



healthfactories

power therapy engineering

Studi Effettuati dalla Paracelsus Medical University

Paracelsus Medical University - Lesioni del midollo spinale e centro di rigenerazione tessutale di Salisburgo, 5020 Salisburgo, Austria

Le risposte globali del tendine 3D IL-1 β -Primed si trasformano in trattamento con campi elettromagnetici pulsanti

Renate Gehwolf 1,2, Bettina Schwemberger 1,2, †, Malik Jessen 1,2,3, †, Stefanie Korntner 4, Andrea Wagner 1,2, Christine Lehner 1,2, Nadja Weissenbacher 1,2, Herbert Tempfer 1,2 and Andreas Traweger 1,2, *

1 Istituto di tendine e rigenerazione ossea, Paracelsus Medical University - Lesioni del midollo spinale e centro di rigenerazione tessutale di Salisburgo, 5020 Salisburgo, Austria

2 Cluster austriaco per rigenerazione tessutale, 1200 Vienna, Austria

3 Istituto di medicina trasfusionale e immunologia, Facoltà di medicina Mannheim, Croce rossa tedesca Donatore di sangue Baden-Württemberg-Hessen gGmbH, Università di Heidelberg, 68167 Mannheim, Germania

4 Ingegneria rigenerativa, modulare e dello sviluppo Laboratorio (REMODEL); Science Foundation Ireland Centre for Research in Medical Devices (CÚRAM) Università Nazionale d'Irlanda Galway; H91 W2TY Galway, Irlanda * Corrispondenza: andreas.traweger@pmu.ac.at; Tel. : + 43-662-2420-80860 † Questi autori hanno contribuito ugualmente a questo lavoro. Ricevuto: 28 marzo 2019 / Accettato: 27 aprile 2019 / Pubblicato: 30 aprile 2019

Abstract:

la tendinopatia è accompagnata da una catena di eventi infiammatori che promuovono la degenerazione del tendine. Tra le varie citochine, l'interleuchina-1 β svolge un ruolo centrale nel guidare i processi catabolici, portando infine all'attivazione delle metalloproteinasi della matrice e ad una diminuita sintesi del collagene, che promuovono entrambi la degradazione della matrice extracellulare del tendine. La terapia a campi elettromagnetici pulsati (PEMF) viene spesso utilizzata per la gestione del dolore, l'osteoartrosi e la guarigione ritardata della ferita.

È stato dimostrato che il trattamento PEMF in vitro delle cellule derivate dai tendini modula le citochine pro-infiammatorie, limitando potenzialmente i loro effetti catabolici. Tuttavia, la nostra comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari sottostanti rimane limitata.

Abbiamo quindi studiato le risposte a livello di trascrittoma di costrutti simili a tendine 3D di derivazione di Achille basati su cellule di tendine di Achille di ratto primerizzato al trattamento PEMF ad alta energia. L'analisi RNASeq e l'assegnazione di ontologia genetica hanno rivelato vari processi biologici che sono stati influenzati dalla PEMF, tra cui il rimodellamento della matrice extracellulare e la regolazione negativa dell'apoptosi. Inoltre, mostriamo che i membri della famiglia di citoprotezione IL-6 / gp130 e il recettore di illecito IL-1 β IL1r2 sono regolati positivamente sull'esposizione a PEMF. In conclusione, i nostri risultati forniscono una visione meccanicistica fondamentale della modalità di azione cellulare e molecolare della PEMF sulle cellule dei tendini e possono aiutare a ottimizzare i protocolli di trattamento per la terapia non invasiva delle tendinopatie.

Parole chiave: tendine; tendinopatia; campo elettromagnetico pulsato (PEMF); stimolazione magnetica periferica ripetitiva (rPMS); IL-1 β ; ricevitore di decoy IL1r2; RNA-Seq; apoptosi

1. Introduzione Lesioni da uso eccessivo dei tendini e tendinopatie rappresentano condizioni debilitanti che colpiscono sia la popolazione attiva che gli atleti dilettanti e rappresentano una delle condizioni più frequenti muscolo-scheletriche per le quali i pazienti richiedono un parere medico

[1]. Nonostante molti progressi della medicina, le lesioni al tendine acuto e le tendinopatie croniche rimangono clinicamente impegnative

[2]. La natura ipocellulare e ipovascolare in combinazione con l'intricata architettura della matrice extracellulare (ECM) ostacola in modo significativo la guarigione dei tessuti, con conseguente tessuto cicatriziale biomeccanicamente inferiore soggetto a ri-rottura e spesso favorendo lo sviluppo e la progressione dei processi degenerativi

[3]. Generalmente, i risultati dei trattamenti attuali, inclusi fisioterapia, ultrasuoni, terapia con onde d'urto extracorporee, farmaci antinfiammatori non steroidei e, infine, la chirurgia sono spesso insoddisfacenti e i tempi di riabilitazione possono essere lunghi

[4]. Lo sviluppo di strategie di trattamento efficaci è attualmente ostacolato dalla nostra scarsa comprensione degli eventi molecolari e cellulari alla base della tendinopatia. In passato la tendinopatia è stata principalmente considerata un processo non infiammatorio e degenerativo. In effetti, è in corso un dibattito sull'eventualità che l'infiammazione sia un fattore chiave della tendinopatia. Tuttavia, studi recenti dimostrano in modo convincente che una cascata di eventi infiammatori, come l'infiltrazione di linfociti e macrofagi, l'attivazione della matrice metalloproteasi (MMP) e la secrezione di mediatori dell'infiammazione, incluse varie citochine, prostaglandine e ossido nitrico [5,6,7] sono centrale per l'eziologia delle tendinopatie. Sebbene le citochine chiave nella malattia del tendine non siano state ancora del tutto definite, i familiari della famiglia dell'interleuchina -1 (IL-1), in particolare IL-1 β , possono innescare la degradazione catabolica della ECM tramite l'attivazione di MMPs, contribuendo così a la progressione della tendinopatia

[8,9]. Pertanto, mirare alla cascata infiammatoria per spostare una risposta infiammatoria "degenerativa" a una risposta "rigenerativa" e ridurre il rimodellamento aberrante della ECM sembra promettente per gestire le tendinopatie. Diversi regimi di trattamento conservativo vengono applicati per ridurre il dolore e migliorare la funzione del tendine, comprese varie modalità di elettroterapia. Una terapia emergente per il trattamento dell'infiammazione sia acuta che cronica è l'applicazione di campi elettromagnetici pulsati a bassa e alta energia (PEMF) [10,11], quest'ultima chiamata anche stimolazione magnetica periferica

ripetitiva (rPMS). Nel 1979, la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha approvato la PEMF come sicura ed efficace per il trattamento di ritardati e non ioni nell'osso

[12]. Da allora, PEMF è stato proposto per essere efficace nel trattamento di una varietà di patologie, compresa la guarigione ritardata della ferita [13], il dolore postoperatorio cronico [14] e l'osteoartrite [15,16].

In vitro, la PEMF ha dimostrato di essere potente nel limitare gli effetti catabolici delle citochine proinfiammatorie sulla cartilagine ialina [17,18], suggerendo che la PEMF è in grado di limitare l'infiammazione e promuovere la riparazione dei tessuti molli. Inoltre, PEMF a bassa intensità, ha dimostrato di inibire il rilascio di PGE2 indotto da TNF- α o LPS nei fibroblasti sinoviali bovini, molto probabilmente mediante la modulazione delle vie anti-infiammatorie mediate da adenosina [19]. Più recentemente, è stata studiata la possibilità di applicare PEMF per la gestione dei disturbi del tendine. Il trattamento PEMF dei tenociti umani in colture cellulari in vitro 2D ha provocato un alterato profilo di citochine e TGF β e una maggiore espressione del collagene di tipo I [20].

Studi preclinici in vivo indicano anche che il trattamento con un campo elettromagnetico pulsato a bassa frequenza può migliorare la riparazione del tendine di Achille del ratto [21,22]. Infine, in uno studio clinico controllato e randomizzato, Osti et al. hanno dimostrato che il trattamento con PEMF riduce il dolore postoperatorio, l'uso di analgesici e la rigidità dopo la riparazione della cuffia dei rotatori. È interessante notare che gli autori non hanno osservato alcun miglioramento funzionale in un follow-up di 2 anni [23]. Complessivamente, la nostra comprensione delle risposte biologiche dei tenociti a un segnale fisico da uno stimolo elettromagnetico rimane molto limitata. Pertanto, l'obiettivo di questo studio era di indagare le risposte a livello di trascrittoma di costrutti simili a tendini 3D coltivate in condizioni pro-infiammatorie al trattamento PEMF / rPMS ad alta energia. I risultati di questo studio forniscono approfondimenti meccanicistici sul cellulare e molecolare ramificazioni del trattamento PEMF e sosterranno lo sviluppo di protocolli ottimizzati per il trattamento non invasivo delle tendinopatie.

2. Materiali e metodi

2.1. Animali e coltura cellulare Sono stati usati ratti Fischer344 di tre mesi per tutti gli esperimenti. I ratti dei donatori di tessuti sono stati alloggiati e sottoposti ad eutanasia conformemente alle rispettive leggi austriache sul benessere degli animali e sulla sperimentazione. Staminali tendinee e cellule progenitrici (successivamente denominate TDSPC) sono state isolate e coltivate come descritto in precedenza [24]. In breve, i tendini di Achille sono stati sezionati in condizioni sterili e lavati con PBS sterile senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (successivamente denominato PBS) e α -MEM (mezzo essenziale minimo con GlutaMAXTM da 2 mM). Il tessuto del tendine è stato quindi tagliato in piccoli pezzi e incubato in 3 mg / ml di collagenasi di tipo II (Gibco Lifetechnologies, Vienna, Austria) in α -MEM con siero bovino fetale al 10% (FBS), Glutamax 2 mM, 100 unità mL⁻¹ penicillina e 0,1 mg di mL⁻¹ streptomicina (P / S, SigmaAldrich, Vienna, Austria), O / N a 37 ° C, 5% di CO₂ e 90% di umidità. Il giorno seguente, le cellule sono state lavate in α -MEM con FBS al 10%, Glutamax 2 mM e P / S e coltivate fino a quasi una confluenza. Il numero di cellule e la vitalità cellulare sono stati determinati con un sistema di conteggio delle cellule di LunaTM (Logos Biosystems, Annandale, VA, USA) in base alle istruzioni del produttore. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con cellule al passaggio

