

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



## TESIS DOCTORAL

**Terapia regenerativa del tendón supraespinoso: estudio realizado en un modelo murino de lesión crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**José Antonio Hoyas Fernández**

Directores

Benjamín Fernández Gutiérrez

María Pilar Tornero Esteban

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Biología**

**Hospital Clínico San Carlos**

**Unidad de Gestión Clínica de Reumatología**



**TESIS DOCTORAL**

**Terapia regenerativa del tendón  
supraespinoso. Estudio realizado en  
un modelo murino de lesión crónica.**

**Presentada por:**

**José Antonio Hoyas Fernández.**

**Licenciado en ciencias biológicas**

**Para optar al grado de Doctor en biología.**

**Director: Dr Benjamín Fernández Gutiérrez.**

**Co-dirección: Dra María Pilar Tornero Esteban.**



*Parte de la curación está en la voluntad de sanar.*

**Lucio Anneo Séneca**



**Don Benjamín Fernández Gutiérrez**, Facultativo Especialista en Reumatología del Hospital Clínico San Carlos, Profesor Asociado Ciencias de la Salud y Profesor Titular de Universidad Acreditado, y la Dra **Doña María Pilar Tornero Esteban**, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora Especialista en enfermedades musculoesqueléticas en el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos, informan que:

**Don José Antonio Hoyas Fernández**, ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral titulada “Terapia regenerativa del tendón supraespinoso. Estudio realizado en un modelo murino de lesión crónica” reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa, con el fin de optar al grado de Doctor.

Madrid, julio 2013.

Fdo: Dr Benjamín Fernández Gutiérrez.

Dra María Pilar Tornero Esteban.



*A mi esposa Luisa y a mi hijo Juan.*

*Ellos son el motor de mi vida.*



## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias a las diferentes personas que han propiciado tanto los medios como las ideas que han impulsado el estudio en buena dirección.

En primer lugar quiero agradecer al Dr Benjamín Fernández Gutierrez, la oportunidad que me brindó al incorporarme a su grupo de investigación básica, y así poder desarrollar mi faceta de investigador. Gracias a él, la financiación y el proyecto es una realidad. Igualmente agradezco a Julia Rueda, su interés durante mis cursos de doctorado.

Agradezco al departamento que me acogió como uno más, la Unidad de Gestión Clínica de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, y en especial al Dr Juan Ángel Jover, Jefe de Servicio, por facilitar el desarrollo de la investigación básica en la unidad.

De forma muy especial agradezco al laboratorio de enfermedades musculoesqueléticas del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, todo su apoyo y ayuda en el proyecto. Especialmente menciono al Dr José Ramón Lamas, al cual debo mucha de la enseñanza que tengo sobre investigación básica y a la Dra María Pilar Tornero, co-directora de esta tesis, que ha hecho posible este estudio. Gracias a ella, he aprendido mucho, desde como elaborar un experimento hasta como enfocar unos resultados, y he encontrado en ella, no solo una compañera, sino una amiga.

Agradezco al equipo de veterinarios del Hospital Clínico San Carlos su trabajo y dedicación en la generación del modelo de lesión crónica y el mantenimiento de los animales.

Al departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología agradezco su constante colaboración en el desarrollo quirúrgico, y su interés en el proyecto.

Muy especialmente agradezco al grupo GBMB-UPM, Grupo de Biomateriales y Materiales Biológicos-UPM (Universidad Politécnica de Madrid) - E.T.S.I. de Caminos, Canales y Puertos-Departamento de Física, a Francisco Rojo y a Gustavo V Guinea, por hacer posible el estudio biomecánico. Han sido una pieza fundamental.

Agradezco al departamento de Anatomía Patológica, y en especial a Patricia, su ayuda en la realización de los cortes histológicos y tinciones.

A Yamila agradezco su apoyo y enseñanza sobre la técnica inmunohistoquímica.

También tengo que agradecer a mis padres, que supieran ponerme en el camino que estoy recorriendo, y que gracias a su apoyo y amor incondicional, esta tesis ha sido posible.

Y el más especial de todos los agradecimientos se los quiero dedicar a mi esposa Luisa y a mi hijo Juan, porque ellos son mi fuerza y mi inspiración. Luisa gracias por creer siempre en mí, y Juan, que con tu corta edad, has sabido impulsar mis ganas muy alto y has propiciado que termine esta tesis. Gracias de todo corazón por el amor que me dais.

# ÍNDICE

Título	Número de página
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>15</b>
1.1 Anatomía del manguito rotador y del músculo supraespinos.....	17
1.2 Estructura tendinosa.....	20
1.3 Etiopatogenia de las roturas del manguito rotador.....	28
1.4 Clasificación de las lesiones del manguito rotador.....	34
1.5 Sintomatología.....	35
1.6 Tratamiento.....	36
1.7 Nuevos enfoques en la reparación.....	42
1.8 Generalidades de las MSCs.....	44
1.9 Potencial de proliferación y diferenciación de las MSCs.....	46
1.10 Autorenovación, migración y fenómeno de reparación.....	48
1.11 Función de las MSCs.....	49
1.12 Función inmunomoduladora de las MSCs.....	49
1.13 Modelos animales para el estudio de lesiones crónicas del tendón SE.....	51
<b>2. Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>53</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>57</b>
3.1 Diseño del estudio.....	59
3.2 Animal de experimentación.....	59
3.2.1 Eutanasia y técnica de extracción de las piezas escápulo-humerales.....	60
3.2.2 Protocolo de anestesia y analgesia.....	61
3.3 Desarrollo del modelo experimental de lesión crónica del manguito rotador.....	62
3.4 Diferentes estrategias reparadoras de la lesión crónica desarrollada en el modelo animal.....	63
3.4.1 Modelo de Lesión Crónica y Reparación con sutura Prolene® 6/0.....	64
3.4.2 Modelo de Lesión Crónica y Reparación con membrana comercial de colágeno tipo I con y sin MSCs.....	66

