



Reporte breve

El ácido hialurónico alivia el estrés oxidativo y la apoptosis en tenocitos humanos a través de las caspasas 3 y 7

Marialucia Gallorini¹, Cristina Antonetti Lamorgese Passeriz, Amelia Cataldi¹, Anna Concetta Berardi^{2,*},† y Leonardo Osti^{3,†}

- ¹ Departamento de Farmacia, Universidad "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara, Via dei Vestini 31, 66100 Chieti, Italia
² Laboratorio de Células Madre, Departamento de Hematología, Medicina Transfusional y Biotecnologías, Hospital Santo Spirito, 65124 Pescara, Italia
³ Unidad de Artroscopia y Medicina Deportiva, Hospital Hesperia, 41125 Módena, Italia
* Correspondencia: anna.berardi@asl.pe.it o annacberardi@yahoo.it †

Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Abstracto: La tendinopatía del manguito rotador (RCT) es el motivo principal de la cirugía del hombro y su tratamiento clínico sigue siendo un desafío. Se ha demostrado que el ácido hialurónico (HA) tiene efectos antiinflamatorios in vitro e in vivo en condiciones de ECA, caracterizadas por un estrés oxidativo (OS) exagerado. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos relacionados con el HA todavía están parcialmente divulgados. Con estos objetivos, se estableció un modelo celular de ECA exponiendo tenocitos humanos primarios a H₂O₂ hasta por 72 h. Se administraron cuatro HA diferentes por peso molecular para medir el óxido nítrico (NO) y la OS, la apoptosis y la expresión de colágeno 1. Paralelamente se administró a modo de comparación el conocido antioxidante ácido ascórbico. El presente estudio destaca que los HA caracterizados por un bajo peso molecular son capaces de contrarrestar el H₂O₂-OS inducida al disminuir el porcentaje de células apoptóticas y revertir la activación de las caspasas 3 y 7. Asimismo, los niveles intracelulares de NO son comparables a los de los controles. Paralelamente, la expresión de colágeno 1 mejoró con HA caracterizados por pesos moleculares más altos en comparación con AA. Estos hallazgos confirman que el HA desempeña un papel antioxidante comparable al AA dependiendo del peso molecular y resaltan los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos antiapoptóticos del HA.

Palabras clave: ácido hialurónico; peso molecular; tendón; caspasa; estrés oxidativo; inflamación; apoptosis; ácido ascórbico; colágeno; óxido nítrico



Citación: Gallorini, M.; Antonetti Lamorgese Passeriz, C.; Cataldi, A.; Berardi, AC; Osti, L. El ácido hialurónico alivia el estrés oxidativo y la apoptosis en tenocitos humanos a través de las caspasas 3 y 7. *En t. J. Mol. Ciencia*. 2022, 23, 8817. <https://doi.org/10.3390/ijms23158817>

Editor Académico: Diego Guidolin

Recibido: 24 de junio de 2022

Aceptado: 5 de agosto de 2022

Publicado: 8 de agosto de 2022

Nota del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.



Derechos de autor: © 2022 por los autores. Licenciario MDPI, Basilea, Suiza. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introducción

La tendinopatía del manguito rotador (RCT) es la causa más común de dolor de hombro, con una frecuencia creciente que varía del 5% al 40%.^{1,2} El ECA se caracteriza por alteración de la estructura del tendón, neovascularización ineficaz y disminución de la producción de colágeno 1.³ En varios estudios se ha descrito un papel en la patogénesis de las tendinopatías por estrés oxidativo (OS).⁴ Se ha demostrado ampliamente que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) estimula el sistema antioxidante intracelular, que está estrechamente regulado por Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2)).⁵, y que un fallo funcional en la reparación del tendón podría estar fuertemente asociado con la activación de la vía Nrf2 [6]. Recientemente, se ha sugerido el ácido hialurónico (HA) para el tratamiento clínico de las tendinopatías.^{7,8} Nuestros estudios previos demostraron que diferentes preparaciones de HA, dependiendo de su peso molecular, contrarrestaban la apoptosis bajo H₂O₂ inducido [9], recuperación celular mejorada de H₂O₂ exposición en términos de disminución de la citotoxicidad y reducción de la expresión de Nrf2, y aumento de la expresión del receptor CD44 de HA.¹⁰

El HA, como uno de los componentes fundamentales de los cartílagos y tendones, contribuye a sus propiedades viscoelásticas in vivo [8,11,12]. Sin embargo, la eficacia del HA en el manejo

La importancia de los ECA aún se debate y aún falta una descripción completa de los mecanismos moleculares subyacentes involucrados.8].

En este sentido, para comprender mejor los diferentes resultados biológicos de HA en condiciones de OS y ampliar y mejorar las aplicaciones farmacéuticas de HA, se estudiarán los efectos antioxidantes de cuatro HA diferentes por peso molecular en células derivadas del tendón del manguito rotador humano en términos de citoprotección y caspasa. Se estudiaron 3/7 de activación. Además, durante la administración de HA se investigaron los niveles de expresión de proteínas del colágeno 1, la isoforma de colágeno predominante involucrada en la deposición de ECM en condiciones inflamatorias. Además, para evaluar si el HA podría tener funciones antioxidantes, se utilizó como comparación el conocido antioxidante ácido ascórbico (AA).13]. Además, se sabe que el AA participa en la biosíntesis de colágeno. 14], incluso en un modelo de rata con lesión del tendón de Aquiles [15].