3. 2.2. Formazione di costrutti simili ai tendini in vitro

3. I costrutti del tendine D sono stati assemblati come descritto in riferimento [25]. In breve, ciascuna capsula di Petri è stata rivestita con 15 mL di elastomero silconico Sylgard 184 (Dow-Chemicals, Vienna, Austria) e lasciato polimerizzare a 48 ° C O / N. Successivamente, suture di seta lunghe 2 × 0,8 mm sono state appuntate con perni di insetti minuti (0,1 mm di diametro, Science Service, Monaco, Germania) sullo strato di silicone con una distanza di 1 cm tra le due suture (8 unità per piatto di coltura). Le piastre sono

state quindi sterilizzate con etanolo al 70% e esposte a irradiazione UV per 30 minuti ciascuna. Prima dell'uso le piastre sono state lavate con PBS sterile. TDSPCs (passaggio 3) sono stati risospesi in 2 mg / mL di collagene puro di ghiaccio freddo di tipo 1 (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) in α -MEM senza siero integrato con P / S ad un numero di cellule finale di $2,5 \times 10^5$ mL⁻¹. Sospensione cellulare (130 μ L per ogni struttura) è stata quindi immediatamente pipettata tra le 2 suture di seta. Il collagene è stato quindi lasciato polimerizzare per 1 ora a 37 ° C in un incubatore di colture cellulari. Infine, sono stati aggiunti 15 mL di terreno di coltura completo (α -MEM integrato con FBS al 10%, GlutaMax 2 mM, P / S, 10 μ g / mL di aprotinina, acido ascorbico 0,2 mM e L-prolina 0,05 mM) e il mezzo era scambiato ogni altro giorno. Dopo 7 giorni di contrazione, i costrutti simili ai tendini sono stati utilizzati per il trattamento PEMF. 2.3. Stimolazione Pro-Infiammatoria / Condizionamento di costrutti simili a tendini La stimolazione pro-infiammatoria di costrutti tendinei è stata effettuata dopo 7 giorni di contrazione con 10 ng / mL di ratto ricombinante interleuchina-1 β (rIL-1 β , PeproTech, Vienna, Austria) in mezzo di coltura per 24 ore. Un'ora prima del trattamento con PEMF / esposizione con terreno contenente rIL-1 β è stato sostituito con terreno di coltura completo senza rIL-1 β . I surnatanti sono stati raccolti prima del trattamento con rIL-1 β (supernatante 1), dopo 24 ore di incubazione con rIL-1 β (supernatante 2) e dopo il protocollo di esposizione PEMF completato (2 cicli di 60 min di esposizione PEMF e 90 minuti di riposo ciascuno; surnatante 3) e conservato a -80 ° C fino al successivo utilizzo.

2.4. Trattamento PEMF Il trattamento PEMF / rPMS ad alta energia è stato eseguito con un dispositivo promosso © OMNITRON (Healthfactories GmbH, Surheim, Germania). La massima densità del flusso magnetico e la frequenza fondamentale del segnale PEMF erano 82 mT e 125 kHz, rispettivamente. La frequenza dell'impulso era 2 Hz con una durata di burst di 80 μ sec. I costrutti del tendine 3D sono stati trattati come segue: 2 cicli di trattamento a 82 mT per 60 minuti ciascuno seguiti per 90 minuti di riposo sono stati eseguiti in un incubatore di colture cellulari a 37 ° C, 5% di CO₂ e 90% di umidità. I costrutti sono stati raccolti 90 minuti dopo la seconda esposizione.

2.5. Vitalità cellulare, attività metabolica e test di citotossicità La vitalità cellulare è stata analizzata dal kit di imaging LIVE / DEAD (Invitrogen, Vienna, Austria) in base alle istruzioni del produttore su un microscopio a scansione laser LSM700 (Carl Zeiss, Jena, Germania). L'attività metabolica cellulare e la citotossicità dopo il trattamento con PEMF sono state determinate utilizzando il test CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Cell (MTS) e misurando il contenuto totale di ATP utilizzando il test CellTiter Glo® 2.0 (sia Promega, Vienna, Austria) che segue il produttore Istruzioni.

2.6. Isolamento, quantificazione e convalida dell'RNA I costrutti simili a tendini sono stati lavati in PBS sterile e poi omogeneizzati su TRIzol (FisherScientific, Vienna, Austria) su ghiaccio utilizzando un Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Germania). L'RNA totale è stato preparato secondo le istruzioni del produttore con piccole modifiche. Sono stati eseguiti due ulteriori passaggi di estrazione di cloroformio. Successivamente, l'RNA totale è stato precipitato per 30 minuti a -20 ° C con un uguale volume di isopropanolo ghiacciato e con l'aggiunta di 1 μ g di co-precipitatore GlycoBlue (Ambion, Lifetechnologies, Vienna, Austria), seguito da centrifugazione per 30 minuti a 13.000 giri al minuto a 4 ° C. I pellet di RNA sono stati risospesi in acqua priva di RNasi con 20 unità di inibitore SuperaseTMRNase (Ambion, Lifetechnologies, Vienna, Austria) e conservati a -80 ° C fino a nuovo utilizzo. La resa di RNA è stata quantificata utilizzando un Nanodrop 2000C (ThermoFisher Scientific, Vienna, Austria) e l'integrità dell'RNA è stata verificata utilizzando un sistema di elettroforesi automatizzata Experion (Biorad, Monaco, Germania). Un requisito minimo dell'indicatore di qualità dell'RNA (RQI) > 9.0 è stato scelto per il sequenziamento dell'RNA e RT-qPCR.

2.7. La preparazione della libreria RNASeq e analisi dei dati e il sequenziamento dell'RNA (sequenziamento dell'mRNA, letture single-end 50bp, 30M per campione) sono stati eseguiti presso Exiqon (Qiagen, Hilden, Germania). L'analisi è stata eseguita su costrutti tendine stabiliti con cellule tendine isolate da 3 singoli ratti. L'espressione di espressione differenziale e l'ontologia del gene (GO) è stata eseguita utilizzando FunRich (<http://www.funrich.org/>; v 3.1.3; database GO Norvegia rat, ID: 10116). I geni con un p-value

aggiustato inferiore a 0.05 sono stati utilizzati per ulteriori analisi e i geni candidati sono stati verificati mediante RT-PCR quantitativa.

2.8. Trascrizione inversa ed analisi dell'espressione genica La sintesi del cDNA del primo filamento è stata eseguita con iScript SupermixTM (Biorad, Monaco, Germania) in base alle raccomandazioni del produttore. Per PCR quantitativa 5 ng / po cDNA è stato successivamente analizzato utilizzando TaqMan Assays (sia da Integrated DNA Technologies o Applied Biosystems, vedere la tabella supplementare S4) e Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs, Francoforte sul Meno, Germania). Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: denaturazione iniziale per 60 s a 95 ° C, seguita da 40 cicli di 15 s a 95 ° C e 30 s a 60 ° C. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicati e i valori CQ sono stati analizzati utilizzando qBaseplus v2.4 (Biogazelle) e le quantità relative normalizzate sono state calcolate normalizzando i dati all'espressione di geni di controllo endogeno precedentemente validati come descritto in riferimento [26].

2.9. Protein Lysates, SDS-PAGE e Western Blot I costrutti simili a tendini sono stati lavati in PBS, lisati e omogeneizzati in tampone RIPA ghiacciato (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) integrato con cocktail inibitore della proteasi (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria; concentrazioni finali di AEBSF (4- (2Aminoethyl) benzensulfonylfluorid) a 1,04 mM, Aprotinina a 0,8 µM, Bestatina a 40 µM, Leupeptina a 20 µM, E-64 a 14 µM e Pepstatin A a 15 µM) e 1 × inibitore della fosfatasi cocktail 3 (Sigma Aldrich, Vienna, Austria). Da 10 a 20 µg di proteine totali sono stati separati su gel di poliacrilammide TGX Stain-freeTM al 10-12% (Biorad, Monaco, Germania) in tampone Laemmli [27]. Le proteine sono state poi trasferite a un fluoruro di polivinilidene (PVDF) membrana (Biorad, Monaco di Baviera, Germania) e successivamente le membrane sono state bloccate per 2 ore in BSA al 5% in soluzione salina tamponata tris con 0,05% di Tween 20 (successivamente denominato TBST). Le membrane sono state sondate con O / N a 4 ° C in anticorpi primari (topo anti-ERK1 / 2; 1: 1000; R & D Systems e coniglio antiphospho-p44 / 42 ERK1 / 2 (Thr202 / Tyr204), 1: 2000; Cell Signaling Technologies) in una soluzione di blocco. Dopo il lavaggio delle membrane in TBST, le membrane sono state sondate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi appropriati in TBST per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio finale, le macchine sono state sviluppate utilizzando un sistema di imaging Chemidoc MP e il substrato Clarity Western ECL (Biorad, Monaco, Germania).

2.10. Cryo-Embedding e Sectioning I costrutti simili a tendine sono stati lavati in PBS e fissati in paraformaldeide al 4% per 1 ora a temperatura ambiente, lavati due volte per 15 minuti in PBS, incubati in serie O / N in saccarosio al 15% (p / v) in PBS, O / N in saccarosio al 30% (p / v) in PBS e O / N in miscela 1: 1 di saccarosio 30% e composto di sezione congelata Surgipath[®] FSC22[®] (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Infine, i costrutti sono stati crioconservati in composto di sezione FSC22[®] congelato Surgipath[®] su ghiaccio secco e conservati a -80 ° C fino al successivo utilizzo. Il sezionamento (sezioni da 10 e 20 µm) è stato eseguito con un microtomo Criostato CM1950 (Leica Microsystems, Vienna, Austria).

2.11. TUNEL Staining and Caspase3 / 7 Assay Activity La determinazione dell'apoptosi è stata eseguita colorando le criosezioni con il kit di rilevamento della morte cellulare in situ, Fluoresceina (Roche, Vienna, Austria) in base alle raccomandazioni del produttore. La quantificazione della colorazione TUNEL è stata eseguita utilizzando il software ImageJ software ImageJ v. 150a [28]. L'attività di Caspase3 / 7 è stata misurata utilizzando lisati proteici di costrutti tendinei e il saggio Caspase-Glo[®] 3/7 (Promega, Vienna, Austria).

2.12. Per la determinazione dell'orientamento delle fibre di collagene di tipo I e della densità di impaccamento è stata utilizzata la quantificazione del rapporto di aspetto nucleare, l'orientamento delle cellule e la microscopia di densità del collagene. L'intensità della birifrangenza è stata misurata mediante quantificazione dell'intensità media dei pixel utilizzando il software ImageJ v. 150a [28]. Per la microscopia di polarizzazione, le sezioni non colorate dei costrutti tendinei sono state riprese utilizzando un obiettivo 10 × o 16 × dotato di un filtro di polarizzazione montato su un microscopio Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Germania). L'orientamento delle cellule è stato determinato mediante il calcolo del rapporto di aspetto

nucleare [29] e la deviazione angolare dell'orientamento delle fibre di tensione su sezioni colorate con rodaminefalosidina.

