoka T, Takeshita D, Kawakami Y, Hirano Y, Fukunaga T: Mechanical properties of tendon and aponeurosis of human gastrocnemius muscle in vivo. *J Appl Physiol* (1985) 2001, 90(5):1671-1678.
74. Lichtwark GA, Wilson AM: In vivo mechanical properties of the human Achilles tendon during one-legged hopping. *J Exp Biol* 2005, 208(Pt 24):4715-4725.

75. Viidik A: The effect of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1967, 1(2):141-147.
76. Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M: Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003, 13(4):211-223.
77. Benjamin M: Tendons are dynamic structures that respond to changes in exercise levels. *Scand J Med Sci Sports* 2002, 12(2):63-64.
78. Noyes FR, Torvik PJ, Hyde WB, DeLucas JL: Biomechanics of ligament failure. II. An analysis of immobilization, exercise, and reconditioning effects in primates. *J Bone Joint Surg Am* 1974, 56(7):1406-1418.
79. Tipton CM, Matthes RD, Maynard JA, Carey RA: The influence of physical activity on ligaments and tendons. *Med Sci Sports* 1975, 7(3):165-175.
80. Langberg H, Rosendal L, Kjaer M: Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 2001, 534(Pt 1):297-302.
81. Langberg H, Skovgaard D, Asp S, Kjaer M: Time pattern of exercise-induced changes in type I collagen turnover after prolonged endurance exercise in humans. *Calcif Tissue Int* 2000, 67(1):41-44.
82. Langberg H, Skovgaard D, Karamouzis M, Bulow J, Kjaer M: Metabolism and inflammatory mediators in the peritendinous space measured by microdialysis during intermittent isometric exercise in humans. *J Physiol* 1999, 515(Pt 3):919-927.
83. Langberg H, Skovgaard D, Petersen LJ, Bulow J, Kjaer M: Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 1999, 521 (Pt 1):299-306.
84. Ying M, Yeung E, Li B, Li W, Lui M, Tsoi CW: Sonographic evaluation of the size of Achilles tendon: the effect of exercise and dominance of the ankle. *Ultrasound Med Biol* 2003, 29(5):637-642.
85. Olesen JL, Heinemeier KM, Gemmer C, Kjaer M, Flyvbjerg A, Langberg H: Exercise-dependent IGF-I, IGF-BPs, and type I collagen changes in human peritendinous connective tissue determined by microdialysis. *J Appl Physiol* (1985) 2007, 102(1):214-220.
86. Kubo K, Akima H, Ushiyama J, Tabata I, Fukuoka H, Kanehisa H, Fukunaga T: Effects of 20 days of bed rest on the viscoelastic properties of tendon structures in lower limb muscles. *Br J Sports Med* 2004, 38(3):324-330.
87. Yamamoto N, Hayashi K, Kuriyama H, Ohno K, Yasuda K, Kaneda K: Effects of restressing on the mechanical properties of stress-shielded patellar tendons in rabbits. *J Biomech Eng* 1996, 118(2):216-220.
88. Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M: The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy. Is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? *Int J Exp Pathol* 2007, 88(4):217-226.
89. Clancy WGJ: Tendon trauma and overuse injuries. In *Sports-induced inflammation: clinical and basic science concepts*. Edited by Leadbetter WB, Buckwalter JA, Gordon SL. Park Ridge: AAOS; 1989:609-618.
90. Stanish WD, Curwin SL, Mandell S: *Tendinitis: its etiology and treatment*. Lexington: Collamore Press; 1984.
91. Chapman JF: *Subacromial Bursitis and Supraspinatus Tendinitis: Its Roentgen Treatment*. *Cal West Med* 1942, 56(4):248-251.

92. Puddu G, Ippolito E, Postacchini F: A classification of Achilles tendon disease. *Am J Sports Med* 1976, 4(4):145-150.
93. Ferretti A: Epidemiology of jumper's knee. *Sports Med* 1986, 3(4):289-295.
94. Jarvinen M, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Kvist M, Leadbetter W: Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):86-95.
95. Khan KM, Cook JL, Taunton JE, Bonar F: Overuse tendinosis, not tendinitis part 1: a new paradigm for a difficult clinical problem. *Phys Sportsmed* 2000, 28(5):38-48.
96. Khan KM, Maffulli N, Coleman BD, Cook JL, Taunton JE: Patellar tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med* 1998, 32(4):346-355.
97. Almekinders LC, Weinhold PS, Maffulli N: Compression etiology in tendinopathy. *Clin Sports Med* 2003, 22(4):703-710.
98. Rees JD, Stride M, Scott A: Tendons-time to revisit inflammation. *Br J Sports Med* 2014, 48(21):1553-1557.
99. Cook JL, Khan KM, Maffulli N, Purdam C: Overuse tendinosis, not tendinitis part 2: applying the new approach to patellar tendinopathy. *Phys Sportsmed* 2000, 28(6):31-46.
100. Maffulli N, Khan KM, Puddu G: Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy* 1998, 14(8):840-843.
101. Khan KM, Cook JL, Kannus P, Maffulli N, Bonar SF: Time to abandon the "tendinitis" myth. *BMJ* 2002, 324(7338):626-627.
102. Jurado A, Medina I: Tendinopatías ¿tendinitis o tendinosis? En *Tendón. Valoración y tratamiento de fisioterapia*. Paidotribo; 2008:77-107.
103. Cook JL, Purdam CR: Is tendon pathology a continuum? A pathology model to explain the clinical presentation of load-induced tendinopathy. *Br J Sports Med* 2009, 43(6):409-416.
104. Scott A, Backman LJ, Speed C: Tendinopathy: Update on Pathophysiology. *J Orthop Sports Phys Ther* 2015, 45(11):833-841.
105. Forde MS, Punnett L, Wegman DH: Prevalence of musculoskeletal disorders in union ironworkers. *J Occup Environ Hyg* 2005, 2(4):203-212.
106. Gross MT: Chronic tendinitis: pathomechanics of injury, factors affecting the healing response, and treatment. *J Orthop Sports Phys Ther* 1992, 16(6):248-261.
107. Lian OB, Engebretsen L, Bahr R: Prevalence of jumper's knee among elite athletes from different sports: a cross-sectional study. *Am J Sports Med* 2005, 33(4):561-567.
108. Riley G: Tendinopathy - from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, 4(2):82-89.
109. Astrom M, Gentz CF, Nilsson P, Rausing A, Sjoberg S, Westlin N: Imaging in chronic achilles tendinopathy: a comparison of ultrasonography, magnetic resonance imaging and surgical findings in 27 histologically verified cases. *Skeletal Radiol* 1996, 25(7):615-620.
110. Khan KM, Bonar F, Desmond PM, Cook JL, Young DA, Visentini PJ, Fehrmann MW, Kiss ZS, O'Brien PA, Harcourt PR, Dowling RJ, O'Sullivan RM, Crichton KJ, Tress BM, Wark JD: Patellar tendinosis (jumper's knee): findings at histopathologic examination, US, and MR imaging. Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Radiology* 1996, 200(3):821-827.
111. Pfirrmann CW, Jost B, Pirkel C, Aitzetmuller G, Lajtai G: Quadriceps tendinosis and patellar tendinosis in

- professional beach volleyball players: sonographic findings in correlation with clinical symptoms. *Eur Radiol* 2008, 18(8):1703-1709.
- 112.** McLoughlin RF, Raber EL, Vellet AD, Wiley JP, Bray RC: Patellar tendinitis: MR imaging features, with suggested pathogenesis and proposed classification. *Radiology* 1995, 197(3):843-848.
- 113.** Johnson DP, Wakeley CJ, Watt I: Magnetic resonance imaging of patellar tendonitis. *J Bone Joint Surg Br* 1996, 78(3):452-457.
- 114.** Cook JL, Khan KM, Kiss ZS, Purdam CR, Griffiths L: Reproducibility and clinical utility of tendon palpation to detect patellar tendinopathy in young basketball players. Victorian Institute of Sport tendon study group. *Br J Sports Med* 2001, 35(1):65-69.
- 115.** Robinson JM, Cook JL, Purdam C, Visentini PJ, Ross J, Maffulli N, Taunton JE, Khan KM, Victorian Institute Of Sport Tendon Study Group: The VISA-A questionnaire: a valid and reliable index of the clinical severity of Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med* 2001, 35(5):335-341.
- 116.** Gomez-Valero S, Garcia-Perez F, Florez-Garcia MT, Miangolarra-Page JC: A systematic review of self-administered questionnaires for the functional assessment of patients with knee disabilities adapted into Spanish. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2017, 61(2):96-103.
- 117.** Hernandez-Sanchez S, Hidalgo MD, Gomez A: Cross-cultural adaptation of VISA-P score for patellar tendinopathy in Spanish population. *J Orthop Sports Phys Ther* 2011, 41(8):581-591.
- 118.** Sánchez-Ibáñez JM: Fisiopatología de la regeneración de los tejidos blandos. En: *Fisioterapia del aparato locomotor*. Edited by Mc Graw Hill. Barcelona: 2005.
- 119.** Hope M, Saxby TS: Tendon healing. *Foot Ankle Clin* 2007, 12(4):553-67.
- 120.** Fantone JC.: Basic Concepts in inflammation. En *Sports-induced inflammation*. Edited by Leadbetter WB, Buckwater JA, Gordon SI. Park Ridge.: AAOS; 1990.
- 121.** Woo SL, Buckwalter JA: AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res* 1988, 6(6):907-931.
- 122.** Gigante A, Specchia N, Rapali S, Ventura A, de Palma L: Fibrillogenesis in tendon healing: an experimental study. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1996, 72(7-8):203-210.
- 123.** Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA: Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen* 2003, 11(1):46-54.
- 124.** Leadbetter WB: An introduction to sports-induced soft-tissue inflammation. En *Sports induced inflammation*. Edited by Leadbetter WB, Buckwater JA, Gordon SI. Park Ridge: AAOS; 1990.
- 125.** Jurado A MI: Respuesta de los tejidos a la lesión tendinosa. En: *Tendón. Valoración y tratamiento de fisioterapia*. Edited by Barcelona: Paidotribo; 2008:398-452.
- 126.** Postacchini F.: Procesi reparativi. En: Perugia L, Postacchini F, Ippolito R. *I Tendini, biologia, patologia, clinica*. Edited by Milán: Masson; 1985.
- 127.** Buckwalter JA, Hunziker EB: Orthopaedics. Healing of bones, cartilages, tendons, and ligaments: a new era. *Lancet* 1996, 348 Suppl 2:18.