2. Resultados

2.1. Efecto de los HA sobre la tasa de proliferación celular y la viabilidad

Se realizó un análisis de proliferación celular durante hasta 72 h de tratamiento en tenocitos para verificar los efectos de los HA administrados en paralelo con H2oh2en su tasa de proliferación (Figura 1A). Como era de esperar, el porcentaje de H2oh2-Los tenocitos proliferantes expuestos disminuyeron drásticamente después de 24 h, y el estresor oxidativo administrado tuvo un efecto aún mayor después de 72 h, con porcentajes de proliferación inferiores al 5% en todas las muestras. Cuando se administraron preparaciones de AA y HA en paralelo con H2oh2después de 24 h, la tasa de proliferación aumentó leve pero significativamente en todas las condiciones experimentales con respecto a H2oh2 solo. Después de 72 h, este efecto se mantuvo.

2.2. Modulación de aniones superóxido en presencia de HA

La generación intracelular de aniones superóxido se midió en tenocitos después de 6 h de exposición en todas las condiciones experimentales (Figura 1B). Cuando h2oh2se añade a los cultivos, se registra un aumento espectacular en la generación de anión superóxido, siendo el ratio MFI 3 veces mayor que el del UC (Figura 1B). Como era de esperar, AA es capaz de reducir significativamente la generación de superóxido en presencia de H2oh2, con la ratio IFM reducida a la mitad con respecto a H2oh2solo. Paralelamente, Hyalgan es el mejor para disminuir la cantidad de aniones superóxido entre las cuatro preparaciones de HA, seguido de Hyalubrix y Artrosulfur HA.

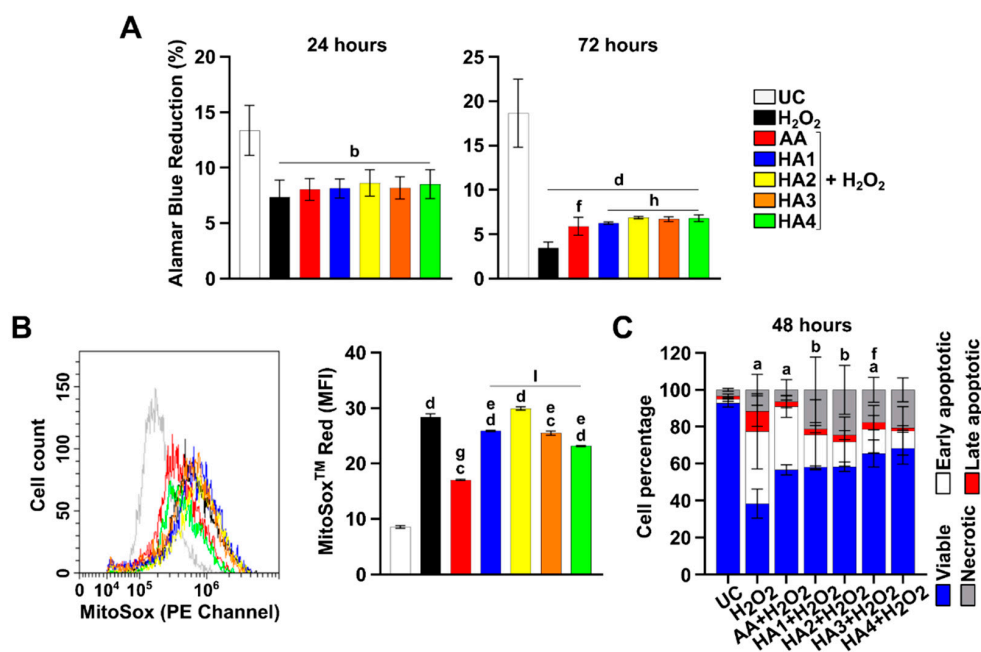


Figura 1.continuación.