2.13. Interleukin-6 ELISA e quantificazione della produzione di NO La secrezione dell'interleuchina-6 (IL-6) dei costrutti tendinei è stata determinata in surnatanti di colture cellulari raccolti come descritto sopra utilizzando un kit ELISA IL-6 di ratto (RayBiotech, Norcross, GA, USA) secondo le istruzioni del produttore. La rilevazione dei metaboliti di NO in supernatanti di colture cellulari è stata eseguita con un kit di dosaggio nitrito / nitrato colorimetrico (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) in base alle istruzioni del produttore. Per la determinazione della concentrazione di nitrato, 5 µL di nitrato riduttasi e 5 µL di soluzione di co-fattore enzimatico sono stati aggiunti a 40 µL di campione in una piastra a 96 pozzetti. Dopo un'incubazione di 2 ore a 25 ° C con agitazione, 50 µL di soluzione Griess A sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati per 15 minuti a 25 ° C su un agitatore. Infine, sono stati aggiunti 50 µL di soluzione Griess B e la piastra è stata incubata su uno shaker per 10 minuti a 25 ° C, prima dell'assorbimento a 540 nm ma misurata in un lettore di micropiastre Tecan SPARK (Tecan, Groedig, Austria). La concentrazione di nitrito / nitrato è stata calcolata con una curva standard di nitrito + nitrato sottraendo il valore del bianco medio da tutti i pozzetti. Per la concentrazione totale di NO nei campioni, sono state riassunte le concentrazioni di NO₃⁻ + NO₂⁻.

2.14. MMP2 e MMP9 in Gel Zymography Per la determinazione dell'attività enzimatica di MMP2 e MMP9, i supernatanti di colture cellulari di costrutti 3D tendinei sono stati analizzati mediante gel in gel zimografia. Pertanto, il 10% di gel SDS-poliacrilammide è stato copolimerizzato con gelatina 1 mg / ml.

Il supernatanti di colture cellulari (30 µl ciascuno) sono stati miscelati con tampone di campionamento per ssione di tris-glicina Laemmli e incubati per 10 minuti a temperatura ambiente, quindi sono stati caricati i campioni e il gel è stato eseguito con tampone da corsa tris-glicina SDS-PAGE. Per il gel di rivelazione dell'attività enzimatica sono stati incubati in tampone renaturing 1 × (2,5% Triton X-100 (v / v) in acqua) per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione delicata per rimuovere SDS e consentire alle MMP di renatura, seguite da 30 minuti in 1 Buffer di sviluppo × zimogramma (50 mM Tris-HCl pH 7,45, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ e 0,02% (v / v) Brij 35). Il tampone di sviluppo è stato sostituito una volta e i gel sono stati incubati durante la notte a 37 ° C con agitazione delicata per la massima sensibilità. Il giorno successivo, i gel sono stati colorati per 30 min con 0,5% (p / v) di Coomassie Brilliant Blue in 40% (v / v) di etanolo e 10% (v / v) di acido acetico in acqua e stabilizzati con una miscela di 40% (v / v) di etanolo e 10% (v / v) di acido acetico in acqua fino a quando le bande chiare diventano visibili. Quelle bande chiare rappresentavano le aree in cui le MMP avevano digerito il substrato di gelatina. Per la quantificazione i gel sono stati fotografati con il dispositivo ChemiDoc MP (BioRad, Monaco, Germania) e le intensità della banda sono state misurate usando lo strumento Volume del software ImageLab (BioRad, Monaco, Germania).

2.15. Analisi statistica Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software Graph Pad Prism (versione 5.04). I dati densitometrici sono presentati come medie con deviazioni standard. L'analisi della variazione a senso unico (ANOVA) che applicava il test KruskalWallis non parametrico è stata utilizzata per verificare le differenze tra i gruppi. L'analisi a coppie dei dati qRT-PCR è stata eseguita utilizzando il test di Mann-Whitney. Un valore p <0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

3. Risultati

3.1. Progettazione sperimentale e analisi dei dati RNASeq Come illustrato nel flusso di lavoro di progettazione sperimentale (Figura 1A), campioni di RNA totale sono stati raccolti da colture di tenociti incapsulate in coltura in vitro generate da TDSPC isolate da tendini di Achille di ratto. In totale, sono stati ottenuti 3 replicati biologici (costrutti tendine di 3 singoli animali) e 8 costrutti per animale e il trattamento sono stati assemblati in un singolo piatto (Figura 1B). I costrutti sono stati stimolati con IL-1β per 12 ore o non trattati e successivamente esposti a PEMF / rPMS come descritto nella sezione dei metodi (Figura 1C). In totale 12 librerie RNA-seq sono state preparate e sequenziate a profondità da 24,23 a 31,96 milioni di letture per campione. In tutte le librerie, le velocità di allineamento della lettura single-end al genoma del

ratto Rnor_5.0 erano comprese tra 84,05 e 92,98%. Per l'analisi differenziale sono stati effettuati due confronti a coppie utilizzando Cuffdiff2: (1) controllo non trattato vs stimolazione Il-1 β (2) trattamento PEMF vs stimolazione Il-1 β e trattamento PEMF (vedere la tabella supplementare S1).

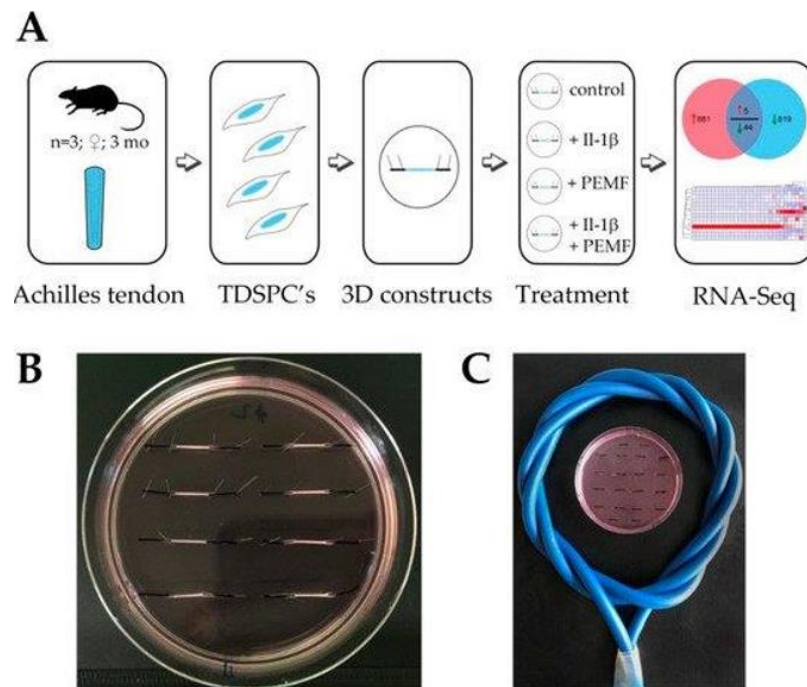


Figura 1.

Impostazione sperimentale per il trattamento di campi elettromagnetici ad impulsi ad alta energia (PEMF / rPMS) di costrutti tendinei. (A) Le cellule progenitrici derivate da tendine derivato sono state isolate da ratti femmine F344 di 3 mesi ($n = 3$) e utilizzate per la generazione di costrutti simili a tendini 3D. Sono stati stabiliti quattro diversi gruppi di trattamento: un gruppo di controllo non trattato, un gruppo trattato + Il-1 β , un gruppo di trattamento + PEMF e un gruppo di trattamento + PEMF + Il-1 β . Dopo il trattamento con PEMF, l'RNA totale dei 4 gruppi di trattamento è stato isolato per l'analisi RNASeq. (B) Immagine di costrutti tendinei dopo 7 giorni di contrazione. (C) Posizione dei costrutti tendinei nella spirale PEMF durante il trattamento.

È importante sottolineare che né la stimolazione con Il-1 β né l'esposizione a PEMF hanno ridotto la vitalità dei costrutti incorporati in 3D come evidenziato dalla colorazione Live / Dead (Figura 2A). Inoltre, l'esposizione al PEMF non ha avuto un impatto negativo sull'attività metabolica o sulla produzione di ATP dei TDSPC incorporati. Non sorprende che la stimolazione a 24 h con 10 ng / mL di Il-1 β abbia moderatamente abbassato l'attività metabolica delle cellule, senza differenze evidenti dopo l'esposizione a PEMF (Figura 2B, C). Presi insieme, il trattamento PEMF e Il-1 β dei costrutti 3D non ha suscitato un significativo effetto citotossico.

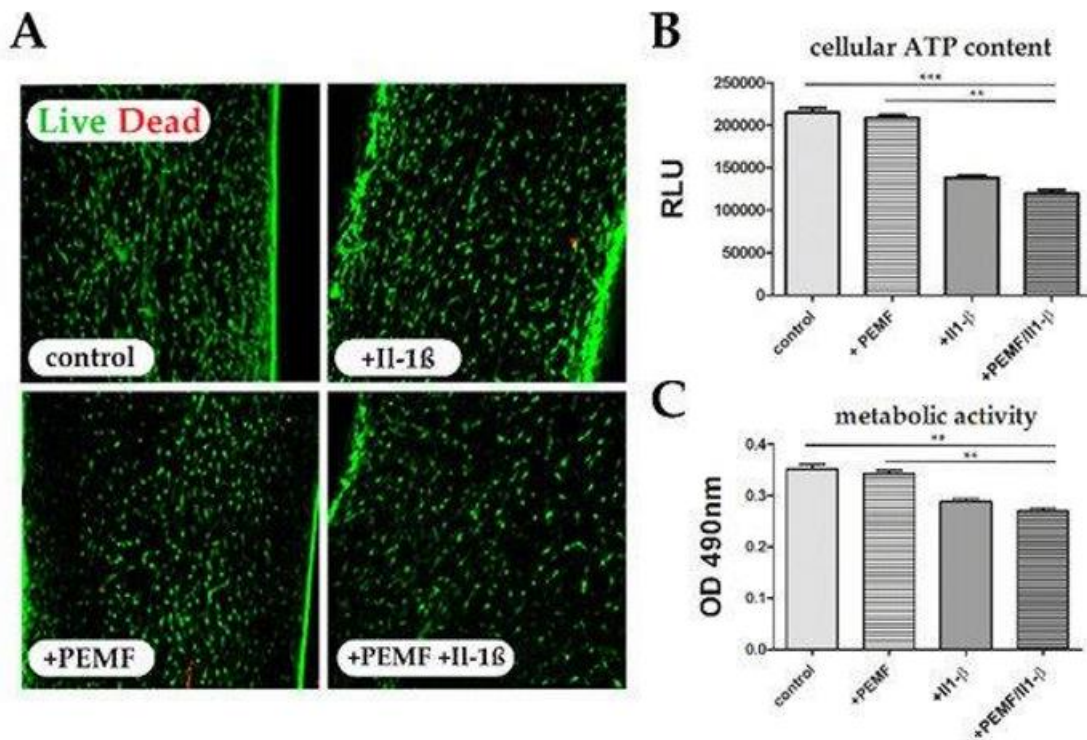
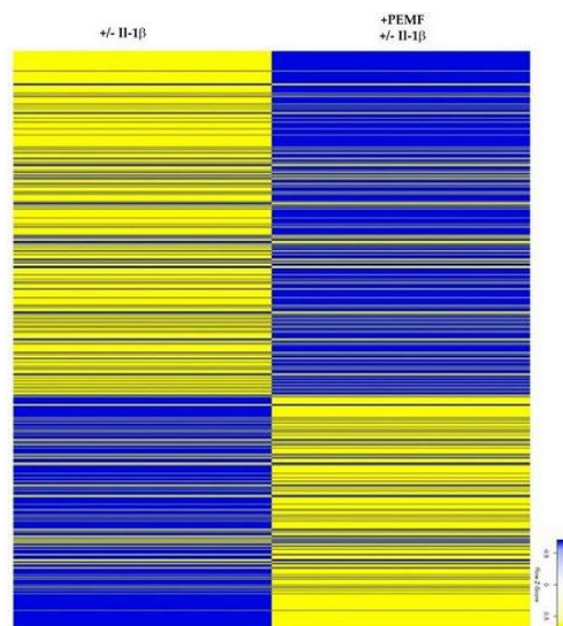


Figura 2.