- 128.** Platt MA: Tendon repair and healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2005, 22(4):553-60.
- 129.** Fu SC, Rolf C, Cheuk YC, Lui PP, Chan KM: Deciphering the pathogenesis of tendinopathy: a three-stages process. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 2010, 2:30-2555-2-30.
- 130.** Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, Werner S, Paganelli R: Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3):235.
- 131.** Magnusson SP, Langberg H, Kjaer M: The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to loading. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6(5):262-268.
- 132.** Cook JL, Purdam C: Is compressive load a factor in the development of tendinopathy? *Br J Sports Med* 2012, 46(3):163-168.
- 133.** Janssen I, van der Worp H, Hensing S, Zwerver J: Investigating Achilles and patellar tendinopathy prevalence in elite athletics. *Res Sports Med* 2018, 26(1):1-12.
- 134.** Aroen A, Helgo D, Granlund OG, Bahr R: Contralateral tendon rupture risk is increased in individuals with a previous Achilles tendon rupture. *Scand J Med Sci Sports* 2004, 14(1):30-33.
- 135.** Magnan B, Bondi M, Pierantoni S, Samaila E: The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot Ankle Surg* 2014, 20(3):154-159.
- 136.** Grau S, Maiwald C, Krauss I, Axmann D, Janssen P, Horstmann T: What are causes and treatment strategies for patellar-tendinopathy in female runners? *J Biomech* 2008, 41(9):2042-2046.
- 137.** Malliaras P, Cook JL, Kent PM: Anthropometric risk factors for patellar tendon injury among volleyball players. *Br J Sports Med* 2007, 41(4):259-263.
- 138.** Witvrouw E, Bellemans J, Lysens R, Danneels L, Cambier D: Intrinsic risk factors for the development of patellar tendinitis in an athletic population. A two-year prospective study. *Am J Sports Med* 2001, 29(2):190-195.
- 139.** Gaida JE, Ashe MC, Bass SL, Cook JL: Is adiposity an under-recognized risk factor for tendinopathy? A systematic review. *Arthritis Rheum* 2009, 61(6):840-849.
- 140.** Gaida JE, Cook JL, Bass SL, Austen S, Kiss ZS: Are unilateral and bilateral patellar tendinopathy distinguished by differences in anthropometry, body composition, or muscle strength in elite female basketball players? *Br J Sports Med* 2004, 38(5):581-585.
- 141.** Scott A, Zwerver J, Grewal N, de Sa A, Alktebi T, Granville DJ, Hart DA: Lipids, adiposity and tendinopathy: is there a mechanistic link? Critical review. *Br J Sports Med* 2015, 49(15):984-988.
- 142.** Culvenor AG, Cook JL, Warden SJ, Crossley KM: Infrapatellar fat pad size, but not patellar alignment, is associated with patellar tendinopathy. *Scand J Med Sci Sports* 2011, 21(6):405-411.
- 143.** Gaida JE, Cook JL, Bass SL: Adiposity and tendinopathy. *Disabil Rehabil* 2008, 30(20-22):1555-1562.
- 144.** Gaida JE, Alfredson H, Kiss ZS, Bass SL, Cook JL: Asymptomatic Achilles tendon pathology is associated with a central fat distribution in men and a peripheral fat distribution in women: a cross sectional study of 298 individuals. *BMC Musculoskelet Disord* 2010, 11:41-2474-11-41.
- 145.** Magra M, Maffulli N: Genetic aspects of tendinopathy. *J Sci Med Sport* 2008, 11(3):243-247.
- 146.** Mokone GG, Gajjar M, September AV, Schwellnus MP, Greenberg J, Noakes TD, Collins M: The guanine-thymine dinucleotide repeat polymorphism within the tenascin-C

- gene is associated with achilles tendon injuries. *Am J Sports Med* 2005, 33(7):1016-1021.
- 147.** Mokone GG, Schwellnus MP, Noakes TD, Collins M: The *COL5A1* gene and Achilles tendon pathology. *Scand J Med Sci Sports* 2006, 16(1):19-26.
- 148.** El Khoury L, Posthumus M, Collins M, Handley CJ, Cook J, Raleigh SM: Polymorphic variation within the *ADAMTS2*, *ADAMTS14*, *ADAMTS5*, *ADAM12* and *TIMP2* genes and the risk of Achilles tendon pathology: a genetic association study. *J Sci Med Sport* 2013, 16(6):493-498.
- 149.** Harvie P, Ostlere SJ, Teh J, McNally EG, Clipsham K, Burston BJ, Pollard TC, Carr AJ: Genetic influences in the aetiology of tears of the rotator cuff. Sibling risk of a full-thickness tear. *J Bone Joint Surg Br* 2004, 86(5):696-700.
- 150.** Gaida JE, Alfredson L, Kiss ZS, Wilson AM, Alfredson H, Cook JL: Dyslipidemia in Achilles tendinopathy is characteristic of insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc* 2009, 41(6):1194-1197.
- 151.** Visnes H, Bahr R: Training volume and body composition as risk factors for developing jumper's knee among young elite volleyball players. *Scand J Med Sci Sports* 2013, 23(5):607-613.
- 152.** Fernandez-Palazzi F, Rivas S, Mujica P: Achilles tendinitis in ballet dancers. *Clin Orthop Relat Res* 1990, (257):257-261.
- 153.** Kjaer M, Langberg H, Miller BF, Boushel R, Cramer R, Koskinen S, Heinemeier K, Olesen JL, Dossing S, Hansen M, Pedersen SG, Rennie MJ, Magnusson P: Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005, 5(1):41-52.
- 154.** Miller BF, Olesen JL, Hansen M, Dossing S, Cramer R, Welling RJ, Langberg H, Flyvbjerg A, Kjaer M, Babraj JA, Smith K, Rennie MJ: Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J Physiol* 2005, 567(Pt 3):1021-1033.
- 155.** McGarvey WC, Singh D, Trevino SG: Partial Achilles tendon ruptures associated with fluoroquinolone antibiotics: a case report and literature review. *Foot Ankle Int* 1996, 17(8):496-498.
- 156.** van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH: Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med* 2003, 163(15):1801-1807.
- 157.** Ferry ST, Dahners LE, Afshari HM, Weinhold PS: The effects of common anti-inflammatory drugs on the healing rat patellar tendon. *Am J Sports Med* 2007, 35(8):1326-1333.
- 158.** Marsolais D, Cote CH, Frenette J: Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. *Lab Invest* 2003, 83(7):991-999.
- 159.** Riley GP, Cox M, Harrall RL, Clements S, Hazleman BL: Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs in vitro. *J Hand Surg Br* 2001, 26(3):224-228.
- 160.** Tsai WC, Tang FT, Hsu CC, Hsu YH, Pang JH, Shiue CC: Ibuprofen inhibition of tendon cell proliferation and upregulation of the cyclin kinase inhibitor p21CIP1. *J Orthop Res* 2004, 22(3):586-591.