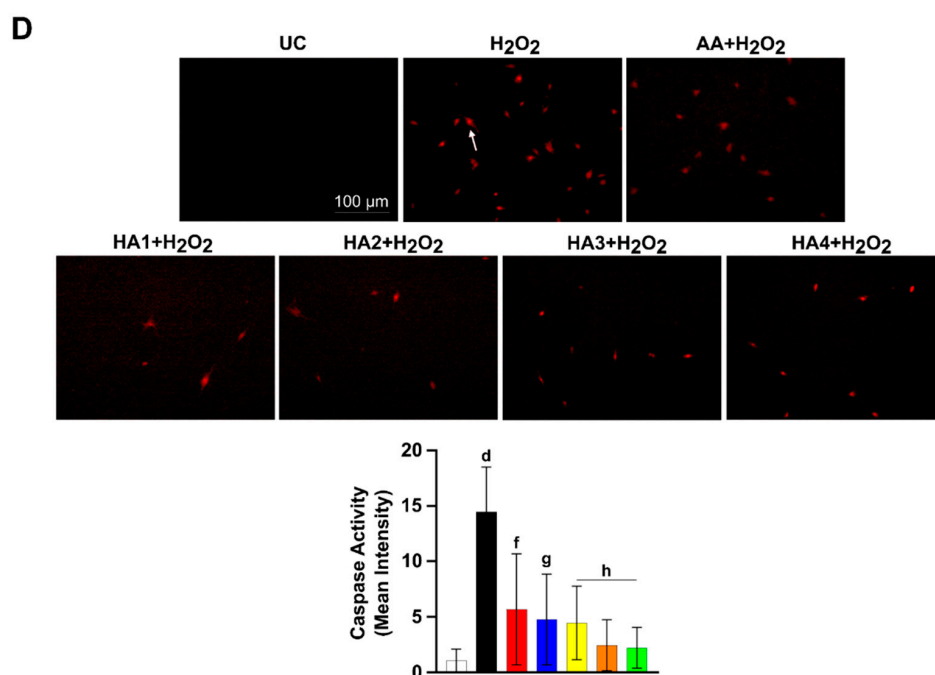


Figura 1. Proliferación celular, generación de aniones superóxido, apoptosis y actividad de caspasa 3/7 en tenocitos expuestos a ácidos hialurónicos en condiciones de OS. **(A)** Los gráficos de barras representan el % de los valores de reducción de alamarBlue después de 24 y 72 h. Los datos son los medios (\pm SD) de tres experimentos diferentes. **(B)** Las superposiciones de los picos en el canal FL2 representan las emisiones fluorescentes de cada muestra. El gráfico de barras muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) relacionada con la emisión en el canal FL2 que es proporcional a la generación de aniones superóxido. Los valores son las proporciones de las MFI generadas a partir de cada muestra en el control sin teñir (negativo). **(C)** Las barras representan el porcentaje de células viables (sin teñir), células en apoptosis temprana (anexina), células en apoptosis tardía (anexina + SYTOX Green) y células en necrosis (SYTOX Green). **(D)** Imágenes representativas de tres experimentos independientes de actividad de caspasa 3/7 (glóbulos rojos). 1 cm = 100 μ metro. El gráfico de barras representa el MFI relacionado con las células teñidas para caspasas activadas. Control no tratado (CU); peróxido de hidrógeno 2 mM (H₂oh₂); ácido ascórbico μ g/mL (AA); Artrosulfuro HA® (HA1), Synolis VA® (HA2), Hyalubrix® (HA3) y Hyalgan® (HA4) a una concentración final de 1 mg/mL. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,001$; c: $p < 0,0001$; d: $p < 0,0001$ frente a CU; mi: $p < 0,05$; f: $p < 0,001$; g: $p < 0,0001$; h: $p < 0,0001$ frente a H₂oh₂; yo: $p < 0,0001$ frente a AA.

2.3. Contrarrestación de la apoptosis inducida por estrés oxidativo mediante HA

Los porcentajes de células en las diversas fases de muerte celular se evaluaron después de 48 h en presencia de HA en condiciones de OS (Figura 1C). Después de 48 h, las células viables aparecieron disminuidas de forma dependiente del tiempo por H₂oh₂ (38,37%) y las células apoptóticas tempranas aumentaron dramáticamente (39,14%), al igual que los tenocitos apoptóticos tardíos. Cuando se añade AA, la viabilidad celular aumenta significativamente (56,60%) para las células apoptóticas tardías y las células necróticas, mientras que el porcentaje de apoptosis temprana es comparable al de H₂oh₂ solo. Paralelamente, Artrosulfuro HA y Synolis VA aumentan la viabilidad celular, disminuyen la apoptosis temprana, pero aumentan la necrosis celular con respecto a H₂oh₂ solo (11,51%), con porcentajes medidos como 21,31% y 24,57%, respectivamente. La viabilidad celular aumenta aún más en presencia de Hyalubrix y Hyalgan (65,49% y 68,39%, respectivamente). Paralelamente, la apoptosis disminuye ligeramente y la viabilidad aumenta ligeramente.

2.4. El tratamiento con HA reduce la activación de caspasa 3 y 7

Para establecer si la inducción de la apoptosis podría estar impulsada por la activación de las caspasas, se midió la actividad de las caspasas 3 y 7 después de 48 h en condiciones de OS (Figura 1D). Utilizando el software de análisis de imágenes, se midió la intensidad fluorescente media relacionada con las células caspasa positivas (apoptóticas) (consulte la Sección 4). Comparado con la UC

control (IMF = 1,07), el H₂O₂ la exposición aumenta drásticamente la activación de las caspasas 3 y 7 (MFI = 14,46). Paralelamente, cuando se añade AA al cultivo, las caspasas 3 y 7 MFI disminuyen (5,69), lo que indica una actividad reducida de las caspasas. Artrosulfur HA y Synolis VA reducen ligeramente la actividad de caspasa (MFI = 4,76 y 4,46, respectivamente) en comparación con AA, como se muestra en la Figura 1D. Cuando se administran Hyalubrix y Hyalgan, la actividad de las caspasas 3 y 7 se redujo aún más (MFI = 2,46 y 2,23, respectivamente) en comparación con AA. Esto sugiere que HA contrarresta el H₂O₂-Apoptosis inducida mediante la reducción de la activación de las caspasas 3 y 7.

2.5. Modulación del óxido nítrico (NO) en presencia de HA

El óxido nítrico intracelular generado por los tenocitos se midió en tenocitos después de 6 h de exposición en todas las condiciones experimentales (Figura 2A). h₂o₂ la exposición desencadena la caída de NO (Figura 2A). Cuando se añaden los preparados de AA y HA, el NO disminuye ligeramente con respecto al UC, pero se mantiene por encima del H₂O₂ solo, principalmente con Hyalubrix y Hyalgan.