Vitalità cellulare e attività metabolica cellulare dei costrutti simili a tendini trattati (A) Analisi vivo / morto che mostra cellule vitali in cellule verdi e morte in rosso. (B) Il contenuto totale di ATP cellulare dopo il trattamento con IL-1 β e +PEMF + IL-1 β è significativamente diminuito rispetto al trattamento non trattato o al solo trattamento con PEMF. (C) Il test MTT è stato eseguito per la determinazione dell'attività metabolica dei TDSPC, mostrando una significativa riduzione dell'attività metabolica nei gruppi di trattamento + IL-1 β e +PEMF + IL-1 β . ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2. Risposte Globali in TDSPC IL-1 β -Primed dopo PEMF Exposure L'esplorazione esplorativa della mappa di calore ha rivelato che l'esposizione di costrutti tendinei 3D trattati con IL-1 β ha provocato un cambiamento nel pattern di espressione di circa 5400 geni (valore $p < 0,05$; Figura 3 e integratori Tabella S1).



Heatmap non controllata di geni differenzialmente espressi dimostra risposte globali di costrutti 3D dopo esposizione PEMF (cambiamento $\geq 2,5$ volte, valore $p < 0,05$). Al fine di caratterizzare ulteriormente i geni regolati in risposta al PEMF, l'analisi di ontologia genica (GO) è stata eseguita sulla base di geni identificati per essere regolati differenzialmente tra i 2 gruppi (cambiamento di piega [+ PEMF +/- Il-1 β] vs. [+ / - Il-1 β]; Supplementary Table S1). I primi 20 termini GO classificati per il valore p corretto sono elencati nella Tabella 1. È interessante notare che, accanto a termini più generali (ad es. Risposta al farmaco, regolazione della proliferazione cellulare, ecc.), i geni differenzialmente espressi sono stati assegnati ai processi che guidano il negativo regolazione dell'apoptosi cellulare, organizzazione della matrice extracellulare e fibrillazione del collagene e guarigione delle ferite (vedere la Tabella S2 supplementare per i geni assegnati).

Sulla base dell'assegnazione ai vari processi biologici, è stata generata nuovamente una heatmap non riservata per tutti i geni che mostrano una differenza minima di espressione di 2 volte.

A

PEMF

+/- II-1β **+/- II-1β**

Adams9
Adams14
Ccdc80
Col11a1
Col11a2
Col12a1
Col12a2
Col14a1
Col1a1
Col1a2
Col2a1
Col3a1
Col3a2
Col3a3
Col3a4
Col3a5
Col3a6
Col3a7
Col3a8
Col3a9
Col3a10
Col3a11
Col3a12
Col3a13
Col3a14
Col3a15
Col3a16
Col3a17
Col3a18
Col3a19
Col3a20
Col3a21
Col3a22
Col3a23
Col3a24
Col3a25
Col3a26
Col3a27
Col3a28
Col3a29
Col3a30
Col3a31
Col3a32
Col3a33
Col3a34
Col3a35
Col3a36
Col3a37
Col3a38
Col3a39
Col3a40
Col3a41
Col3a42
Col3a43
Col3a44
Col3a45
Col3a46
Col3a47
Col3a48
Col3a49
Col3a50
Col3a51
Col3a52
Col3a53
Col3a54
Col3a55
Col3a56
Col3a57
Col3a58
Col3a59
Col3a60
Col3a61
Col3a62
Col3a63
Col3a64
Col3a65
Col3a66
Col3a67
Col3a68
Col3a69
Col3a70
Col3a71
Col3a72
Col3a73
Col3a74
Col3a75
Col3a76
Col3a77
Col3a78
Col3a79
Col3a80
Col3a81
Col3a82
Col3a83
Col3a84
Col3a85
Col3a86
Col3a87
Col3a88
Col3a89
Col3a90
Col3a91
Col3a92
Col3a93
Col3a94
Col3a95
Col3a96
Col3a97
Col3a98
Col3a99
Col3a100
Col3a101
Col3a102
Col3a103
Col3a104
Col3a105
Col3a106
Col3a107
Col3a108
Col3a109
Col3a110
Col3a111
Col3a112
Col3a113
Col3a114
Col3a115
Col3a116
Col3a117
Col3a118
Col3a119
Col3a120
Col3a121
Col3a122
Col3a123
Col3a124
Col3a125
Col3a126
Col3a127
Col3a128
Col3a129
Col3a130
Col3a131
Col3a132
Col3a133
Col3a134
Col3a135
Col3a136
Col3a137
Col3a138
Col3a139
Col3a140
Col3a141
Col3a142
Col3a143
Col3a144
Col3a145
Col3a146
Col3a147
Col3a148
Col3a149
Col3a150
Col3a151
Col3a152
Col3a153
Col3a154
Col3a155
Col3a156
Col3a157
Col3a158
Col3a159
Col3a160
Col3a161
Col3a162
Col3a163
Col3a164
Col3a165
Col3a166
Col3a167
Col3a168
Col3a169
Col3a170
Col3a171
Col3a172
Col3a173
Col3a174
Col3a175
Col3a176
Col3a177
Col3a178
Col3a179
Col3a180
Col3a181
Col3a182
Col3a183
Col3a184
Col3a185
Col3a186
Col3a187
Col3a188
Col3a189
Col3a190
Col3a191
Col3a192
Col3a193
Col3a194
Col3a195
Col3a196
Col3a197
Col3a198
Col3a199
Col3a200
Col3a201
Col3a202
Col3a203
Col3a204
Col3a205
Col3a206
Col3a207
Col3a208
Col3a209
Col3a210
Col3a211
Col3a212
Col3a213
Col3a214
Col3a215
Col3a216
Col3a217
Col3a218
Col3a219
Col3a220
Col3a221
Col3a222
Col3a223
Col3a224
Col3a225
Col3a226
Col3a227
Col3a228
Col3a229
Col3a230
Col3a231
Col3a232
Col3a233
Col3a234
Col3a235
Col3a236
Col3a237
Col3a238
Col3a239
Col3a240
Col3a241
Col3a242
Col3a243
Col3a244
Col3a245
Col3a246
Col3a247
Col3a248
Col3a249
Col3a250
Col3a251
Col3a252
Col3a253
Col3a254
Col3a255
Col3a256
Col3a257
Col3a258
Col3a259
Col3a260
Col3a261
Col3a262
Col3a263
Col3a264
Col3a265
Col3a266
Col3a267
Col3a268
Col3a269
Col3a270
Col3a271
Col3a272
Col3a273
Col3a274
Col3a275
Col3a276
Col3a277
Col3a278
Col3a279
Col3a280
Col3a281
Col3a282
Col3a283
Col3a284
Col3a285
Col3a286
Col3a287
Col3a288
Col3a289
Col3a290
Col3a291
Col3a292
Col3a293
Col3a294
Col3a295
Col3a296
Col3a297
Col3a298
Col3a299
Col3a300
Col3a301
Col3a302
Col3a303
Col3a304
Col3a305
Col3a306
Col3a307
Col3a308
Col3a309
Col3a310
Col3a311
Col3a312
Col3a313
Col3a314
Col3a315
Col3a316
Col3a317
Col3a318
Col3a319
Col3a320
Col3a321
Col3a322
Col3a323
Col3a324
Col3a325
Col3a326
Col3a327
Col3a328
Col3a329
Col3a330
Col3a331
Col3a332
Col3a333
Col3a334
Col3a335
Col3a336
Col3a337
Col3a338
Col3a339
Col3a340
Col3a341
Col3a342
Col3a343
Col3a344
Col3a345
Col3a346
Col3a347
Col3a348
Col3a349
Col3a350
Col3a351
Col3a352
Col3a353
Col3a354
Col3a355
Col3a356
Col3a357
Col3a358
Col3a359
Col3a360
Col3a361
Col3a362
Col3a363
Col3a364
Col3a365
Col3a366
Col3a367
Col3a368
Col3a369
Col3a370
Col3a371
Col3a372
Col3a373
Col3a374
Col3a375
Col3a376
Col3a377
Col3a378
Col3a379
Col3a380
Col3a381
Col3a382
Col3a383
Col3a384
Col3a385
Col3a386
Col3a387
Col3a388
Col3a389
Col3a390
Col3a391
Col3a392
Col3a393
Col3a394
Col3a395
Col3a396
Col3a397
Col3a398
Col3a399
Col3a400
Col3a401
Col3a402
Col3a403
Col3a404
Col3a405
Col3a406
Col3a407
Col3a408
Col3a409
Col3a410
Col3a411
Col3a412
Col3a413
Col3a414
Col3a415
Col3a416
Col3a417
Col3a418
Col3a419
Col3a420
Col3a421
Col3a422
Col3a423
Col3a424
Col3a425
Col3a426
Col3a427
Col3a428
Col3a429
Col3a430
Col3a431
Col3a432
Col3a433
Col3a434
Col3a435
Col3a436
Col3a437
Col3a438
Col3a439
Col3a440
Col3a441
Col3a442
Col3a443
Col3a444
Col3a445
Col3a446
Col3a447
Col3a448
Col3a449
Col3a450
Col3a451
Col3a452
Col3a453
Col3a454
Col3a455
Col3a456
Col3a457
Col3a458
Col3a459
Col3a460
Col3a461
Col3a462
Col3a463
Col3a464
Col3a465
Col3a466
Col3a467
Col3a468
Col3a469
Col3a470
Col3a471
Col3a472
Col3a473
Col3a474
Col3a475
Col3a476
Col3a477
Col3a478
Col3a479
Col3a480
Col3a481
Col3a482
Col3a483
Col3a484
Col3a485
Col3a486
Col3a487
Col3a488
Col3a489
Col3a490
Col3a491
Col3a492
Col3a493
Col3a494
Col3a495
Col3a496
Col3a497

Heatmap riassumendo l'espressione differenziale dei geni associati (A) con i termini GO "organizzazione a matrice extracellulare" e geni (B) assegnati al termine GO "organizzazione del collagene fibrillare" (cambiamento $\geq 2,0$; valore $p < 0,05$).