- 161.** Tsai WC, Hsu CC, Chou SW, Chung CY, Chen J, Pang JH: Effects of celecoxib on migration, proliferation and collagen expression of tendon cells. *Connect Tissue Res* 2007, 48(1):46-51.
- 162.** Magra M, Maffulli N: Nonsteroidal antiinflammatory drugs in tendinopathy: friend or foe. *Clin J Sport Med* 2006, 16(1):1-3.
- 163.** Astrom M, Westlin N: No effect of piroxicam on achilles tendinopathy. A randomized study of 70 patients. *Acta Orthop Scand* 1992, 63(6):631-634.
- 164.** Cook JL, Rio E, Purdam CR, Docking SI: Revisiting the continuum model of tendon pathology: what is its merit in clinical practice and research? *Br J Sports Med* 2016, 50(19):1187-1191.
- 165.** Lian O, Scott A, Engebretsen L, Bahr R, Duronio V, Khan K: Excessive apoptosis in patellar tendinopathy in athletes. *Am J Sports Med* 2007, 35(4):605-611.
- 166.** Scott A, Khan KM, Heer J, Cook JL, Lian O, Duronio V: High strain mechanical loading rapidly induces tendon apoptosis: an ex vivo rat tibialis anterior model. *Br J Sports Med* 2005, 39(5):25.
- 167.** Yang G, Rothrauff BB, Tuan RS: Tendon and ligament regeneration and repair: clinical relevance and developmental paradigm. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013, 99(3):203-222.
- 168.** Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ: Tendon healing: repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 2012, 14:47-71.
- 169.** Kraushaar BS, Nirschl RP: Tendinosis of the elbow (tennis elbow). Clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies. *J Bone Joint Surg Am* 1999, 81(2):259-278.
- 170.** Fu SC, Wang W, Pau HM, Wong YP, Chan KM, Rolf CG: Increased expression of transforming growth factor-beta1 in patellar tendinosis. *Clin Orthop Relat Res* 2002, 400:174-183.
- 171.** Alfredson H, Ohberg L: Neovascularisation in chronic painful patellar tendinosis--promising results after sclerosing neovessels outside the tendon challenge the need for surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005, 13(2):74-80.
- 172.** Alfredson H, Ohberg L, Forsgren S: Is vasculo-neural ingrowth the cause of pain in chronic Achilles tendinosis? An investigation using ultrasonography and colour Doppler, immunohistochemistry, and diagnostic injections. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003, 11(5):334-338.
- 173.** Knobloch K, Kraemer R, Lichtenberg A, Jagodzinski M, Gossling T, Richter M, Zeichen J, Hufner T, Krettek C: Achilles tendon and paratendon microcirculation in midportion and insertional tendinopathy in athletes. *Am J Sports Med* 2006, 34(1):92-97.
- 174.** Cook JL, Malliaras P, De Luca J, Ptasznik R, Morris ME, Goldie P: Neovascularization and pain in abnormal patellar tendons of active jumping athletes. *Clin J Sport Med* 2004, 14(5):296-299.
- 175.** Cook JL, Malliaras P, De Luca J, Ptasznik R, Morris M: Vascularity and pain in the patellar tendon of adult jumping athletes: a 5 month longitudinal study. *Br J Sports Med* 2005, 39(7):458-61; discussion 458-61.
- 176.** Scott A, Bahr R: Neuropeptides in tendinopathy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009, 14:2203-2211.
- 177.** Gisslen K, Alfredson H: Neovascularisation and pain in jumper's knee: a prospective clinical and sonographic study in elite junior volleyball players. *Br J Sports Med* 2005, 39(7):423-8; discussion 423-8.



- 178.** Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H: Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001, 9(4):233-238.
- 179.** Zanetti M, Metzdorf A, Kundert HP, Zollinger H, Vienne P, Seifert B, Hodler J: Achilles tendons: clinical relevance of neovascularization diagnosed with power Doppler US. *Radiology* 2003, 227(2):556-560.
- 180.** Pingel J, Fredberg U, Qvortrup K, Larsen J, Scherling P, Heinemeir K, Kjaer M, Langberg H: Local biochemical and morphological differences in human Achilles tendinopathy: a case control study. *BMC Musculoskelet Disord* 2012, 13:53.
- 181.** Cook JL, Khan KM, Kiss ZS, Griffiths L: Patellar tendinopathy in junior basketball players: a controlled clinical and ultrasonographic study of 268 patellar tendons in players aged 14-18 years. *Scand J Med Sci Sports* 2000, 10(4):216-220.
- 182.** Cook JL, Khan KM, Kiss ZS, Purdam CR, Griffiths L: Prospective imaging study of asymptomatic patellar tendinopathy in elite junior basketball players. *J Ultrasound Med* 2000, 19(7):473-479.
- 183.** Scott A, Cook JL, Hart DA, Walker DC, Duronio V, Khan KM: Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis Rheum* 2007, 56(3):871-881.
- 184.** Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ: Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon. *Matrix Biol* 2004, 23(2):127-140.
- 185.** Parkinson J, Samiric T, Ilic MZ, Cook J, Handley CJ: Involvement of proteoglycans in tendinopathy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2011, 11(2):86-93.
- 186.** Fredberg U, Bolvig L: Significance of ultrasonographically detected asymptomatic tendinosis in the patellar and achilles tendons of elite soccer players: a longitudinal study. *Am J Sports Med* 2002, 30(4):488-491.
- 187.** Khan KM, Cook JL, Kiss ZS, Visentini PJ, Fehrmann MW, Harcourt PR, Tress BW, Wark JD: Patellar tendon ultrasonography and jumper's knee in female basketball players: a longitudinal study. *Clin J Sport Med* 1997, 7(3):199-206.
- 188.** Docking SI, Cook J: Pathological tendons maintain sufficient aligned fibrillar structure on ultrasound tissue characterization (UTC). *Scand J Med Sci Sports* 2016, 26(6):675-683.
- 189.** Rosengarten SD, Cook JL, Bryant AL, Cordy JT, Daffy J, Docking SI: Australian football players' Achilles tendons respond to game loads within 2 days: an ultrasound tissue characterisation (UTC) study. *Br J Sports Med* 2015, 49(3):183-187.
- 190.** Jozsa L, Reffy A, Kannus P, Demel S, Elek E: Pathological alterations in human tendons. *Arch Orthop Trauma Surg* 1990, 110(1):15-21.
- 191.** Malliaras P, Cook J: Patellar tendons with normal imaging and pain: change in imaging and pain status over a volleyball season. *Clin J Sport Med* 2006, 16(5):388-391.
- 192.** Malliaras P, Cook J, Ptasznik R, Thomas S: Prospective study of change in patellar tendon abnormality on imaging and pain over a volleyball season. *Br J Sports Med* 2006, 40(3):272-274.
- 193.** Clancy WGJ: Failed Healing responses. *En Sports-induced inflammation: clinical and basic science concepts*. Edited by Leadbetter WB,

- Buckwalter JA, Gordon SL, Park Ridge: AAOS; 1989.
- 194.** Backman C, Boquist L, Friden J, Lorentzon R, Toolanen G: Chronic achilles paratenonitis with tendinosis: an experimental model in the rabbit. *J Orthop Res* 1990, 8(4):541-547.
- 195.** Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE: Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg* 2000, 9(2):79-84.
- 196.** Haker E, Theodorsson E, Lundeberg T: An experimental study of the neurogenic and the immunological contribution to "tennis elbow" in rats. *Inflammation* 1997, 21(1):35-44.
- 197.** Astrom M: Partial rupture in chronic achilles tendinopathy. A retrospective analysis of 342 cases. *Acta Orthop Scand* 1998, 69(4):404-407.
- 198.** Scott A, Khan KM, Cook JL, Duronio V: What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med* 2004, 38(3):248-249.
- 199.** Fredberg U, Bolvig L, Andersen NT: Prophylactic training in asymptomatic soccer players with ultrasonographic abnormalities in Achilles and patellar tendons: the Danish Super League Study. *Am J Sports Med* 2008, 36(3):451-460.
- 200.** Rudavsky A, Cook J: Physiotherapy management of patellar tendinopathy (jumper's knee). *J Physiother* 2014, 60(3):122-129.
- 201.** Hustedt JW, Harmsen SM, Lederman ES: Letter to the Editor regarding Kolk et al: "Does acromioplasty result in favorable clinical and radiologic outcomes in the management of chronic subacromial pain syndrome? A double-blinded clinical trial with 9 to 14 years' follow-up". *J Shoulder Elbow Surg* 2018, 27(3):82-83.
- 202.** Kirkpatrick J, Yassaie O, Mirjalili SA: The plantar calcaneal spur: a review of anatomy, histology, etiology and key associations. *J Anat* 2017, 230(6):743-751.
- 203.** Danielson P, Alfredson H, Forsgren S: Distribution of general (PGP 9.5) and sensory (substance P/CGRP) innervations in the human patellar tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006, 14(2):125-132.
- 204.** Alfredson H, Ohberg L: Sclerosing injections to areas of neo-vascularisation reduce pain in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomised controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005, 13(4):338-344.
- 205.** Alfredson H, Ohberg L, Zeisig E, Lorentzon R: Treatment of midportion Achilles tendinosis: similar clinical results with US and CD-guided surgery outside the tendon and sclerosing polidocanol injections. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007, 15(12):1504-1509.
- 206.** Kristoffersen M, Ohberg L, Johnston C, Alfredson H: Neovascularisation in chronic tendon injuries detected with colour Doppler ultrasound in horse and man: implications for research and treatment. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005, 13(6):505-508.
- 207.** Cook JL, Purdam CR: Rehabilitation of lower limb tendinopathies. *Clin Sports Med* 2003, 22(4):777-789.
- 208.** Wilson J, Sevier T, Helfst R, Honing E, Thomann A: Comparison of rehabilitation methods in the treatment of patellar tendinitis. *J Sport Rehabil* 2000, 9:314-314.
- 209.** Andres BM, Murrell GA: Treatment of tendinopathy: what works, what

does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 2008, 466(7):1539-1554.

**210.** Reinking MF: Current Concepts in the Treatment of Patellar Tendinopathy. *Int J Sports Phys Ther* 2016, 11(6):854-866.

**211.** Rivenburgh DW: Physical modalities in the treatment of tendon injuries. *Clin Sports Med* 1992, 11(3):645-659.

**212.** Cook JL, Khan KM, Harcourt PR, Grant M, Young DA, Bonar SF: A cross sectional study of 100 athletes with jumper's knee managed conservatively and surgically. The Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Br J Sports Med* 1997, 31(4):332-336.