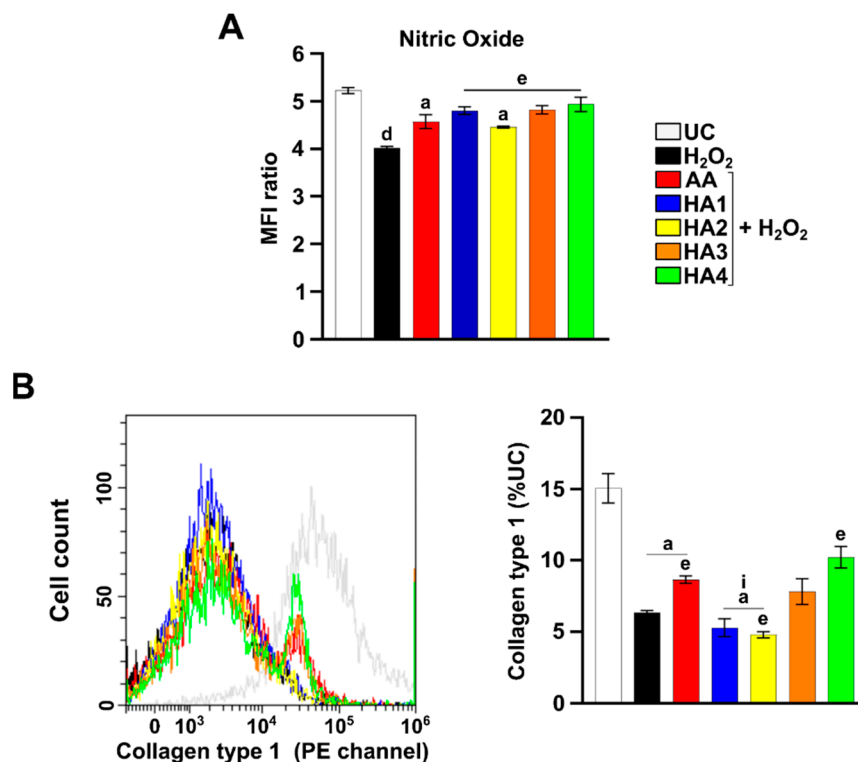


Figura 2. Generación de expresión de óxido nítrico y colágeno 1 en tenocitos expuestos a ácidos hialurónicos en condiciones de OS. **(A)** El gráfico de barras muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) relacionada con la emisión en el canal FL2, que es proporcional a la generación de óxido nítrico. Los valores son las proporciones del MFI generado a partir de cada muestra en el control sin teñir (negativo). **(B)** Las superposiciones de los picos en el canal FL2 representan las emisiones fluorescentes de cada muestra. El gráfico de barras representa el % de expresión relacionada con el colágeno 1. Los datos se expresan como el % de la UC. Control no tratado (CU); peróxido de hidrógeno 2 mM (H₂O₂); ácido ascórbico μg/mL (AA); Artrosulfuro HA® (HA1), Synolis VA® (HA2), Hyalubrix® (HA3) y Hyalgan® (HA4) a una concentración final de 1 mg/mL. a: *pag* ≤ 0,05; d: *pag* < 0,0001 frente a CU; mi: *pag* ≤ 0,05 frente a H₂O₂; i: *pag* ≤ 0,05 frente a AA.

2.6. Modulación de los niveles de colágeno 1 mediante preparaciones de HA

Los niveles de expresión de colágeno 1 se midieron en tenocitos en condiciones de sistema operativo después de 72 h (Figura 2B). Como era de esperar, la H₂O₂ la exposición disminuye fuertemente los niveles de expresión de colágeno 1 en comparación con la UC, mientras que la presencia de AA mejora los niveles de expresión de colágeno 1

bajo condiciones del sistema operativo. Los datos revelan que Hyalgan ejerce un mayor efecto sobre las células derivadas de tendones expuestas a H₂O₂ que todos los demás tratamientos en términos de expresión de colágeno 1.

3. Discusión

El estrés oxidativo (OS) es crucial en las lesiones de tendones [dieciséis]. Esto podría atribuirse a los vínculos entre la OS, la inflamación y la apoptosis, todos los cuales perjudican la estructura y función de las células. Una OS excesiva da como resultado la activación de vías de transducción de señales sensibles a redox.17].

En el presente trabajo, la OS fue inducida en células derivadas de tendones por el H₂O₂ exposición. Nuestro grupo ya demostró que la HA podría contrarrestar la apoptosis bajo OS inducida por H₂O₂ [9]. Aquí, nuestros resultados anteriores se consolidan, mostrando que los cuatro HA utilizados contrarrestaron significativamente la acción citotóxica de H₂O₂ en términos de proliferación (Figura 1A).

Dado que las ROS intracelulares se producen principalmente en las mitocondrias, se midió la producción mitocondrial de superóxido para verificar si el HA podría influir en su modulación. Aquí, aunque todas las preparaciones de HA disminuyen la cantidad de aniones superóxido, Hyalgan se revela como la mejor preparación para contrarrestar su producción (Figura 1B). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los HA caracterizados por un peso molecular más bajo reducen la producción de ROS mitocondriales.