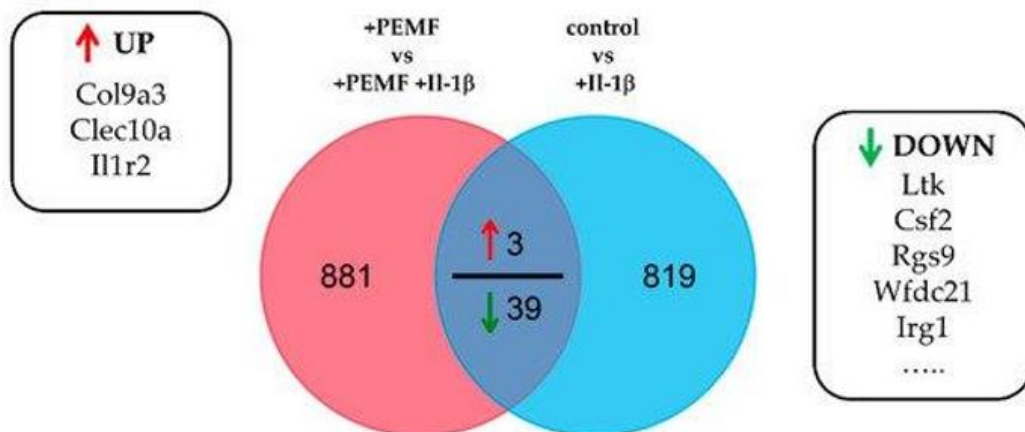


Figura 6.

Diagramma VENN quantitativo che mostra la sovrapposizione di geni derivati dall'analisi di espressione differenziale. I geni comunemente regolati (cambiamento $\geq 2,0$ volte) sono parzialmente mostrati nelle caselle. 3 di questi geni sono stati significativamente sovra-regolati, mentre 39 geni sono stati identificati per essere regolati verso il basso (i primi 5 mostrati). Tuttavia, molti dei geni identificati appartengono a proteine della matrice extracellulare (es. Col9a3), sono coinvolti nell'infiammazione e / o citoprotezione (es. Il1r2, Csf3), o nella regolazione dell'apoptosi (Ltk), sottolineando ulteriormente i risultati della GO analisi (vedi Tabella 2). Tabella 2. Riassunto delle risposte dei geni comuni confrontando i costrutti del tendine 3D trattati con IL-1 β da solo (+/- IL-1 β) o esposti a PEMF con IL-1 β (+ PEMF +/- IL-1 β).

3.3. L'esposizione PEMF non altera la struttura o il turn over della matrice extracellulare in colture 3D Dato che l'incarico GO indica che i geni coinvolti nel rimodellamento ECM e anche nella fibrillogenasi del collagene sono stati influenzati, abbiamo esaminato se l'esposizione PEMF si traduce in un cambiamento strutturale del tendine 3D costrutti simili. Pertanto, sono stati generati costrutti generati da un totale di 4 ratti singoli, mentre l'allineamento e il confezionamento del collagene sono stati analizzati mediante microscopia di polarizzazione. L'orientamento globale e l'impallaggio della fibra di collagene non sono stati modificati in modo significativo in risposta al trattamento con IL-1 β , al solo trattamento PEMF o in combinazione, come evidenziato dalle intensità del segnale di birifrangenza (Figura 7A, B). Inoltre, non abbiamo osservato alcun cambiamento significativo nell'angolazione nucleare e nella disposizione del citoscheletro dell'actina, indicando che non vi era alcun impatto significativo sull'allineamento cellulare nei costrutti trattati (Figura 7A, C). Successivamente abbiamo esaminato l'effetto dell'esposizione PEMF sui livelli di mRNA di diversi geni che codificano per proteine e MMP dell'ECM mediante qRT-PCR. Come previsto, il trattamento delle colture TDSPC 3D-embedded con IL-1 β ha comportato una diminuzione significativa nell'espressione del collagene di tipo I e di tipo III (Figura 7D). Sebbene l'esposizione al PEMF tendenziale abbia parzialmente recuperato l'espressione del collagene, nessuno dei risultati era statisticamente significativo, ad eccezione del collagene di tipo IX associato alla fibrilla, che conferma i risultati dell'analisi dell'espressione genica differenziale (vedi Tabella 2). La stimolazione di IL-1p ha ulteriormente migliorato significativamente l'espressione di diverse metalloproteasi della matrice, ma ancora una volta il trattamento con PEMF non ha alterato significativamente la loro espressione (Figura 7E) o l'attività di MMP2 o MMP9 come evidenziato dall'analisi densitometrica degli zimogrammi di gelatina (Figura 7F). Presi insieme, 2 cicli di 90 minuti di trattamento PEMF / rPMS (82mT, 125kHz) non suscitano eventuali cambiamenti strutturali acuti a breve termine dell'ECM, né attenuano significativamente l'induzione delle MMP. Il trattamento con IL-1 β ha diminuito l'espressione di geni correlati al tendine come

la scleraxis, la tenomodulina e il mohawk, l'esposizione al PEMF ha parzialmente ripristinato l'espressione di questi geni, sebbene questo non fosse statisticamente significativo (Figura 7G).

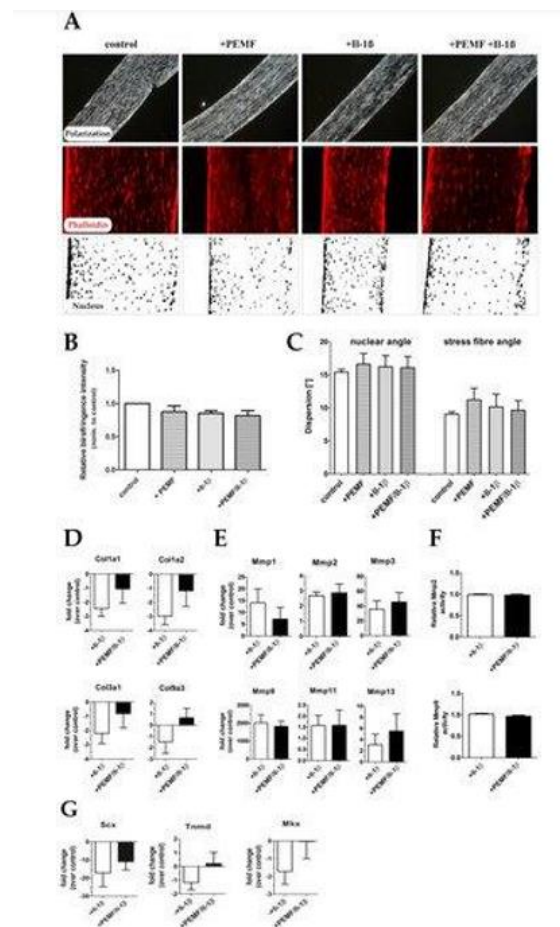


Figura 7.

Organizzazione della matrice extracellulare in costrutti tendinei prima e dopo il trattamento con Il-1 β e / o PEMF. (A) Immagini microscopiche di polarizzazione, colorazione di phalloidin e colorazione nucleare (DAPI) di costrutti di tendine 3D. (B) Intensità di birifrangenza relativa come surrogato per l'organizzazione della fibra di collagene (n = 4). (C) Angolo di fibra da sforzo in actina e dispersione angolare nucleare determinato per i 4 gruppi di trattamento (n = 4). (D) L'espressione dei geni della matrice extracellulare Col1a1, Col1a2, Col3a1 e Col9a3 è rappresentata da un trattamento PEMF up-regulation in campioni stimolati pro-infiammatori (+ PEMF + Il-1 β) sebbene non statisticamente significativo (n = 9). (E) In condizioni pro-infiammatorie la matrice metalloproteinasi-1, -2, -3, -9, -11 e -13 non mostrano cambiamenti significativi nella loro espressione dopo il trattamento con PEMF (n = 7). (F) Attività relativa di MMP2 e MMP9 in costrutti stimolati con Il-1 β con e senza esposizione a PEMF (n = 10). (G) Espressione dei geni marcatori tendinei correlati Scleraxis (Scx), Tenomodulina (Tnmd) e Mohawk (Mkx) viene ripristinata dopo il trattamento PEMF dei costrutti del tendine pro-infiammatorio innescato (n = 6).

3.4. Trattamento con PEMF Drives Espressione di citochine citoprotettive Poiché il trattamento con PEMF ha dimostrato di influenzare positivamente l'espressione e il rilascio di citochine anti-infiammatorie, abbiamo successivamente verificato l'espressione differenziale del Recettore del recettore 1 β Il1r2 che è stato identificato come uno dei geni regolati dall'alto mediante analisi RNASeq. Inoltre, il cambiamento nell'espressione delle citochine di famiglia Il-6 / gp130 Il-6, fattore 3 stimolante le colonie (Csf3), fattore di inibizione della leucemia (Lif) e Il-11 è stato valutato da RT-qPCR. Come mostrato nella Figura 8A, l'espressione di Il1r2 è aumentata di circa 5 volte dopo aver esposto i costrutti Il-1 β -primer a PEMF. Inoltre, Csf3, Il-6 e Lif hanno mostrato un moderato, ma statisticamente non significativo aumento nell'espressione

di mRNA, mentre nessuna differenza era evidente per Il-11. A livello proteico, anche i livelli di IL-6 secreti erano elevati (circa il 50%), tuttavia le risposte dei singoli replicati biologici erano molto eterogenee. Tuttavia, in sintesi, questi risultati indicano che l'esposizione a PEMF provoca una risposta pleiotropica, antinfiammatoria in parte mediata dall'espressione di citochine citoprotettive e attenua l'azione proinfiammatoria di Il-1 β elevando i livelli del recettore di decoy Il1r2.