**213.** Rosso F, Bonasia DE, Marmotti A, Cottino U, Rossi R: Mechanical Stimulation (Pulsed Electromagnetic Fields "PEMF" and Extracorporeal Shock Wave Therapy "ESWT") and Tendon Regeneration: A Possible Alternative. *Front Aging Neurosci* 2015, 7:211.

**214.** Saxena A, Ramdath S Jr, O'Halloran P, Gerdesmeyer L, Gollwitzer H: Extra-corporeal pulsed-activated therapy ("EPAT" sound wave) for Achilles tendinopathy: a prospective study. *J Foot Ankle Surg* 2011, 50(3):315-319.

**215.** van der Worp H, van den Akker-Scheek I, van Schie H, Zwerver J: ESWT for tendinopathy: technology and clinical implications. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013, 21(6):1451-1458.

**216.** Wei M, Liu Y, Li Z, Wang Z: Comparison of Clinical Efficacy Among Endoscopy-Assisted Radio-Frequency Ablation, Extracorporeal Shockwaves, and Eccentric Exercises in Treatment of Insertional Achilles Tendinosis. *J Am Podiatr Med Assoc* 2017, 107(1):11-16.

**217.** Mattiussi G, Moreno C: Treatment of proximal hamstring tendinopathy-related sciatic nerve entrapment: presentation of an ultrasound-guided "Intratissue Percutaneous Electrolysis" application. *Muscles Ligaments Tendons J* 2016, 6(2):248-252.

**218.** Moreno C, Mattiussi G, Nunez FJ: Therapeutic results after ultrasound-guided intratissue percutaneous electrolysis (EPI®) in the treatment of rectus abdominis-related groin pain in professional footballers: a pilot study. *J Sports Med Phys Fitness* 2016, 56(10):1171-1178.

**219.** Moreno C, Mattiussi G, Nunez FJ, Messina G, Rejc E: Intratissue percutaneous electrolysis combined with active physical therapy for the treatment of adductor longus enthesopathy-related groin pain: a randomized trial. *J Sports Med Phys Fitness* 2017, 57(10):1318-1329.

**220.** Carcia CR, Martin R, Civitello M: Ultrasound efficacy. *Phys Ther* 2004, 84(10):982-987.

**221.** Fu SC, Shum WT, Hung LK, Wong MW, Qin L, Chan KM: Low-intensity pulsed ultrasound on tendon healing: a study of the effect of treatment duration and treatment initiation. *Am J Sports Med* 2008, 36(9):1742-1749.

**222.** Sandmeier R, Renstrom PA: Diagnosis and treatment of chronic tendon disorders in sports. *Scand J Med Sci Sports* 1997, 7(2):96-106.

**223.** Warden SJ, Metcalf BR, Kiss ZS, Cook JL, Purdam CR, Bennell KL, Crossley KM: Low-intensity pulsed ultrasound for chronic patellar tendinopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47(4):467-471.

**224.** Silbernagel KG, Thomee R, Eriksson BI, Karlsson J: Continued sports activity, using a pain-monitoring

- model, during rehabilitation in patients with Achilles tendinopathy: a randomized controlled study. *Am J Sports Med* 2007, 35(6):897-906.
- 225.** Melzack R WPD: Pain Mechanism: A New Theory. A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and reponse. *Science* 1965, 150:971-979.
- 226.** Rodríguez Martín JM: En *Electroterapia en fisioterapia*. Edited by Madrid: Panamericana; 2004.
- 227.** Palmer S MD: Corriente interferencial. En *Electroterapia práctica basada en la evidencia*. Edited by Barcelona: Elsevier; 2009:297-315.
- 228.** MacAuley D: Do textbooks agree on their advice on ice? *Clin J Sport Med* 2001, 11(2):67-72.
- 229.** Crystal NJ, Townson DH, Cook SB, LaRoche DP: Effect of cryotherapy on muscle recovery and inflammation following a bout of damaging exercise. *Eur J Appl Physiol* 2013, 113(10):2577-2586.
- 230.** Swenson C, Sward L, Karlsson J: Cryotherapy in sports medicine. *Scand J Med Sci Sports* 1996, 6(4):193-200.
- 231.** Knobloch K, Grasemann R, Jagodzinski M, Richter M, Zeichen J, Krettek C: Changes of Achilles midportion tendon microcirculation after repetitive simultaneous cryotherapy and compression using a Cryo/Cuff. *Am J Sports Med* 2006, 34(12):1953-1959.
- 232.** Senbursa G, Baltaci G, Atay OA: The effectiveness of manual therapy in supraspinatus tendinopathy. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2011, 45(3):162-167.
- 233.** Dean BJ, Gettings P, Dakin SG, Carr AJ: Are inflammatory cells increased in painful human tendinopathy? A systematic review. *Br J Sports Med* 2016, 50(4):216-220.
- 234.** Coombes BK, Bisset L, Vicenzino B: Efficacy and safety of corticosteroid injections and other injections for management of tendinopathy: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2010, 376(9754):1751-1767.
- 235.** Skjong CC, Meininger AK, Ho SS: Tendinopathy treatment: where is the evidence? *Clin Sports Med* 2012, 31(2):329-350.
- 236.** Zhang B, Hu ST, Zhang YZ: Spontaneous rupture of multiple extensor tendons following repeated steroid injections: a case report. *Orthop Surg* 2012, 4(2):118-121.
- 237.** Gill SS, Gelbke MK, Mattson SL, Anderson MW, Hurwitz SR: Fluoroscopically guided low-volume peritendinous corticosteroid injection for Achilles tendinopathy. A safety study. *J Bone Joint Surg Am* 2004, 86(4):802-806.
- 238.** Ohberg L, Alfredson H: Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. *Br J Sports Med* 2002, 36(3):173-177.
- 239.** Clementson M, Loren I, Dahlberg L, Astrom M: Sclerosing injections in midportion Achilles tendinopathy: a retrospective study of 25 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008, 16(9):887-890.
- 240.** Willberg L, Sunding K, Ohberg L, Forsblad M, Fahlstrom M, Alfredson H: Sclerosing injections to treat midportion Achilles tendinosis: a randomised controlled study evaluating two different concentrations of Polidocanol. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008, 16(9):859-864.
- 241.** Alfredson H, Cook J: A treatment algorithm for managing Achilles tendinopathy: new treatment options. *Br J Sports Med* 2007, 41(4):211-216.

- 242.** Bleakley CM, Costello JT: Do thermal agents affect range of movement and mechanical properties in soft tissues? A systematic review. *Arch Phys Med Rehabil* 2013, 94(1):149-163.
- 243.** Ichinoseki-Sekine N, Naito H, Saga N, Ogura Y, Shiraishi M, Giombini A, Giovannini V, Katamoto S: Effects of Microwave Hyperthermia at Two Different Frequencies (434 and 2450 MHz) on Human Muscle Temperature. *J Sports Sci Med* 2008, 7(1):191-193.
- 244.** Giombini A, Giovannini V, Di Cesare A, Pacetti P, Ichinoseki-Sekine N, Shiraishi M, Naito H, Maffulli N: Hyperthermia induced by microwave diathermy in the management of muscle and tendon injuries. *Br Med Bull* 2007, 83:379-396.
- 245.** Giombini A, Di Cesare A, Safran MR, Ciatti R, Maffulli N: Short-term effectiveness of hyperthermia for supraspinatus tendinopathy in athletes: a short-term randomized controlled study. *Am J Sports Med* 2006, 34(8):1247-1253.
- 246.** Webster DF, Harvey W, Dyson M, Pond JB: The role of ultrasound-induced cavitation in the 'in vitro' stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts. *Ultrasonics* 1980, 18(1):33-37.
- 247.** Enwemeka CS: The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil* 1989, 68(6):283-287.
- 248.** D'Vaz AP, Ostor AJ, Speed CA, Jenner JR, Bradley M, Prevost AT, Hazleman BL: Pulsed low-intensity ultrasound therapy for chronic lateral epicondylitis: a randomized controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* 2006, 45(5):566-570.
- 249.** Robertson VJ, Baker KG: A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. *Phys Ther* 2001, 81(7):1339-1350.
- 250.** Binder A, Hodge G, Greenwood AM, Hazleman BL, Page Thomas DP: Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesions? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985, 290(6467):512-514.
- 251.** Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, David Baxter G: Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. *J Athl Train* 2004, 39(3):223-229.
- 252.** Baxter GD, Bell AJ, Allen JM, Ravey J.: Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. *Physiotherapy* 1991, 77:171-178.
- 253.** Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RA: Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res* 2012, 30(12):1945-1951.
- 254.** Tsai WC, Hsu CC, Pang JH, Lin MS, Chen YH, Liang FC: Low-level laser irradiation stimulates tenocyte migration with up-regulation of dynamin II expression. *PLoS One* 2012, 7(5):e38235.
- 255.** Baxter GD: Tratamiento con láser de baja intensidad. En *Electroterapia práctica basada en la evidencia*. Edited by Barcelona: Elsevier; 2009:161-177.
- 256.** Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS: Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil* 1997, 76(4):288-296.
- 257.** Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS: Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit

- Achilles tendons. *Lasers Surg Med* 1998, 22(5):281-287.
- 258.** Chow RT, Barnsley L: Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med* 2005, 37(1):46-52.
- 259.** Bjordal JM, Couppe C, Chow RT, Tuner J, Ljunggren EA: A systematic review of low-level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother* 2003, 49(2):107-116.
- 260.** Eslamian F, Shakouri SK, Ghojzadeh M, Nobari OE, Eftekharsadat B: Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. *Lasers Med Sci* 2012, 27(5):951-958.
- 261.** Tumilty S, McDonough S, Hurley DA, Baxter GD: Clinical effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to eccentric exercise for the treatment of Achilles' tendinopathy: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2012, 93(5):733-739.
- 262.** Bjordal JM, Lopes-Martins RA, Joensen J, Couppe C, Ljunggren AE, Stergioulas A, Johnson MI: A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low-level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). *BMC Musculoskelet Disord* 2008, 9:75-2474-9-75.
- 263.** Cyriax JCM: *Textbook of orthopaedic medicine, massage and injection*. London: Bailliere Tindall; 1984. Editorial: Harcourt Publishers, 1971.
- 264.** Gehlsen GM, Ganion LR, Helfst R: Fibroblast responses to variation in soft tissue mobilization pressure. *Med Sci Sports Exerc* 1999, 31(4):531-535.
- 265.** Joseph MF, Taft K, Moskwa M, Denegar CR: Deep friction massage to treat tendinopathy: a systematic review of a classic treatment in the face of a new paradigm of understanding. *J Sport Rehabil* 2012, 21(4):343-353.
- 266.** Loew LM, Brosseau L, Tugwell P, Wells GA, Welch V, Shea B, Poitras S, De Angelis G, Rahman P: Deep transverse friction massage for treating lateral elbow or lateral knee tendinitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014, (11):CD003528.
- 267.** Brosseau L, Casimiro L, Milne S, Robinson V, Shea B, Tugwell P, Wells G: Deep transverse friction massage for treating tendinitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2002, (4):CD003528.
- 268.** Graff J, Richter K, Pastor J: Wirkung von hochenergetischen Stosswellen auf Knochengewebe. *Verh Dtsch Ges f Urologie*. 1987, 39:76.
- 269.** Haupt G: Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol* 1997, 158(1):4-11.
- 270.** Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS: Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF-beta1 and IGF-I expression. *J Orthop Res* 2004, 22(4):854-861.
- 271.** Bosch G, Lin YL, van Schie HT, van De Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR: Effect of extracorporeal shock wave therapy on the biochemical composition and metabolic activity of tenocytes in normal tendinous structures in ponies. *Equine Vet J* 2007, 39(3):226-231.
- 272.** Wang CJ, Ko JY, Chan YS, Weng LH, Hsu SL: Extracorporeal shockwave for chronic patellar tendinopathy. *Am J Sports Med* 2007, 35(6):972-978.
- 273.** van Leeuwen MT, Zwerver J, van den Akker-Scheek I: Extracorporeal shockwave therapy for patellar

- tendinopathy: a review of the literature. *Br J Sports Med* 2009, 43(3):163-168.
- 274.** Thijs KM, Zwerver J, Backx FJ, Steeneken V, Rayer S, Groenenboom P, Moen MH: Effectiveness of Shockwave Treatment Combined With Eccentric Training for Patellar Tendinopathy: A Double-Blinded Randomized Study. *Clin J Sport Med* 2017, 27(2):89-96.
- 275.** Perlick L, Korth O, Wallny T, Wagner U, Hesse A, Schmitt O: The mechanical effects of shock waves in extracorporeal shock wave treatment of calcific tendinitis - an in vitro model. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999, 137(1):10-16.
- 276.** Al-Abbad H, Simon JV: The effectiveness of extracorporeal shock wave therapy on chronic achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot Ankle Int* 2013, 34(1):33-41.
- 277.** Bannuru RR, Flavin NE, Vaysbrot E, Harvey W, McAlindon T: High-energy extracorporeal shock-wave therapy for treating chronic calcific tendinitis of the shoulder: a systematic review. *Ann Intern Med* 2014, 160(8):542-549.
- 278.** Korakakis V, Whiteley R, Tzavara A, Malliaropoulos N: The effectiveness of extracorporeal shockwave therapy in common lower limb conditions: a systematic review including quantification of patient-rated pain reduction. *Br J Sports Med* 2018, 52(6):387-407.
- 279.** Speed C: A systematic review of shockwave therapies in soft tissue conditions: focusing on the evidence. *Br J Sports Med* 2014, 48(21):1538-1542.
- 280.** Chung B, Wiley JP: Extracorporeal shockwave therapy: a review. *Sports Med* 2002, 32(13):851-865.
- 281.** Zwerver J, Verhagen E, Hartgens F, van den Akker-Scheek I, Diercks RL: The TOPGAME-study: effectiveness of extracorporeal shockwave therapy in jumping athletes with patellar tendinopathy. Design of a randomised controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2010, 11:28-2474-11-28.
- 282.** Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I: Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 2009, 39(5):345-354.
- 283.** Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA: Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 2009, 37(11):2259-2272.
- 284.** Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A: Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med* 2009, 28(1):113-125.
- 285.** Creaney L, Wallace A, Curtis M, Connell D: Growth factor-based therapies provide additional benefit beyond physical therapy in resistant elbow tendinopathy: a prospective, single-blind, randomised trial of autologous blood injections versus platelet-rich plasma injections. *Br J Sports Med* 2011, 45(12):966-971.
- 286.** Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M: Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011, 19(4):516-527.
- 287.** Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M: Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop* 2010, 34(6):909-915.
- 288.** Chen X, Jones IA, Park C, Vangsness CT Jr: The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing: A Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment. *Am J Sports Med* 2018, 46(8):2020-2032.
- 289.** Dupley L, Charalambous CP: Platelet-Rich Plasma Injections as a Treatment for Refractory Patellar

- Tendinosis: A Meta-Analysis of Randomised Trials. *Knee Surg Relat Res* 2017, 29(3):165-171.
- 290.** Erroi D, Sigona M, Suarez T, Trischitta D, Pavan A, Vulpiani MC, Vetrano M: Conservative treatment for Insertional Achilles Tendinopathy: platelet-rich plasma and focused shock waves. A retrospective study. *Muscles Ligaments Tendons J* 2017, 7(1):98-106.
- 291.** Lin MT, Chiang CF, Wu CH, Hsu HH, Tu YK: Meta-analysis Comparing Autologous Blood-Derived Products (Including Platelet-Rich Plasma) Injection Versus Placebo in Patients With Achilles Tendinopathy. *Arthroscopy* 2018, 34(6):1966-1975.
- 292.** Miller LE, Parrish WR, Roides B, Bhattacharyya S: Efficacy of platelet-rich plasma injections for symptomatic tendinopathy: systematic review and meta-analysis of randomised injection-controlled trials. *BMJ Open Sport Exerc Med* 2017, 3(1):e000237.
- 293.** Zhang YJ, Xu SZ, Gu PC, Du JY, Cai YZ, Zhang C, Lin XJ: Is Platelet-rich Plasma Injection Effective for Chronic Achilles Tendinopathy? A Meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2018, 476(8):1633- 41.
- 294.** Sinnott C, White HM, Cuchna JW, Van Lunen BL: Autologous Blood and Platelet-Rich Plasma Injections in the Treatment of Achilles Tendinopathy: A Critically Appraised Topic. *J Sport Rehabil* 2017, 26(3):279-285.
- 295.** Gulotta LV, Chaudhury S, Wiznia D: Stem cells for augmenting tendon repair. *Stem Cells Int* 2012, 291431.
- 296.** Pascual-Garrido C, Rolon A, Makino A: Treatment of chronic patellar tendinopathy with autologous bone marrow stem cells: a 5-year-followup. *Stem Cells Int* 2012, 953510.
- 297.** Wagner JR, Taguchi T, Cho JY, Charavaryamath C, Griffon DJ: Evaluation of Stem Cell Therapies in a Bilateral Patellar Tendon Injury Model in Rats. *J Vis Exp* 2018, (133). doi(133):10.3791/56810.
- 298.** Liu L, Hindieh J, Leong DJ, Sun HB: Advances of stem cell based-therapeutic approaches for tendon repair. *J Orthop Translat* 2017, 9:69-75.
- 299.** Goldberg AJ, Zaidi R, Brooking D, Kim L, Korda M, Masci L, Green R, O'Donnell P, Smith R: Autologous Stem Cells in Achilles Tendinopathy (ASCAT): protocol for a phase IIA, single-centre, proof-of-concept study. *BMJ Open* 2018, 8(5):e021600-2018-021600.
- 300.** Koskinen SO, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M: Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. *J Appl Physiol* (1985) 2004, 96(3):861-864.
- 301.** Kjaer M: Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004, 84(2):649-698.
- 302.** Stanish WD, Rubinovich RM, Curwin S: Eccentric exercise in chronic tendinitis. *Clin Orthop Relat Res* 1986, 208:65-68.
- 303.** Fyfe I, Stanish WD: The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clin Sports Med* 1992, 11(3):601-624.
- 304.** Alfredson H, Pietila T, Jonsson P, Lorentzon R: Heavy-load eccentric calf muscle training for the treatment of chronic Achilles tendinosis. *Am J Sports Med* 1998, 26(3):360-366.
- 305.** Fahlstrom M, Jonsson P, Lorentzon R, Alfredson H: Chronic Achilles tendon pain treated with eccentric calf-muscle training. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003, 11(5):327-333.