La caspasa 3 es una proteína clave en la estimulación de la apoptosis, siendo la principal ejecutora de la muerte celular apoptótica. Paralelamente, caspasa 7 juega un papel de apoyo en la fase de ejecución del proceso [18]. Por lo tanto, aplicamos una visualización de caspasa 3/7 para evaluar la eficacia de HA en términos de respuestas celulares antiapoptóticas en condiciones de sistema operativo. 19]. Muy interesante, todos los HA tienen un comportamiento similar (Figura 1D). En consecuencia, se destacó que HA mejora H₂O₂-apoptosis inducida mediante caspasa 3/7, independientemente del peso molecular.

La generación de NO juega un papel relevante en la reparación de un tendón lesionado [20,21]. Además, se demostró que el uso de un profármaco liberador de NO es útil en el desarrollo de una terapia prometedora basada en NO.22]. Por estas razones, la evaluación de la expresión de NO es un parámetro importante a considerar en tendones dañados. En primer lugar, la H₂O₂ exposición provocó una disminución en la producción de NO. Aquí se muestra que los HA indujeron un aumento significativo en la producción de NO en comparación con el H₂O₂ células tratadas solas (Figura 2A). En detalle, Artrosulfur, Hyalubrix y Hyalgan fueron capaces de inducir una mayor producción de NO que el conocido antioxidante AA [23]. Este resultado es particularmente intrigante ya que se demostró que el NO favorece la curación del tendón a nivel molecular al aumentar la síntesis de colágeno después de 7 días de tratamiento en un cultivo de células de tendón in vitro.24]. Sin embargo, para ofrecer conocimientos más profundos sobre los efectos del NO en las tendinopatías, se necesitan más estudios.

El colágeno es la principal molécula secretada por las células del tendón y participa en la remodelación y el mantenimiento de la MEC.25]. Fisiológicamente, los tendones están compuestos por entre un 65% y un 85% de colágeno 1 [14]. En nuestros estudios anteriores, ya demostramos que Synolis VA fue capaz de estimular la síntesis de colágeno 1 de manera dosis dependiente durante 14 días [9]. En el presente trabajo investigamos el efecto del tratamiento con HA en un tiempo de exposición más temprano (72 h). Nuestros resultados muestran que la expresión del colágeno 1 está regulada negativamente durante el H₂O₂ tratamiento. En condiciones de OS, Hyalubrix y Hyalgan mejoran la expresión de colágeno 1. Por lo tanto, se puede especular que estos dos HA actúan antes con respecto a Synolis VA en términos de deposición de colágeno 1, y este efecto podría estar relacionado con la diferencia en el peso molecular. , ya que Synolis VA es el más alto.

En conclusión, la apoptosis inducida por OS en tenocitos es impulsada por caspasa 3 y 7, y esta condición podría contrarrestarse mediante la administración de HA. Además, la administración de HA con pesos moleculares más bajos conduce a una deposición más temprana de colágeno 1 y muestra mejores resultados en términos de contrarrestar la OS, comparable al conocido antioxidante AA. Este estudio in vitro puede sentar las bases para mejores resultados con respecto al manejo clínico de los ECA.

4. Materiales y métodos

4.1. Cultivo de células

Se utilizaron células criopreservadas derivadas de tendones, almacenadas en viales en nitrógeno líquido y aisladas de los mismos pacientes utilizados en nuestro trabajo anterior [26]. El protocolo de aislamiento celular se describió ampliamente anteriormente [9,10,26,27]. El fenotipo de los tenocitos se confirmó mediante la evaluación de la expresión de genes específicos de los tenocitos [28]. Para el presente trabajo, las células del pase 0 de tres muestras se descongelaron y se cultivaron rápidamente para evitar cambios de fenotipo causados por pases posteriores. Los tenocitos se cultivaron como en otros lugares [26] y utilizado hasta el pasaje 5.

4.2. Tratamiento celular

Los tenocitos se sembraron en 96- (0,5×10⁴ células/pocillo), 12- (0,2×10⁵ células/pocillo) o 6 pocillos (0,5×10⁵ células/pozo) placas tratadas con cultivo de tejidos (Falcon®, Corning Incorporated, Brooklyn, NY, EE. UU.) y se dejaron adherir durante 24 h. Las células cultivadas se expusieron a 2 mM de H₂O₂ (solución madre 30% v/v, Sigma-Aldrich, Milán, Italia), ácido ascórbico (AA), 50 µg/mL (polvo stock adquirido de Sigma-Aldrich, Milán, Italia) y a cuatro HA, a saber, Artrosulfur HA® (PM 1000 KDa) (HA1), Synolis VA® (PM 2200 KDa) (HA2), Hyalubrix® (MW 1600 KDa) (HA3), y Hyalgan® (PM 500–730 KDa) (HA4) a una concentración final de 1 mg/ml como se informó anteriormente [9,10]. Se utilizaron células no tratadas (UC) como control. Los tiempos de exposición variaron según los distintos parámetros analizados, desde 6 h hasta 72 h.

4.3. Ensayo de proliferación (alamarBlue)

En los tiempos de exposición establecidos (24 o 72 h), el medio se reemplazó por uno nuevo que contenía reactivo alamarBlue al 10% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), y luego se incubó durante 4 h a 37 °C. La absorbancia se midió a 570 y 600 nm mediante un espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific). El valor obtenido sin células se estableció como control negativo.