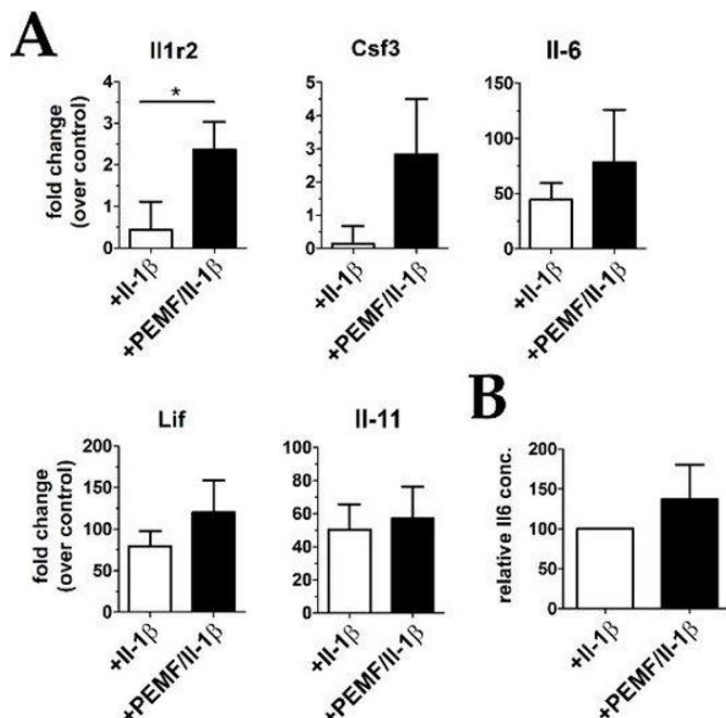


Figura 8. Espressione di mRNA di citochine citoprotettive. (A) L'espressione genica di Il1r2 è stata significativamente up-regolata dopo il trattamento con PEMF, e alcuni membri di citochine potenzialmente citoprotettive della famiglia Il-6 / gp130 mostrano anche un aumento di tendenza (n = 9) (B) livelli di citochine Il-6 erano anche elevati nei costrutti sopramatati da colture PEMF come evidenziato dall'analisi ELISA (n = 5). (Fattore inibitore della leucemia vitale, fattore 3 stimolante le colonie Csf3). * p < 0,05.

3.5. PEMF limita l'apoptosi indotta da Il-1 β Poiché un numero significativo di geni differenzialmente regolati è stato assegnato al termine GO "regolazione negativa dell'apoptosi", abbiamo esaminato se il trattamento con PEMF è effettivamente in grado di attenuare l'apoptosi Il-1 β -mediata. L'innescò di TDSPC 3D-embedded con 10 ng / ml di Il1 β ha comportato un aumento significativo delle cellule apoptotiche come determinato dalla rilevazione in situ del DNA frammentato (saggio TUNEL, Figura 9A, B). Il trattamento con PEMF ha ridotto significativamente il numero di cellule apoptotiche e l'effetto anti-apoptotico è stato ulteriormente sottolineato dalle attività basali delle caspasi 3 e 7 rispetto ai costrutti coltivati in condizioni di coltura cellulare proinfiammatoria (Figura 9C). Poiché l'attivazione di Erk1 / 2 generalmente promuove la sopravvivenza cellulare, abbiamo successivamente esaminato i livelli di fosforilazione di Erk1 / 2 dopo l'esposizione a PEMF. In effetti, il trattamento con PEMF generalmente aumenta i livelli di pErk1 / 2, non solo in condizioni proinfiammatorie (Figura 9D). Infine, poiché l'ossido nitrico (NO) è noto per influenzare l'apoptosi, abbiamo determinato il contenuto di NO nei supernatanti della coltura cellulare. Come mostrato nella Figura 9E, i livelli di NO erano significativamente ridotti nei costrutti del tendine 3D trattati con PEMF dopo il priming di Il-1 β . In conclusione, il trattamento con PEMF riduce significativamente l'apoptosi indotta da Il-1 β nei TDSPC coltivati in 3D.

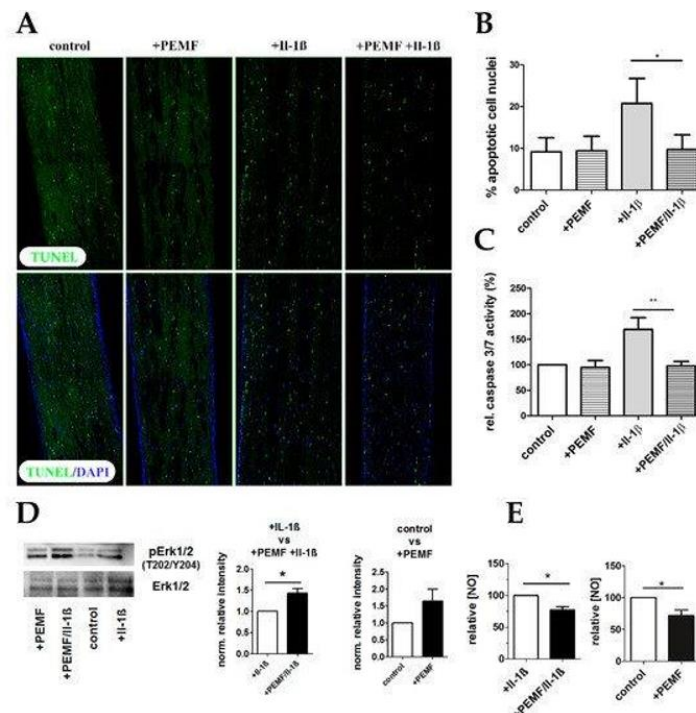


Figura 9. Il trattamento PEMF attenua l'apoptosi nei costrutti simil-tendinei stimolati pro-infiammatori. (A) Il saggio TUNEL è stato eseguito per visualizzare i nuclei delle cellule apoptotiche (verdi) che mostrano il caratteristico fenotipo frammentato. (B) La percentuale dei nuclei delle cellule apoptotiche è stata determinata, dimostrando un effetto anti-apoptotico dell'esposizione PEMF dei costrutti 3D innescati da IL-1 β . (C) L'attività dell'enzima Caspase3 / 7 è stata determinata in lisati proteici di costrutti tendinei di tutti i gruppi di trattamento, confermando che il trattamento PEMF diminuisce significativamente l'apoptosi in campioni stimolati pro-infiammatori. (D) Western blot rappresentativo e analisi densitometrica (n = 4) per phosphoERK1 / 2 e totalERK1 / 2 dimostrano

attivazione di ERK1 / 2 dopo esposizione PEMF. (E) La concentrazione totale di NO è significativamente ridotta nei surnatanti di colture cellulari di + PEMF + IL-1 β e + PEMF trattati come costrutti simili (n = 5). * p < 0,05, ** p < 0,01.

4. Discussione Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la risposta globale dei costrutti tendinei 3D all'esposizione PEMF in condizioni infiammatorie per ottenere una visione meccanicistica dei processi regolati dal trattamento PEMF, che è spesso usato come terapia fisica non invasiva per la tendinopatia. La tendinopatia è un disturbo multifattoriale che rappresenta un numero elevato di pazienti che consultano un medico generico o ortopedico [1]. Attualmente, i disturbi del tendine sono trattati con un approccio conservativo (ad es. Fisioterapia, terapia extracorporea con onde d'urto, farmaci antinfiammatori) o mediante intervento chirurgico, spesso con risultati insoddisfacenti. Sebbene lo sviluppo di nuove ed efficaci strategie di trattamento sia limitato dalla nostra comprensione incompleta dei processi cellulari e molecolari che portano alle tendinopatie, si ritiene che la terapia pulsata del campo elettromagnetico abbia effetti benefici sulle condizioni del tendine. La terapia con campo elettromagnetico pulsato (PEMF) è un trattamento non invasivo, non termico, applicato principalmente per promuovere la guarigione. La Food and Drug Administration statunitense ha approvato la terapia PEMF per il trattamento di fratture ossee non sindacali, dolore postoperatorio, edema e osteoartrite [30]. I meccanismi biofisici attraverso cui PEMF sollecita le risposte cellulari e molecolari sono complessi e rimangono in gran parte irrisolti. Si ipotizza che il meccanismo d'azione primario sia quello di facilitare la riduzione e la risoluzione dei processi infiammatori. Ad esempio, PEMF a bassa frequenza applicato per 8 h su cellule tendenzialmente interessate in un sistema di coltura 2D ha rivelato, accanto a una maggiore espressione di marcatori correlati al tendine, il rilascio potenziato di citochine anti-infiammatorie [31]. Gli studi pre-clinici su un modello di riparazione della cuffia

dei rotatori di ratto hanno indicato che il trattamento con PEMF migliora la guarigione precoce del tendine e un concomitante aumento del modulo di Young e lo stress massimo per il cedimento del tessuto tendineo [32]. In un altro studio preclinico, la PEMF ha aumentato la resistenza a trazione del tendine d'Achille guarito dopo completa transezione in un modello di ratto [33]. Clinicamente, è stato dimostrato che la terapia PEMF ha effetti positivi sulle lacrimazioni della cuffia dei rotatori che influenzano i parametri del dolore multiplo e migliora la gamma di movimento e la forza muscolare [34], indicando un effetto positivo sulla guarigione del tendine. Tuttavia, poiché i meccanismi causali cellulari e molecolari per l'azione della PEMF sulle cellule residenti tendinee sono insufficientemente compresi, abbiamo mirato a esplorare la risposta globale all'esposizione PEMF in costrutti simili a tendini 3D innescati da infiammazione eseguendo il sequenziamento dell'RNA. Il sequenziamento dell'RNA ha identificato 5400 geni per essere espressi in modo differenziale sull'esposizione PEMF sotto stimolazione $Il-1\beta$, di cui diversi sono noti per regolare l'apoptosi, l'organizzazione della matrice extracellulare o l'organizzazione della fibrillazione del collagene e i geni codificanti per le proteine citoprotettive. I meccanismi patofisiologici della tendinopatia finora descritti includono apoptosi disregolata, sovraccarico meccanico, attivazione della matrice metalloproteinasi, predisposizione genetica e infiammazione. Negli anni passati sono cresciute le prove del ruolo dell'infiammazione nello sviluppo della tendinopatia, sebbene i protagonisti restino ancora pienamente caratterizzati. È noto che i livelli di interleuchina- 1β sono aumentati nella tendinopatia e dopo la lesione del tendine. Numerosi studi hanno dimostrato che la stimolazione di $Il-1\beta$ di cellule tendenzialmente interessate reprime l'espressione di collagene di tipo 1, aumenta l'espressione di metalloproteinasi della matrice [5,7,35,36] o porta ad effetti citotossici e attivazione della caspasi sia in colture cellulari 2D che 3D [37, 38]. È stato inoltre dimostrato che $Il-1\beta$ downregola in modo irreversibile l'espressione di produttori di tenogeni come la scleraxis o la tenomodulina e altera il metabolismo cellulare nelle cellule tendinee isolate dai tendini feriti [36].