- 306.** Stanton P, Purdham C: Hamstring injuries in sprinting - the role of eccentric exercise. *J Orthop Sports Phys Ther* 1989, 10(9):343-349.
- 307.** Purdam CR, Jonsson P, Alfredson H, Lorentzon R, Cook JL, Khan KM: A pilot study of the eccentric decline squat in the management of painful chronic patellar tendinopathy. *Br J Sports Med* 2004, 38(4):395-397.
- 308.** Alfredson H: The chronic painful Achilles and patellar tendon: research on basic biology and treatment. *Scand J Med Sci Sports* 2005, 15(4):252-259.
- 309.** Alfredson H, Lorentzon R: Intratendinous glutamate levels and eccentric training in chronic Achilles tendinosis: a prospective study using microdialysis technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003, 11(3):196-199.
- 310.** Langberg H, Ellingsgaard H, Madsen T, Jansson J, Magnusson SP, Aagaard P, Kjaer M: Eccentric rehabilitation exercise increases peritendinous type I collagen synthesis in humans with Achilles tendinosis. *Scand J Med Sci Sports* 2007, 17(1):61-66.
- 311.** Wasielewski NJ, Kotsko KM: Does eccentric exercise reduce pain and improve strength in physically active adults with symptomatic lower extremity tendinosis? A systematic review. *J Athl Train* 2007, 42(3):409-421.
- 312.** Ohberg L, Alfredson H: Effects on neovascularisation behind the good results with eccentric training in chronic mid-portion Achilles tendinosis? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004, 12(5):465-470.
- 313.** Ohberg L, Lorentzon R, Alfredson H: Eccentric training in patients with chronic Achilles tendinosis: normalised tendon structure and decreased thickness at follow up. *Br J Sports Med* 2004, 38(1):8-11.
- 314.** Mafi N, Lorentzon R, Alfredson H: Superior short-term results with eccentric calf muscle training compared to concentric training in a randomized prospective multicenter study on patients with chronic Achilles tendinosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001, 9(1):42-47.
- 315.** Visnes H, Bahr R: The evolution of eccentric training as treatment for patellar tendinopathy (jumper's knee): a critical review of exercise programmes. *Br J Sports Med* 2007, 41(4):217-223.
- 316.** Naugle KM, Fillingim RB, Riley JL, 3rd: A meta-analytic review of the hypoalgesic effects of exercise. *J Pain* 2012, 13(12):1139-1150.
- 317.** Rio E, Kidgell D, Purdam C, Gaida J, Moseley GL, Pearce AJ, Cook J: Isometric exercise induces analgesia and reduces inhibition in patellar tendinopathy. *Br J Sports Med* 2015, 49(19):1277-1283.
- 318.** Cook JL, Purdam CR: The challenge of managing tendinopathy in competing athletes. *Br J Sports Med* 2014, 48(7):506-509.
- 319.** Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N: Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med* 2002, 36(4):239-249.
- 320.** Kannus P, Jozsa L: Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1991, 73(10):1507-1525.
- 321.** Sussmilch-Leitch SP, Collins NJ, Bialocerkowski AE, Warden SJ, Crossley KM: Physical therapies for Achilles tendinopathy: systematic review and meta-analysis. *J Foot Ankle Res* 2012, 5(1):15-1146-5-15.
- 322.** Magnussen RA, Dunn WR, Thomson AB: Nonoperative treatment of midportion Achilles tendinopathy: a

- systematic review. *Clin J Sport Med* 2009, 19(1):54-64.
- 323.** Coleman BD, Khan KM, Maffulli N, Cook JL, Wark JD: Studies of surgical outcome after patellar tendinopathy: clinical significance of methodological deficiencies and guidelines for future studies. Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Scand J Med Sci Sports* 2000, 10(1):2-11.
- 324.** Coleman BD, Khan KM, Kiss ZS, Bartlett J, Young DA, Wark JD: Open and arthroscopic patellar tenotomy for chronic patellar tendinopathy. A retrospective outcome study. Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Am J Sports Med* 2000, 28(2):183-190.
- 325.** Nirschl RP: Surgical aspects of tennis elbow tendinosis. *J Back Musculoskelet Rehabil* 1994, 4(1):55-61.
- 326.** Nirschl RP, Pettrone FA: Tennis elbow. The surgical treatment of lateral epicondylitis. *J Bone Joint Surg Am* 1979, 61(6A):832-839.
- 327.** Orava S, Osterback L, Hurme M: Surgical treatment of patellar tendon pain in athletes. *Br J Sports Med* 1986, 20(4):167-169.
- 328.** Alfredson H, Spang C: Clinical presentation and surgical management of chronic Achilles tendon disorders - A retrospective observation on a set of consecutive patients being operated by the same orthopedic surgeon. *Foot Ankle Surg* 2018, 24(6):490-494.
- 329.** Lungu E, Grondin P, Tetreault P, Desmeules F, Cloutier G, Choiniere M, Bureau NJ: Ultrasound-guided tendon fenestration versus open-release surgery for the treatment of chronic lateral epicondylitis of the elbow: protocol for a prospective, randomised, single blinded study. *BMJ Open* 2018, 8(6):e021373-2017-021373.
- 330.** Sanchez PJ, Grady JF, Saxena A: Percutaneous Ultrasonic Tenotomy for Achilles Tendinopathy Is a Surgical Procedure With Similar Complications. *J Foot Ankle Surg* 2017, 56(5):982-984.
- 331.** Cook JL, Khan KM: What is the most appropriate treatment for patellar tendinopathy? *Br J Sports Med* 2001, 35(5):291-294.
- 332.** Rees JD, Maffulli N, Cook J: Management of tendinopathy. *Am J Sports Med* 2009, 37(9):1855-1867.
- 333.** Bahr R, Fossan B, Loken S, Engebretsen L: Surgical treatment compared with eccentric training for patellar tendinopathy (Jumper's Knee). A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 2006, 88(8):1689-1698.
- 334.** Willberg L, Sunding K, Forssblad M, Alfredson H: Ultrasound- and Doppler-guided arthroscopic shaving to treat Jumper's knee: a technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007, 15(11):1400-1403.
- 335.** Willberg L, Sunding K, Forssblad M, Fahlstrom M, Alfredson H: Sclerosing polidocanol injections or arthroscopic shaving to treat patellar tendinopathy/jumper's knee? A randomised controlled study. *Br J Sports Med* 2011, 45(5):411-415.
- 336.** Cannell LJ, Taunton JE, Clement DB, Smith C, Khan KM: A randomised clinical trial of the efficacy of drop squats or leg extension/leg curl exercises to treat clinically diagnosed jumper's knee in athletes: pilot study. *Br J Sports Med* 2001, 35(1):60-64.
- 337.** Anonymous Achilles Pain, Stiffness, and Muscle Power Deficits: Midportion Achilles Tendinopathy Revision 2018: Using the Evidence to Guide Physical Therapist Practice. *J Orthop Sports Phys Ther* 2018, 48(5):425-426.
- 338.** Lucado AM, Dale RB, Vincent J, Day JM: Do joint mobilizations assist in the recovery of lateral elbow tendinopathy? A systematic review and

- meta-analysis. *J Hand Ther* 2018, 32(1): e4-e5.
- 339.** Sánchez-Ibáñez J: Terapia acelerada de la tendinopatía rotuliana del deportista mediante la técnica de Electrólisis Percutánea Transtendinosa (EPI). *efisioterapia net* 2003.
- 340.** Espejo-Antunez L, Tejada JF, Albornoz-Cabello M, Rodriguez-Mansilla J, de la Cruz-Torres B, Ribeiro F, Silva AG: Dry needling in the management of myofascial trigger points: A systematic review of randomized controlled trials. *Complement Ther Med* 2017, 33:46-57.
- 341.** Sánchez-Ibáñez JM, Colmena C, Benabent J, Garcia-Herreros S, Valles SL: New Technique in Tendon Sport Recovery. Percutaneous Electrolysis Intratissue (EPI®). *Int J Phys Med Rehabil* 2013, 113.
- 342.** Sánchez-Ibáñez JM: Evolución clínica en el tratamiento de la entesopatía rotuliana crónica mediante electroestimulación percutánea ecodirigida: estudio de una serie de casos en población deportiva. Tesis doctoral. Universidad de León. 2013.
- 343.** Ehl RG, Ihde AJ: Faraday's electrochemical laws and the determination of equivalent weights. *J Chem Educ* 1954, 31(5):226.
- 344.** Sánchez-Ibáñez JM: Ultrasound guided percutaneous electrolysis (EPI®) in patients with chronic insertional patellar tendinopathy: a pilot study. *13th ESSKA 2000 Congress-May* 2008, 21-24.
- 345.** Abat F, Valles SL, Gelber PE, Polidori F, Stitik TP, Garcia-Herreros S, Monllau JC, Sanchez-Ibanez JM: Molecular repair mechanisms using the Intratissue Percutaneous Electrolysis technique in patellar tendonitis. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2014, 58(4):201-205.
- 346.** Cook JL, Khan KM, Harcourt PR, Kiss ZS, Fehrmann MW, Griffiths L, Wark JD: Patellar tendon ultrasonography in asymptomatic active athletes reveals hypoechoic regions: a study of 320 tendons. Victorian Institute of Sport Tendon Study Group. *Clin J Sport Med* 1998, 8(2):73-77.
- 347.** Cook JL, Khan KM, Kiss ZS, Coleman BD, Griffiths L: Asymptomatic hypoechoic regions on patellar tendon ultrasound: A 4-year clinical and ultrasound followup of 46 tendons. *Scand J Med Sci Sports* 2001, 11(6):321-327.
- 348.** Arias-Buria JL, Truyols-Dominguez S, Valero-Alcaide R, Salom-Moreno J, Atin-Arratibel MA, Fernandez-de-Las-Penas C: Ultrasound-Guided Percutaneous Electrolysis and Eccentric Exercises for Subacromial Pain Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 2015:315219.
- 349.** Lopez-Martos R, Gonzalez-Perez LM, Ruiz-Canela-Mendez P, Urresti-Lopez FJ, Gutierrez-Perez JL, Infante-Cossio P: Randomized, double-blind study comparing percutaneous electrolysis and dry needling for the management of temporomandibular myofascial pain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018, 23(4):e454-e462.
- 350.** Sánchez-Ibáñez J: A Molecular Mechanisms of Regeneration in Chronic Tendinopathy Using Ultrasound-Guided Intratissue Percutaneous Electrolysis (EPI®). *Medcrave* 2017, 5(1):31.
- 351.** Sánchez Sánchez JL: Estudio comparativo de un tratamiento fisioterápico convencional con uno que incluye la técnica Electrólisis Percutánea Intratissular en los pacientes con tendinopatía crónica del tendón