4.4. Detección de aniones superóxido mitocondriales

Después de 6 h de exposición, la generación de aniones superóxido mitocondriales se determinó mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente MitoSOX™ (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) según un procedimiento establecido como en otros lugares. reportado [29]. Las emisiones de fluorescencia relativas se detectaron mediante un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.) y se expresaron como relaciones medias de intensidad de fluorescencia en el control sin teñir (no se muestra).

4.5. Determinación de la apoptosis

El kit de apoptosis de células muertas/anexina V de PE con SYTOX® Se utilizó Green for Flow Cytometry (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para detectar la apoptosis mediante citometría de flujo después de 24 o 48 h de exposición, como se informó en otro lugar [9]. Las poblaciones celulares se detectaron mediante un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.) y se analizaron con el software CytExpert (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.).

4.6. Detección de Caspasa 3 y 7.

Las caspasas 3 y 7 activas se detectaron después de 48 h de exposición utilizando el kit de detección Image-iT™ LIVE Red Caspase 3 y 7 (Invitrogen, Molecular Probes, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit emplea un enfoque novedoso para detectar caspasas activas que se basa en una metodología de inhibidor fluorescente de caspasas (FLICA™) [30]. Las muestras se observaron a través de un microscopio fluorescente invertido ECLIPSE Ti-U (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EE. UU.) equipado con una cámara. Para el análisis de imágenes, todas las imágenes digitales se capturaron con el software NIS-Elements Imaging Software (Nikon Instruments).

mentos Inc.). La intensidad total de fluorescencia de un área. Se determinaron 10 fotogramas de cada diapositiva. El nivel de intensidad se normalizó con uno de los controles no tratados.

4.7. Detección de óxido nítrico intracelular

La sonda Nitrixyte™ se utilizó para detectar NO libre en tenocitos (kit de ensayo de óxido nítrico intracelular fluorimétrico Cell Meter™; AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.) mediante citometría de flujo como ya se informó [21]. Las emisiones de fluorescencia relativas se detectaron mediante un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.) y se analizaron con el software CytExpert (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE. UU.) y se expresaron como relaciones medias de intensidad de fluorescencia en el control sin teñir. (no mostrada).

4.8. Expresión de colágeno 1 mediante citometría de flujo.

En el tiempo de exposición establecido (72 h), los sedimentos celulares se fijaron, permeabilizaron y teñieron como ya se informó [31]. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal de ratón anticolágeno 1A1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) 1:50 a cada muestra y se incubó durante 1 h a 4°C. A continuación, se añadió el anticuerpo IgG (H + L) anti-ratón de caballo secundario de ficoeritrina (PE) (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.) (1:50) y se incubó a 4°C en la oscuridad durante 45 min. Las emisiones de fluorescencia relativas se detectaron como se describió anteriormente [31].

4.9. Estadísticas

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) mediante una prueba t y ANOVA unidireccional ordinario, seguido de pruebas de comparaciones múltiples post hoc de Tukey. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5. Conclusiones

La OS sostenida conduce a una disminución en la proliferación de tenocitos causada por un aumento en la muerte celular a través de la apoptosis y una consiguiente remodelación disminuida de la ECM debido a la falta de deposición de colágeno 1. En este sentido, comprender que la vía molecular subyacente a la apoptosis inducida por OS en los tenocitos está impulsada por las caspasas 3 y 7, y que esta condición podría contrarrestarse con HA caracterizadas por pesos moleculares más bajos, puede sentar las bases para obtener mejores resultados en el manejo de ECA.

Contribuciones de autor: Conceptualización, ACB y LO; metodología, MG; validación, MG, AC y ACB; análisis formal, MG y CALP; curación de datos, MG y CALP; redacción: preparación del borrador original, MG y ACB; redacción: revisión y edición, MG, AC, ACB y LO; administración de proyectos, ACB; adquisición de financiación, LO Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos: Este trabajo fue apoyado por la Universidad de Ferrara (Leonardo Osti) y el Programma Operativo Nazionale (PON) Ricerca e Innovazione 2014–2020, Fondo Sociale Europeo, Azione I. 2 “Attrazione e Mobilità Internazionale dei Ricercatori” (Marialucia Gallorini).

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: El estudio utilizó células humanas representadas por material descongelado que fue criopreservado durante nuestros trabajos anteriores [9,26]. En esos artículos (ver Sección 4), se afirmó que todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Tor Vergata de Roma, que todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y que todas las muestras fueron anonimadas antes de ser procesadas. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Tor Vergata de Roma.