Come evidenziato dall'analisi qPCR, nel nostro studio l'esposizione PEMF ha parzialmente ripristinato l'espressione dei geni del collagene e dei marcatori tenogenici *Tnmd* e *Mkx* dopo stimolazione pro-infiammatoria. Inoltre, a

è stato osservato un aumento significativo dell'espressione di MMP con la stimolazione di $Il-1\beta$, che è in accordo con i dati precedentemente pubblicati. Le principali metalloproteinasi della matrice che promuovono il danno e la degenerazione del tendine sono MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 e MMP13, dove MMP1 e MMP13 sono prevalentemente coinvolti nella degradazione dei collagene di tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Successivamente MMP2 e MMP9 degradano proteoliticamente questi collagene frammenti di entità minori. L'MMP3 è coinvolta nell'attivazione proteolitica di altre MMP e l'MMP3 insieme con MMP2 può promuovere il processo di guarigione. Un'aumentata attività MMP netta dovrebbe essere un indicatore di degradazione della matrice, che potrebbe essere una delle prime fasi del rimodellamento della matrice nella guarigione delle ferite [35]. Tuttavia, non abbiamo riscontrato un impatto significativo sull'espressione o sull'attivazione di MMP in seguito all'esposizione a PEMF. Ciò è anche in accordo con uno studio precedente di Ongaro A. et al., Che dimostra che la PEMF a bassa intensità non ha influenzato la produzione di enzimi degradanti la matrice, ma ha avuto effetti antiinfiammatori nei fibroblasti sinoviali isolati da pazienti con osteoartrite [39].

La citochina pleiotropica *Il-6* ha un ruolo centrale nell'infiammazione e nel danno tissutale ed è stato dimostrato di essere potenziato nelle cellule residenti nel tendine dopo il trattamento con $Il-1\beta$, inducendo la fase di risposta acuta e migliorando la fase di guarigione promuovendo l'espressione del collagene di tipo 1 [35]. È interessante notare che la terapia extracorporea ad onde d'urto (ESWT) applicata alle cellule tendinee ha aumentato l'espressione di *Il-6* [40] e il ricombinante *Il-6* è stato utilizzato come intervento terapeutico mediante infusione nel tessuto peritendinoso dei tendini di Achille umano, con conseguente aumento della sintesi del collagene [41]. Inoltre, *Il-6* ha mostrato di avere un effetto inibitorio sull'espressione delle proteine regolatrici del complemento, suggerendo che *Il-6* può ridurre la sensibilità

dei tenociti alla lisi cellulare mediata dal complemento [7]. Qui mostriamo che due esposizioni di 60 min PEMF / rPMS a 82mT hanno influenzato positivamente l'espressione e il rilascio Il-6 in costrutti di tipo tendineo stimolato infiammatorio. Inoltre, i geni che codificano per le proteine citoprotettive Csf3 o Lif sono stati moderatamente migliorati dopo l'esposizione a PEMF. È interessante notare che il recettore Il1r2 del recettore Il-1 β era significativamente più alto espresso dopo l'esposizione a PEMF, molto probabilmente attenuando l'azione pro-infiammatoria di Il-1 β . Recentemente è stato dimostrato che Il1r2 svolge un ruolo centrale nella protezione dei tenociti derivati da cellule staminali embrionali (ESC) dall'infiammazione mediata da Il-1 β nelle colture tendinee 3D. McClellan et al. Dimostrare che Il-1 β diminuisce la capacità dei tenociti fetali e adulti di formare costrutti maturi tendinei, mentre i costrutti derivati da ESC sembravano normali. Poiché i tenociti derivati dal CES hanno espresso alti livelli di Il1r2, la traslocazione di NF-KB nel nucleo dopo la stimolazione con Il-1 β è stata significativamente ridotta, con possibile conferimento di citoprotezione [37]. L'ossido nitrico (NO) è una molecola chiave nella patogenesi dell'infiammazione e viene prodotto sulla lesione del tendine. Le synthases dell'ossido nitrico (NOS) sono sovraregolate in tendinopatia [5,42] che influiscono sull'espressione di diverse citochine e sulla sintesi del collagene. Nelle cellule del tessuto connettivo NO contribuisce all'apoptosi in condizioni infiammatorie e livelli elevati di NOS sono stati associati all'apoptosi nella tendinopatia di Achille [7]. Oltre all'aumento dei livelli di NO, è stata osservata anche un'elevata attività di caspasi-3 nei tendini equini infiammati e si ritiene che l'aumento della morte cellulare per apoptosi e una clearance ridotta delle cellule apoptotiche influenzi l'omeostasi del tendine e contribuisca alla degenerazione dei tendini. Inoltre, l'attivazione di Erk1 / 2 ha dimostrato di promuovere la sopravvivenza cellulare guidando i processi anti-apoptotici da un'ampia gamma di risposte che implicano o l'attivazione transitoria o prolungata, mentre l'inibizione di Erk1 / 2 è nota per avere un effetto pro-apoptotico [43]. Tuttavia, i meccanismi con cui l'attivazione di Erk1 / 2 controlla l'apoptosi sono complessi e variano a seconda del tipo di cellula o tessuto studiato. Erk1 / 2 può promuovere la sopravvivenza cellulare sopprimendo la funzione delle proteine proapoptotiche e / o migliorando l'attività delle molecole anti-apoptotiche (ad esempio, regolazione dei fattori di trascrizione anti-apoptotica, up-regulation della traduzione delle proteine antiapoptotiche) [44]. Complessivamente, sebbene le risposte di espressione genica globale fossero generalmente moderata, l'azione multimodale del trattamento con PEMF ha comportato una significativa riduzione dell'apoptosi nelle colture di tenociti di ratto incorporate in 3D. Presi insieme, i nostri risultati suggeriscono che il PEMF ad alta energia limita gli effetti catabolici di uno stimolo proinfiammatorio da parte di Il-1 β inducendo l'espressione di molecole protettive cellulari e attenuando l'apoptosi, spostando così un ambiente degenerativo e infiammatorio verso uno stato riparativo più tissutale.

Materiali supplementari I seguenti sono disponibili online all'indirizzo <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/399/s1>, tabella S1: dati RNASeq; Tabella S2: geni assegnati dal termine GO; Tabella S3: Elenco dei geni assegnati a GO: regolazione negativa dei processi apoptotici, rimodellamento ECM e organizzazione della fibrillazione del collagene; Tabella S4: Oligo e sequenze di sonde di TaqMan Assay utilizzate per l'analisi dell'espressione genica.

Contributi dell'autore Concettualizzazione, A.T., R.G. e S.K. ; Metodologia, B.S., R.G., M.J., S.K., A.W., C.L., N.W. e H.T. ; Analisi formale, B.S., R.G., H.T. e A.T. ; Scrittura: preparazione al draft originale, R.G. e A.T. ; Revisione e modifica, A.T., R.G. e H.T. ; Supervisione, A.T. e R.G.

Finanziamento Questo studio è stato in parte finanziato da Healthfactories GmbH.

Riconoscimenti Ringraziamo Healthfactories GmbH per aver fornito il dispositivo promesso © OMNITRON per la durata dello studio.

Conflitti di interesse A.T. detiene azioni di Healthfactories GmbH. Tutti gli altri autori dichiarano alcun conflitto di interessi. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio; nella

raccolta, analisi o interpretazione dei dati; nella scrittura del manoscritto, o nella decisione di pubblicare i risultati.

- Riferimenti 1. Schneider, M .; Angele, P .; Jarvinen, T.A.H .; Docheva, D. Piano di salvataggio per Achille: le terapie guidano il destino e le funzioni delle cellule staminali nella guarigione delle ferite tendinee. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018, 129, 352-375. [Google Scholar] [CrossRef]
2. Riley, G. Tendinopatia - dalla scienza di base al trattamento. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2008, 4, 82-89. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
3. Tempfer, H .; Lehner, C .; Grütz, M .; Gehwolf, R .; Traweger, A. Aumento biologico per riparazione del tendine: lezioni da apprendere dallo sviluppo, dalla malattia e dalla ricerca sulle cellule staminali del tendine. *Cell Eng. Regener.* 2017. [Google Scholar] [CrossRef]
4. Andres, B.M .; Murrell, G.A. Trattamento della tendinopatia: cosa funziona, cosa no e cosa c'è all'orizzonte. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2008, 466, 1539-1554. [Google Scholar] [CrossRef]
5. Millar, N.L .; Murrell, G.A .; McInnes, I.B. Meccanismi infiammatori nella tendinopatia: verso la traduzione. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017, 13, 110-122. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
6. Dean, B.J .; Gettings, P .; Dakin, S.G .; Carr, A.J. Le cellule infiammatorie sono aumentate nella tendinopatia umana dolorosa? Una revisione sistematica. *Br. J. Sports Med.* 2016, 50, 216-220. [Google Scholar] [CrossRef]
7. Schulze-Tanzil, G .; Al-Sadi, O .; Wiegand, E .; Ertel, W .; Busch, C .; Kohl, B .; Pufe, T. Il ruolo delle citochine proinfiammatorie e immunoregatorie nella guarigione e rottura del tendine: nuove intuizioni. *Scand. J. Med. Sci. Sport* 2011, 21, 337-351. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Tsuzaki, M .; Guyton, G .; Garrett, W .; Archambault, J.M .; Herzog, W .; Almekinders, L .; Bynum, D .; Yang, X .; Banes, A.J. IL-1 beta induce COX2, MMP-1, -3 e -13, ADAMTS-4, IL-1 beta e IL-6 nelle cellule tendinee umane. *J. Orthop. Res.* 2003, 21, 256-264. [Google Scholar] [CrossRef]
9. Archambault, J .; Tsuzaki, M .; Herzog, W .; Banes, A.J. Stretch e interleuchina-1beta inducono metalloproteinasi della matrice nelle cellule dei tendini di coniglio In vitro. *J. Orthop. Res.* 2002, 20, 36-39. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Funk, R.H. Accoppiamento della terapia con campi elettromagnetici pulsati (PEMF) a basi molecolari della cellula. *Am. J. Transl. Res.* 2018, 10, 1260-1272. [Google Scholar] [PubMed]
11. Rohde, C .; Chiang, A .; Adipoju, O .; Casper, D .; Pilla, A.A. Effetti dei campi elettromagnetici pulsati sull'interleuchina-1 beta e sul dolore postoperatorio: studio pilota in doppio cieco, controllato con placebo, condotto su pazienti con riduzione del seno. *Plast. Chirurgia ricostruttiva.* 2010, 125, 1620-1629. [Google Scholar] [CrossRef]
12. Bassett, C.A. Aspetti fondamentali e pratici degli usi terapeutici dei campi elettromagnetici pulsati (PEMF). *Crit. Rev. Biomed. Ing.* 1989, 17, 451-529. [Google Scholar]
13. Goudarzi, I .; Hajizadeh, S .; Salmani, M.E .; Abrari, K. I campi elettromagnetici pulsati accelerano la guarigione delle ferite nella pelle dei ratti diabetici. *Bioelectromagnetics* 2010, 31, 318-323. [Google Scholar] [CrossRef]
14. Sorrell, R.G .; Muhlenfeld, J .; Moffett, J .; Stevens, G .; Kesten, S. Valutazione della terapia a campi elettromagnetici pulsati per il trattamento del dolore postoperatorio cronico a seguito di chirurgia lombare: studio clinico pilota, in doppio cieco, randomizzato, controllato con sham. *J. Pain. Res.* 2018, 11, 1209-1222. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