- rotuliano. Universidad de Salamanca. 2011.
- 352.** Lui PP, Maffulli N, Rolf C, Smith RK: What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports* 2011, 21(1):3-17.
- 353.** Fu SC, Chan KM, Chan LS, Fong DT, Lui PY: The use of motion analysis to measure pain-related behaviour in a rat model of degenerative tendon injuries. *J Neurosci Methods* 2009, 179(2):309-318.
- 354.** Glazebrook MA, Wright JR Jr, Langman M, Stanish WD, Lee JM: Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res* 2008, 26(6):840-846.
- 355.** Davidson CJ, Ganion LR, Gehlsen GM, Verhoestra B, Roepke JE, Sevier TL: Rat tendon morphologic and functional changes resulting from soft tissue mobilization. *Med Sci Sports Exerc* 1997, 29(3):313-319.
- 356.** Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR: Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg* 1996, 5(5):383-392.
- 357.** Messner K, Wei Y, Andersson B, Gillquist J, Rasanen T: Rat model of Achilles tendon disorder. A pilot study. *Cells Tissues Organs* 1999, 165(1):30-39.
- 358.** Sullo A, Maffulli N, Capasso G, Testa V: The effects of prolonged peritendinous administration of PGE<sub>1</sub> to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy. *J Orthop Sci* 2001, 6(4):349-357.
- 359.** Archambault JM, Hart DA, Herzog W: Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res* 2001, 42(1):13-23.
- 360.** Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK: Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J* 2000, 32(5):369-378.
- 361.** Fransson BA, Gavin PR, Lahmers KK: Supraspinatus tendinosis associated with biceps brachii tendon displacement in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 2005, 227(9):1429-33, 1416.
- 362.** Huang TF, Perry SM, Soslowsky LJ: The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. *Ann Biomed Eng* 2004, 32(3):336-341.
- 363.** Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ: Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 2002, 20(5):910-919.
- 364.** Lui PP, Chan LS, Fu SC, Chan KM: Expression of sensory neuropeptides in tendon is associated with failed healing and activity-related tendon pain in collagenase-induced tendon injury. *Am J Sports Med* 2010, 38(4):757-764.
- 365.** Williams IF, McCullagh KG, Goodship AE, Silver IA: Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res Vet Sci* 1984, 36(3):326-338.
- 366.** Megías M, Molist P, Pombal MA: Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas histológicas. Universidad de Vigo 2018.
- 367.** Aguirre Sánchez HI: Colorante Safranina O. *Investigación en Discapacidad* 2012, 1(2):83-95.
- 368.** Zhang J, Wang JH: Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2010, 11:10-2474-11-10.
- 369.** Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162(1):156-159.

- 370.** Bartlett JM, Stirling D: A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003, 226:3-6.
- 371.** Schmittgen TD, Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008, 3(6):1101-1108.
- 372.** Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
- 373.** Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004, 64(15):5245-5250.
- 374.** Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL: Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 1994, 53(6):359-366.
- 375.** Jelinsky SA, Rodeo SA, Li J, Gulotta LV, Archambault JM, Seeherman HJ: Regulation of gene expression in human tendinopathy. *BMC Musculoskelet Disord* 2011, 12:86-2474-12-86.
- 376.** de Mos M, van El B, DeGroot J, Jahr H, van Schie HT, van Arkel ER, Tol H, Heijboer R, van Osch GJ, Verhaar JA: Achilles tendinosis: changes in biochemical composition and collagen turnover rate. *Am J Sports Med* 2007, 35(9):1549-1556.
- 377.** Ireland D, Harrall R, Curry V, Holloway G, Hackney R, Hazleman B, Riley G: Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol* 2001, 20(3):159-169.
- 378.** Karousou E, Ronga M, Vigetti D, Passi A, Maffulli N: Collagens, proteoglycans, MMP-2, MMP-9 and TIMPs in human achilles tendon rupture. *Clin Orthop Relat Res* 2008, 466(7):1577-1582.
- 379.** Corps AN, Robinson AH, Movin T, Costa ML, Ireland DC, Hazleman BL, Riley GP: Versican splice variant messenger RNA expression in normal human Achilles tendon and tendinopathies. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43(8):969-972.
- 380.** Goncalves-Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, Carvalho-Junior AE, Fernandes TD, Yoshinari HH: Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Joint Bone Spine* 2002, 69(2):189-194.
- 381.** Klatte-Schulz F, Aleyt T, Pauly S, Geissler S, Gerhardt C, Scheibel M, Wildemann B: Do Matrix Metalloproteases and Tissue Inhibitors of Metalloproteases in Tenocytes of the Rotator Cuff Differ with Varying Donor Characteristics? *Int J Mol Sci* 2015, 16(6):13141-13157.
- 382.** Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V: Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med* 2000, 28(4):499-505.
- 383.** Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J: Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res* 2002, 20(6):1352-1357.
- 384.** Han SH, Choi W, Song J, Kim J, Lee S, Choi Y, Byun SE, Ahn T, Ahn H, Ding C, Baik L, Ward S, Ting K, Lee S: The Implication of Substance P in the Development of Tendinopathy: A Case

- Control Study. *Int J Mol Sci* 2017, 18(6):10.
- 385.** Perucca Orfei C, Lovati AB, Vigano M, Stanco D, Bottagisio M, Di Giancamillo A, Setti S, de Girolamo L: Dose-Related and Time-Dependent Development of Collagenase-Induced Tendinopathy in Rats. *PLoS One* 2016, 11(8):e0161590.
- 386.** Lui PP, Chan LS, Lee YW, Fu SC, Chan KM: Sustained expression of proteoglycans and collagen type III/type I ratio in a calcified tendinopathy model. *Rheumatology (Oxford)* 2010, 49(2):231-239.
- 387.** de Cesar Netto C, Godoy-Santos AL, Augusto Pontin P, Natalino RJM, Pereira CAM, Lima FDO, da Fonseca LF, Staggars JR, Cavinatto LM, Schon LC, de Camargo OP, Fernandes TD: Novel animal model for Achilles tendinopathy: Controlled experimental study of serial injections of collagenase in rabbits. *PLoS One* 2018, 13(2):e0192769.
- 388.** Casalechi HL, Leal-Junior EC, Xavier M, Silva JA Jr, de Carvalho Pde T, Aimbire F, Albertini R: Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci* 2013, 28(3):989-995.
- 389.** Lee GJ, Choi S, Chon J, Yoo SD, Kim HS, Park HK, Chung JH: Nanostructural and nanomechanical responses of collagen fibrils in the collagenase-induced Achilles tendinitis rat model. *J Nanosci Nanotechnol* 2013, 13(11):7279-7286.
- 390.** Yoo SD, Choi S, Lee GJ, Chon J, Jeong YS, Park HK, Kim HS: Effects of extracorporeal shockwave therapy on nanostructural and biomechanical responses in the collagenase-induced Achilles tendinitis animal model. *Lasers Med Sci* 2012, 27(6):1195-1204.
- 391.** Lee SY, Chieh HF, Lin CJ, Jou IM, Sun YN, Kuo LC, Wu PT, Su FC: Characteristics of Sonography in a Rat Achilles Tendinopathy Model: Possible Non-invasive Predictors of Biomechanics. *Sci Rep* 2017, 7(1):5100-017-05466-y.
- 392.** Pires D, Xavier M, Araujo T, Silva JA Jr, Aimbire F, Albertini R: Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci* 2011, 26(1):85-94.
- 393.** Biasutti S, Dart A, Smith M, Blaker C, Clarke E, Jeffcott L, Little C: Spatiotemporal variations in gene expression, histology and biomechanics in an ovine model of tendinopathy. *PLoS One* 2017, 12(10):e0185282.
- 394.** Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P: Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol (1985)* 2009, 107(2):399-407.
- 395.** Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000, 69:145-182.
- 396.** Manning CN, Havlioglu N, Knutsen E, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Thomopoulos S, Gelberman RH: The early inflammatory response after flexor tendon healing: a gene expression and histological analysis. *J Orthop Res* 2014, 32(5):645-652.
- 397.** Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR: Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg Am* 2003, 28(5):814-823.
- 398.** Loiselle AE, Bragdon GA, Jacobson JA, Hasslund S, Cortes ZE, Schwarz EM, Mitten DJ, Awad HA, O'Keefe RJ: Remodeling of murine intrasynovial tendon adhesions following injury:

- MMP and neotendon gene expression. *J Orthop Res* 2009, 27(6):833-840.
- 399.** Juneja SC, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Awad HA: Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: a histological and gene expression analysis. *Connect Tissue Res* 2013, 54(3):218-226.
- 400.** Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB: Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg Am* 2008, 33(10):1834-1842.
- 401.** Valera-Garrido F, Minaya-Muñoz F, Sánchez-Ibáñez J.M, García-Palencia P, Valderrama-Canales F, Medina-Mirapeix F, Polidori F: Comparison of the acuter inflammatory response and proliferation of dry needling and electrolysis percutaneous intratissue (EPI) in healthy rat achilles tendons. *Br J Sports Med* 2013, 47(e2).
- 402.** Gravante G, Ong SL, Metcalfe MS, Sorge R, Overton J, Lloyd DM, Maddern GJ, Dennison AR: Cytokine response of electrolytic ablation in an ex vivo perfused liver model. *ANZ J Surg* 2010, 80(7-8):537-541.
- 403.** Cohen DB, Kawamura S, Ehteshami JR, Rodeo SA: Indomethacin and celecoxib impair rotator cuff tendon-to-bone healing. *Am J Sports Med* 2006, 34(3):362-369.
- 404.** Sharma P, Maffulli N: Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006, 6(2):181-190.
- 405.** Sugg KB, Lubardic J, Gumucio JP, Mendias CL: Changes in macrophage phenotype and induction of epithelial-to-mesenchymal transition genes following acute Achilles tenotomy and repair. *J Orthop Res* 2014, 32(7):944-951.
- 406.** Langevin HM, Churchill DL, Fox JR, Badger GJ, Garra BS, Krag MH: Biomechanical response to acupuncture needling in humans. *J Appl Physiol* (1985) 2001, 91(6):2471-2478.
- 407.** Kalichman L, Vulfsons S: Dry needling in the management of musculoskeletal pain. *J Am Board Fam Med* 2010, 23(5):640-646.
- 408.** Chou LW, Kao MJ, Lin JG: Probable mechanisms of needling therapies for myofascial pain control. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 705327.
- 409.** Domingo A, Mayoral O, Monterde S, Santafe MM: Neuromuscular damage and repair after dry needling in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 2013:260806.
- 410.** Shah JP, Phillips TM, Danoff JV, Gerber LH: An in vivo microanalytical technique for measuring the local biochemical milieu of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2005, 99(5):1977-1984.
- 411.** Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E: The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod* 1976, 69(2):155-168.
- 412.** Weinberg EP, Adams MJ, Hollenberg GM: Color Doppler sonography of patellar tendinosis. *AJR Am J Roentgenol* 1998, 171(3):743-744.
- 413.** Gemignani M, Busoni F, Tonerini M, Scaglione M: The patellar tendinopathy in athletes: a sonographic grading correlated to prognosis and therapy. *Emerg Radiol* 2008, 15(6):399-404.
- 414.** van Snellenberg W, Wiley JP, Brunet G: Achilles tendon pain intensity and level of neovascularization in athletes as determined by color Doppler ultrasound. *Scand J Med Sci Sports* 2007, 17(5):530-534.
- 415.** Boyer MI, Watson JT, Lou J, Manske PR, Gelberman RH, Cai SR: Quantitative variation in vascular

- endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. *J Orthop Res* 2001, 19(5):869-872.
- 416.** Bidder M, Towler DA, Gelberman RH, Boyer MI: Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *J Orthop Res* 2000, 18(2):247-252.
- 417.** Petersen W, Unterhauser F, Pufe T, Zantop T, Sudkamp NP, Weiler A: The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003, 123(4):168-174.
- 418.** Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ: Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 2001, 128(19):3855-3866.
- 419.** Mendias CL, Gumucio JP, Bakhurin KI, Lynch EB, Brooks SV: Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. *J Orthop Res* 2012, 30(4):606-612.
- 420.** Mendias CL, Bakhurin KI, Faulkner JA: Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(1):388-393.
- 421.** Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ: A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003, 113(2):235-248.
- 422.** Brent AE, Tabin CJ: FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development* 2004, 131(16):3885-3896.
- 423.** Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, Schweitzer R: Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development* 2007, 134(14):2697-2708.
- 424.** Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y: Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol* 2006, 298(1):234-247.
- 425.** Lejard V, Brideau G, Blais F, Salingcarnboriboon R, Wagner G, Roehrl MH, Noda M, Duprez D, Houillier P, Rossert J: Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- $\alpha 1(I)$  collagen gene in tendon fibroblasts. *J Biol Chem* 2007, 282(24):17665-17675.
- 426.** Espira L, Lamoureux L, Jones SC, Gerard RD, Dixon IM, Czubryt MP: The basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis regulates fibroblast collagen synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 2009, 47(2):188-195.
- 427.** Scott A, Sampaio A, Abraham T, Duronio C, Underhill TM: Scleraxis expression is coordinately regulated in a murine model of patellar tendon injury. *J Orthop Res* 2011, 29(2):289-296.
- 428.** Liu H, Zhu S, Zhang C, Lu P, Hu J, Yin Z, Ma Y, Chen X, OuYang H: Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: their potential for tendon regeneration. *Cell Tissue Res* 2014, 356(2):287-298.
- 429.** Tan C, Lui PP, Lee YW, Wong YM: Scx-transduced tendon-derived stem cells (TDSCS) promoted better tendon repair compared to mock-transduced cells in a rat patellar tendon window injury model. *PLoS One* 2014, 9(5):e97453.
- 430.** Maeda T, Sakabe T, Sunaga A, Sakai K, Rivera AL, Keene DR, Sasaki T, Stavnezer E, Iannotti J, Schweitzer R, Ilic D, Baskaran H, Sakai T: Conversion of mechanical force into TGF-beta-



mediated biochemical signals. *Curr Biol* 2011, 21(11):933-941.

**431.** Jonsson P, Alfredson H, Sunding K, Fahlstrom M, Cook J: New regimen for eccentric calf-muscle training in patients with chronic insertional Achilles tendinopathy: results of a pilot study. *Br J Sports Med* 2008, 42(9):746-749.

**432.** Jonsson P, Wahlstrom P, Ohberg L, Alfredson H: Eccentric training in chronic painful impingement syndrome of the shoulder: results of a pilot study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006, 14(1):76-81.

**433.** Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, Kaplan DL, Altman GH: Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res* 2004, (428):272-285.

**434.** Montes-Molina R, Martinez-Rodriguez ME, Rodriguez AB, Martinez-Ruiz F, Prieto-Baquero A: Interferential light therapy in the treatment of shoulder tendinopathies: a randomized controlled pilot study. *Clin Rehabil* 2012, 26(12):1114-1122.

**435.** Da Re Guerra F, Vieira CP, Marques PP, Oliveira LP, Pimentel ER: Low level laser therapy accelerates the extracellular matrix reorganization of inflamed tendon. *Tissue Cell* 2017, 49(4):483-488.

**436.** Tumilty S, Munn J, McDonough S, Hurley DA, Basford JR, Baxter GD: Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. *Photomed Laser Surg* 2010, 28(1):3-16.

**437.** Pellicchia G, Hamel H, Behnke P.: Treatment of infrapatellar tendinitis: a combination of modalities and

transverse friction massage versus iontophoresis. *Jourl of Sport Rehabilitation* 1994, 3:135-145.

**438.** Viswas R, Ramachandran R, Korde Anantkumar P: Comparison of effectiveness of supervised exercise program and Cyriax physiotherapy in patients with tennis elbow (lateral epicondylitis): a randomized clinical trial. *ScientificWorldJournal* 2012, 2012:939645.

**439.** Vetrano M, d'Alessandro F, Torrisi MR, Ferretti A, Vulpiani MC, Visco V: Extracorporeal shock wave therapy promotes cell proliferation and collagen synthesis of primary cultured human tenocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011, 19(12):2159-2168.

**440.** Li W, Zhang SX, Yang Q, Li BL, Meng QG, Guo ZG: Effect of extracorporeal shock-wave therapy for treating patients with chronic rotator cuff tendonitis. *Medicine (Baltimore)* 2017, 96(35):e7940.

**441.** Mouzopoulos G, Stamatakos M, Mouzopoulos D, Tzurbakis M: Extracorporeal shock wave treatment for shoulder calcific tendonitis: a systematic review. *Skeletal Radiol* 2007, 36(9):803-811.

**442.** Santamato A, Panza F, Notarnicola A, Cassatella G, Fortunato F, de Sanctis JL, Valeno G, Kehoe PG, Seripa D, Logroscino G, Fiore P, Ranieri M: Is Extracorporeal Shockwave Therapy Combined With Isokinetic Exercise More Effective Than Extracorporeal Shockwave Therapy Alone for Subacromial Impingement Syndrome? A Randomized Clinical Trial. *J Orthop Sports Phys Ther* 2016, 46(9):714-725.