Declaración de consentimiento informado: Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Yamamoto, A.; Takagishi, K.; Osawa, T.; Yanagawa, T.; Nakajima, D.; Shitara, H.; Kobayashi, T. Prevalencia y factores de riesgo de un desgarro del manguito rotador en la población general. *J. Hombro Codo. Cirugía*. 2010, 19, 116–120. [Referencia cruzada] [PubMed]

2. Oliva, F.; Osti, L.; Padulo, J.; Maffulli, N. Epidemiología de los desgarros del manguito rotador: una nueva incidencia relacionada con la enfermedad de la tiroides. *Músculos Ligamentos Tendones*.**2014**,*4*, 309–314. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
3. Gracias, FG; Roesch, ZK; Dilisio, MF; Radwan, MM; Kovilam, A.; Bruto, RM; Agrawal, DK Asociación de respuestas inflamatorias y desorganización de la ECM con regulación positiva de HMGB1 y activación del inflammasoma NLRP3 en el tendón lesionado del manguito rotador. *Ciencia. Repts*.**2018**,*8*, 8918. [[Referencia cruzada](#)]
4. Poulsen, RC; Knowles, HJ; Carr, AJ; Hulley, PA Diferenciación celular versus muerte celular: la glucosa extracelular es un determinante clave del destino celular después de la exposición al estrés oxidativo. *Enfermedad por muerte celular*.**2014**,*5*, e1074. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
5. Gallorini, M.; Petzel, C.; Bolay, C.; Hiller, KA; Cataldi, A.; Buchalla, W.; Krifka, S.; Schweikl, H. La activación de la respuesta celular antioxidante regulada por Nrf2 inhibe el estrés oxidativo inducido por HEMA y favorece la viabilidad celular. *Biomateriales***2015**,*56*, 114-128. [[Referencia cruzada](#)]
6. Meng, J.; Sí; Tong, J.; Sol, W.; Jiang, H.; Wang, Y.; Xue, K.; Xie, F.; Qian, H.; Liu, N.; et al. El tratamiento con hidrógeno reduce la adhesión del tendón y la respuesta inflamatoria. *J. Celda. Bioquímica*.**2018**,*120*, 1610-1619. [[Referencia cruzada](#)] [[PubMed](#)]
7. Osti, L.; Buda, M.; Buono, AD; Osti, R.; Massari, L. Evidencia clínica en el tratamiento de desgarros del manguito rotador con ácido hialurónico. *Músculos Ligamentos Tendones*.**2016**,*5*, 270–275. [[Referencia cruzada](#)]
8. Oliva, F.; Marsilio, E.; Espárrago, G.; Frizziero, A.; Berardi, AC; Maffulli, N. El impacto del ácido hialurónico en la fisiología del tendón y su aplicación clínica en tendinopatías. *Células***2021**,*10*, 3081. [[Referencia cruzada](#)]
9. Osti, L.; Berardocco, M.; di Giacomo, V.; Di Bernardo, G.; Oliva, F.; Berardi, AC El ácido hialurónico aumenta la viabilidad de las células derivadas del tendón y la expresión de colágeno tipo I in vitro: estudio comparativo de cuatro preparaciones diferentes de ácido hialurónico por peso molecular. *Musculosqueleto BMC. Desorden*.**2015**,*dieciséis*, 284. [[Referencia cruzada](#)]
10. Gallorini, M.; Berardi, AC; Gissi, C.; Cataldi, A.; Osti, L. Efecto citoprotector mediado por Nrf2 de cuatro ácidos hialurónicos diferentes por peso molecular en tenocitos humanos. *J. Objetivo de drogas*.**2020**,*28*, 212–224. [[Referencia cruzada](#)]
11. Muneta, T.; Koga, H.; Ju, YJ; Mochizuki, T.; Sekiya, I. Terapia de inyección de hialuronano para pacientes deportistas con tendinopatía rotuliana. *J. Orthop*.**2012**,*17*, 425–431. [[Referencia cruzada](#)]
12. Flores, C.; Balus, R.; Álvarez, G.; Construir, MA; Varela, L.; Canó, C.; Casariego, J. Eficacia y tolerabilidad del ácido hialurónico peritendinoso en pacientes con tendinopatía supraespinosa: un ensayo multicéntrico, aleatorizado y controlado. *Medicina deportiva. Abierto* **2017**,*3*, 22. [[Referencia cruzada](#)]
- 13 de mayo, JM; Harrison, FE Papel de la vitamina C en la función del endotelio vascular. *Antioxidante. Señal redox*.**2013**,*19*, 2068–2083. [[Referencia cruzada](#)]
14. Gallorini, M.; Carradori, S. Comprensión de las interacciones del colágeno y su regulación específica mediante nuevos fármacos. *Opinión de expertos. Descubrimiento de drogas*.**2021**,*dieciséis*, 1239-1260. [[Referencia cruzada](#)]
15. Oliva, F.; Maffulli, N.; Gissi, C.; Veronesi, F.; Calciano, L.; Fini, M.; Brogini, S.; Gallorini, M.; Antonetti Lamorgese Passeri, C.; Bernardini, R.; et al. La combinación de ácido ascórbico y T3 produce una mejor curación en comparación con las células madre mesenquimales de la médula ósea en un modelo de rata con lesión del tendón de Aquiles: un estudio de prueba de concepto. *J. Orthop. Cirugía. Res*.**2019**,*14*, 54. [[Referencia cruzada](#)]
16. Li, P.; Zhou, H.; Tu, T.; Lu, H. La exacerbación dinámica de la inflamación y el estrés oxidativo durante la formación de la adhesión peritendinosa fue el resultado de una lesión aguda del tendón. *J. Orthop. Cirugía. Res*.**2021**,*dieciséis*, 293. [[Referencia cruzada](#)]
17. Schweikl, H.; Gallorini, M.; Pöschl, G.; Urmann, V.; Petzel, C.; Bolay, C.; Hiller, KA; Cataldi, A.; Buchalla, W. Funciones de los factores de transcripción NF-κB y Nrf2 en la inhibición de la liberación de citocinas estimulada por LPS por el monómero de resina HEMA. *Mella. Madre*.**2018**,*34*, 1661–1678. [[Referencia cruzada](#)]
18. Brentnall, M.; Rodríguez-Menocal, L.; De Guevara, RL; Cepero, E.; Boise, LH Caspasa-9, caspasa-3 y caspasa-7 tienen funciones distintas durante la apoptosis intrínseca. *Biol celular BMC*.**2013**,*14*, 32. [[Referencia cruzada](#)]
19. Calce, MK; Yoon, HY; Lee, S.; Jo, MK; Parque, J.; Kim, JH; Jeong, SY; Kwon, IC; Kim, K. Precursor metabólico específico de caspasa-3/-7 para el seguimiento bioortogonal de la apoptosis tumoral. *Ciencia. Repts*.**2017**,*7*, 16635. [[Referencia cruzada](#)]
20. Bokhari, AR; Murrell, GA El papel del óxido nítrico en la curación del tendón. *J. Hombro Codo. Cirugía*.**2012**,*21*, 238–244. [[Referencia cruzada](#)]
21. Moraes, SA; Oliveira, KR; Crespo-Lopez, YO; Picanço-Diniz, DL; Herculano, AM La inhibición local de la NO sintasa produce recuperación histológica y funcional en el tendón de Aquiles de ratas después de tenotomía: reparación del tendón e inhibición local de la NOS. *Res. de tejido celular*.**2013**,*353*, 457–463. [[Referencia cruzada](#)]
22. Goshi, E.; Zhou, G.; Él, Q. Métodos de detección de óxido nítrico in vitro e in vivo. *Medicina. Gas Res*.**2019**,*9*, 192–207. [[Referencia cruzada](#)]
23. di Giacomo, V.; Berardocco, M.; Gallorini, M.; Oliva, F.; Colosimo, A.; Cataldi, A.; Maffulli, N.; Berardi, AC La suplementación combinada de ácido ascórbico y hormona tiroidea T3 afecta la proliferación de tenocitos. El efecto del ácido ascórbico en la producción de óxido nítrico. *Músculos Ligamentos Tendones* **2017**,*7*, 11-18. [[Referencia cruzada](#)]
24. Xia, W.; Szomor, Z.; Wang, Y.; Murrell, GA El óxido nítrico mejora la síntesis de colágeno en células de tendón humano cultivadas. *J. Orthop. Res*.**2006**,*24*, 159-172. [[Referencia cruzada](#)]
25. James, R.; Kesturu, G.; Balian, G.; Chhabra, AB Tendon: biología, biomecánica, reparación, factores de crecimiento y opciones de tratamiento en evolución. *J. Cirugía de la mano*.**2008**,*33*, 102–112. [[Referencia cruzada](#)]
26. Oliva, F.; Berardi, AC; Misiti, S.; Verga Falzacappa, C.; Iacone, A.; Maffulli, N. Las hormonas tiroideas mejoran el crecimiento y contrarrestan la apoptosis en tenocitos humanos aislados de tendones del manguito rotador. *Enfermedad por muerte celular*.**2013**,*4*, e705. [[Referencia cruzada](#)]
27. Yao, L.; Bestwick, CS; Bestwick, Luisiana; Maffulli, N.; Aspden, RM Deriva fenotípica en cultivo de tenocitos humanos. *Ing. de Tejidos*.**2006**,*12*, 1843–1849. [[Referencia cruzada](#)]