15. Ryang We, S. ; Koog, Y.H. ; Jeong, K.I. ; Wi, H. Effetti del campo elettromagnetico pulsato sull'artrosi del ginocchio: una revisione sistematica. *Rheumatology* 2013, 52, 815-824. [Google Scholar] [CrossRef]
16. Veronesi, F. ; Torricelli, P. ; Giavaresi, G. ; Sartori, M. ; Cavani, F. ; Setti, S. ; Cadossi, M. ; Ongaro, A. ; Fini, M. Effetto in vivo di due diverse frequenze di campo elettromagnetico pulsato sull'osteoartrite. *J. Orthop. Res.* 2014, 32, 677-685. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
17. De Mattei, M. ; Caruso, A. ; Pezzetti, F. ; Pellati, A. ; Stabellini, G. ; Sollazzo, V. ; Traina, G.C. Effetti dei campi elettromagnetici pulsati sulla proliferazione di condrociti articolari umani. *Connective Tissue Res.* 2001, 42, 269-279. [Google Scholar] [CrossRef]
18. Pezzetti, F. ; De Mattei, M. ; Caruso, A. ; Cadossi, R. ; Zucchini, P. ; Carinci, F. ; Traina, G.C. ; Sollazzo, V. Effetti dei campi elettromagnetici pulsati sui condrociti umani: uno studio in vitro. *Tessuto Calcificato Int.* 1999, 65, 396-401. [Google Scholar] [CrossRef]
19. De Mattei, M. ; Varani, K. ; Masieri, F.F. ; Pellati, A. ; Ongaro, A. ; Fini, M. ; Cadossi, R. ; Vincenzi, F. ; Borea, P.A. ; Gli analoghi di Caruso, A. Adenosine e campi elettromagnetici inibiscono il rilascio di prostaglandina E2 nei fibroblasti sinoviali bovini. *Osteoartrosi Cartilagine* 2009, 17, 252-262. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
20. de Girolamo, L. ; Viganò, M. ; Galliera, E. ; Stanco, D. ; Setti, S. ; Marazzi, M.G. ; Thiebat, G. ; Corsi Romanelli, M.M. ; Sansone, V. Risposta in vitro funzionale delle cellule tendinee umane a diversi dosaggi del campo elettromagnetico pulsato a bassa frequenza. *Knee Surg. Traumatol sportivo. Artroscopia* 2015, 23, 3443-3453. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
21. Strauch, B. ; Patel, M.K. ; Rosen, D.J. ; Mahadevia, S. ; Brindzei, N. ; Pilla, A.A. La terapia a campi magnetici pulsati aumenta la resistenza a trazione in un modello di riparazione del tendine di Achille. *J. Hand Surg.* 2006, 31, 1131-1135. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
22. Lee, E.W. ; Maffulli, N. ; Leccare, Chan, K.M. Campi magnetici ed elettromagnetici pulsati nella tendinite sperimentale di achille nel ratto: uno studio prospettico randomizzato. *Arco. Phys. Med. Rehabil.* 1997, 78, 399-404. [Google Scholar] [CrossRef]
23. Osti, L. ; Buono, A.D. ; Maffulli, N. Campi elettromagnetici pulsati dopo la riparazione della cuffia dei rotatori: uno studio randomizzato e controllato. *Ortopedia* 2015, 38, e223-228. [Google Scholar] [CrossRef]
24. Kunkel, N. ; Wagner, A. ; Gehwolf, R. ; Heimel, P. ; Tempfer, H. ; Korntner, S. ; Augat, P. ; Resch, H. ; Redl, H. ; Betz, O. ; et al. Confronto del potenziale osteogenico del midollo osseo e delle cellule stromali derivate dai tendini per riparare un difetto di dimensioni critiche nel femore del ratto. *J. Tissue Eng. Rigenerativo Med.* 2015. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
25. Gehwolf, R. ; Spitzer, G. ; Wagner, A. ; Lehner, C. ; Weissenbacher, N. ; Tempfer, H. ; Traweger, A. Culture cellulari incorporate in 3D per studiare la biologia dei tendini. *Metodi Biol* 2019. [Google Scholar] [CrossRef]
26. Vandesompele, J. ; De Preter, K. ; Pattyn, F. ; Poppe, B. ; Van Roy, N. ; De Paepe, A. ; Speleman, F. Accurata normalizzazione dei dati quantitativi RT-PCR in tempo reale mediante la media geometrica di più geni di controllo interno. *Genome Biol.* 2002, 3, RESEARCH0034. [Google Scholar] [CrossRef]
27. Laemmli, Regno Unito Scissione di proteine strutturali durante l'assemblaggio della testa del batteriofago T4. *Nature* 1970, 15, 680-685. [Google Scholar] [CrossRef]
28. Tempfer, H. ; Kaser-Eichberger, A. ; Lehner, C. ; Gehwolf, R. ; Korntner, S. ; Kunkel, N. ; Wagner, A. ; Gruetz, M. ; Heindl, L.M. ; Schroedl, F. ; et al. Bevacizumab migliora la riparazione del tendine d'Achille in un modello di ratto. *Cellula. Physiol. Biochem.* 2018, 46, 1148-1158. [Google Scholar] [CrossRef]

29. Hsieh, C.F. ; Alberton, P. ; Loffredo-Verde, E. ; Volkmer, E. ; Pietschmann, M. ; Muller, P. ; Schieker, M. ; Docheva, D. I progenitori del tendine programmati da Scleraxis senza protesi aiutano in una riparazione significativamente migliorata della rottura del tendine di Achille a grandezza naturale. *Nanomedicina (Lond)* 2016, 11, 1153-1167. [Google Scholar] [CrossRef]
30. Gaynor, J.S. ; Hagberg, S. ; Gurfein, B.T. Applicazioni veterinarie della terapia con campo elettromagnetico pulsato. *Res. Veterinario. Sci.* 2018, 119, 1-8. [Google Scholar] [CrossRef]
31. de Girolamo, L. ; Stanco, D. ; Galliera, E. ; Vigano, M. ; Colombini, A. ; Setti, S. ; Vianello, E. ; Corsi Romanelli, M.M. ; Sansone, V. Il campo elettromagnetico pulsato a bassa frequenza influisce sulla proliferazione, sull'espressione genica tessuto-specifica e sul rilascio di citochine di cellule tendinee umane. *Cell Biochem. Biophys.* 2013, 66, 697-708. [Google Scholar] [CrossRef]
32. Huegel, J. ; Choi, D.S. ; Nuss, C.A. ; Minnig, M.C.C. ; Tucker, J.J. ; Kuntz, A.F. ; Waldorff, E.I. ; Zhang, N. ; Ryaby, J.T. ; Soslowky, L.J. Effetti della terapia a campi elettromagnetici pulsati a diverse frequenze e durate sulla guarigione tendine-osso della cuffia dei rotatori in un modello di ratto. *J. spalla gomito Surg.* 2018, 27, 553-560. [Google Scholar] [CrossRef]
33. Strauch, B. ; Herman, C. ; Dabb, R. ; Ignarro, L.J. ; Pilla, A.A. Uso basato sull'evidenza della terapia pulsata del campo elettromagnetico nella chirurgia plastica clinica. *Aesthet. Surg. J.* 2009, 29, 135-143. [Google Scholar] [CrossRef]
34. Galace de Freitas, D. ; Marcondes, F.B. ; Monteiro, R.L. ; Rosa, S.G. ; Maria de Moraes Barros Fucs, P. ; Fukuda, T.Y. Campo elettromagnetico pulsato ed esercizi in pazienti con sindrome da impingement della spalla: studio clinico randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo. *Arco. Phys. Med. Rehabil.* 2014, 95, 345-352. [Google Scholar] [CrossRef]
35. D'Addona, A. ; Maffulli, N. ; Formisano, S. ; Rosa, D. Infiammazione in tendinopatia. *Chirurgo* 2017, 15, 297-302. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
36. Zhang, K. ; Asai, S. ; Yu, B. ; Enomoto-Iwamoto, M. IL-1 β inibisce irreversibilmente la differenziazione tenogena e altera il metabolismo nelle cellule progenitrici derivate dai tendini ferite In vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 463, 667-672. [Google Scholar] [CrossRef]
37. McClellan, A. ; Evans, R. ; Sze, C. ; Kan, S. ; Paterson, Y. ; Ospite, D. Un nuovo meccanismo per la protezione dei tenociti derivati da cellule staminali embrionali da interleuchina 1 β citochina infiammatoria. *Sci. Rep.* 2019, 9, 2755. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
38. Busch, F. ; Mobasher, A. ; Shayan, P. ; Lueders, C. ; Stahlmann, R. ; Shakibaei, M. Resveratrol modula le vie di segnalazione del fosfatidilinositolo 3-chinasi dell'interleuchina-1 β -indotta e del fattore nucleare KappaB nei tenociti umani. *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 38050-38063. [Google Scholar] [CrossRef]
39. Ongaro, A. ; Varani, K. ; Masieri, F.F. ; Pellati, A. ; Massari, L. ; Cadossi, R. ; Vincenzi, F. ; Borea, P.A. ; Fini, M. ; Caruso, A. ; et al. Electromagnetic fields (EMFs) and adenosine receptors modulate prostaglandin E(2) and cytokine release in human osteoarthritic synovial fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 2012, 227, 2461-2469. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
40. de Girolamo, L. ; Stanco, D. ; Galliera, E. ; Vigano, M. ; Lovati, A.B. ; Marazzi, M.G. ; Romeo, P. ; Sansone, V. Soft-focused extracorporeal shock waves increase the expression of tendon-specific markers and the release of anti-inflammatory cytokines in an adherent culture model of primary human tendon cells. *Ultrasound. Med. Biol.* 2014, 40, 1204-1215. [Google Scholar] [CrossRef]
41. Andersen, M.B. ; Pingel, J. ; Kjaer, M. ; Langberg, H. Interleukin-6: A growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon. *J. Appl. Physiol.* 2011, 110, 1549-1554. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

42. Szomor, Z.L.; Wang, M.X.; Kruller, A.; Murrell, G.A.; Farmer, K.M.; Kirkham, B.W.; Bonar, F. Differential expression of cytokines and nitric oxide synthase isoforms in human rotator cuff bursae. *Ann. Rheumatic Dis.* 2001, 60, 431–432. [Google Scholar] [CrossRef]
43. Lu, Z.; Xu, S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 2006, 58, 621–631. [Google Scholar] [CrossRef]
44. Sun, Y.; Liu, W.Z.; Liu, T.; Feng, X.; Yang, N.; Zhou, H.F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept Signal Transduct. Res.* 2015, 35, 600–604. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).