-
28. Berardi, AC; Oliva, F.; Berardocco, M.; la Rovere, M.; Accorsi, P.; Maffulli, N. Las hormonas tiroideas aumentan la expresión del colágeno I y de la proteína de la matriz oligomérica del cartílago (COMP) en tenocitos humanos in vitro. *Músculos Ligamentos Tendones*.**2014**,*4*, 285–291. [[Referencia cruzada](#)]
 29. Gallorini, M.; Berardi, AC; Ricci, A.; Antonetti Lamorgese Passeri, C.; Zara, S.; Oliva, F.; Cataldi, A.; Carta, F.; Carradori, S. Las moléculas liberadoras de monóxido de carbono de doble acción y los inhibidores de la anhidrasa carbónica modulan diferencialmente la inflamación en los tenocitos humanos. *Biomedicinas***2021**,*9*, 141. [[Referencia cruzada](#)]
 30. Smolewski, P.; Bedner, E.; Du, L.; Hsieh, TC; Wu, JM; Phelps, DJ; Darzynkiewicz, Z. Detección de la activación de caspasas mediante inhibidores marcados con fluorocromo: análisis multiparamétrico mediante citometría de barrido láser. *Citomo. J. Int. Soc. Anal. Citol.***2001**, *44*, 73–82. [[Referencia cruzada](#)]
 31. Alagöz, MA; Özdemir, Z.; Uysal, M.; Carradori, S.; Gallorini, M.; Ricci, A.; Zara, S.; Mathew, B. Síntesis, citotoxicidad y actividad antiproliferativa contra células AGS de nuevos derivados de 3 (2H) -piridazinona dotados con un conector de piperazinilo. *Productos farmacéuticos***2021**,*14*, 183. [[Referencia cruzada](#)]