3.5 Preparación de MSCs en la membrana OrthADAPT®.....	66
3.5.1 Extracción de fémures.....	66
3.5.2 Obtención de las MSCs.....	67
3.5.3 Preparación de la membrana de colágeno tipo I con las MSCs.....	68
3.6 Análisis biomecánico.....	70
3.7 Análisis histológico e inmunohistoquímico.....	72
3.7.1 Procesamiento decalcificación e inclusión en parafina.....	72
3.7.2 Preparación de los cortes histológicos para tinción Hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson.....	74
3.7.3 Protocolos de tinción y valoración microscópica.....	75
3.7.4 Tinción inmunohistoquímica (detección de colágeno tipo I y tipo III).....	78
3.7.5 Valoración inmunohistoquímica.....	80
3.8 Análisis estadístico.....	81
<b>4. Resultados.....</b>	<b>83</b>
4.1 Establecimiento del modelo de lesión crónica.....	85
4.1.1 Estudio biomecánico.....	85
4.1.2 Estudio histológico.....	86
4.2 Evaluación de diferentes estrategias reparadoras del tendón se lesionado.....	90
4.2.1 Estudio biomecánico.....	90
4.2.2 Estudio histológico.....	94
4.2.3 Evaluación inmunohistoquímica.....	100
4.2.3.1 Valoración inmunohistoquímica de un tendón sano.....	101
4.2.3.2 Valoración inmunohistoquímica del colágeno de tipo I en los tendones reparados.....	102
4.2.3.3 Valoración inmunohistoquímica del colágeno de tipo III en los tendones reparados.....	103
<b>5. Discusión.....</b>	<b>107</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>133</b>
<b>Summary.....</b>	<b>137</b>
<b>Financiación y aportación científica.....</b>	<b>142</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>145</b>

## ABREVIATURAS

- **MSCs:** células madre mesenquimales.
- **BMSCs:** células madre mesenquimales de médula ósea.
- **Fig:** figura.
- **RER:** retículo endoplasmático rugoso.
- **AG:** Aparato de Golgi.
- **HP:** hidroxilisilpiridolina.
- **LP:** lisilpiridolina.
- **AGE:** productos finales de glucación avanzada.
- **GAG:** glucosaminoglucano.
- **SE:** supraespinoso.
- **T:** tendón.
- **FNM:** fibrocartílago no mineralizado.
- **FM:** fibrocartílago mineralizado.
- **H:** hueso.
- **MMP:** metaloproteasas.
- **MMP-“número”:** metaloproteasa tipo “número”.
- **ECM:** matriz extracelular.
- **(HLA)-DR:** antígeno leucocitario humano.
- **UFC-F:** unidad formadora de colonia fibroblástica.
- **PDGF:** factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- **TGF-beta:** factor beta transformante de crecimiento.
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico.
- **FGF:** factor de crecimiento fibroblástico.
- **FGF-2:** factor de crecimiento fibroblástico tipo 2.

- **ALP:** fosfatasa alcalina.
- **“SCAFFOLDS”:** andamios, parches.

# **1.INTRODUCCIÓN**



Para poder estudiar la reparaciones de las lesiones crónicas del tendón supraespinoso que cursan con desgarró completo primero hace falta asentar los conocimientos sobre la anatomía del manguito rotador, la biología propia del tejido tendinoso, los tipos de lesiones que se producen en el manguito rotador, el tratamiento, y los nuevos enfoques terapéuticos englobados en el marco de la Terapia Regenerativa mediante el empleo de células madre mesenquimales (MSCs).

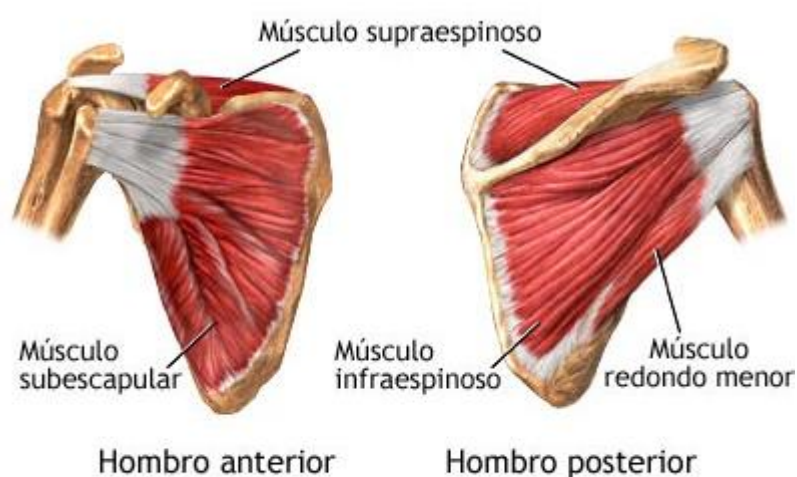
## 1.1 ANATOMÍA DEL MANGUITO ROTADOR Y DEL MÚSCULO SUPRAESPINOSO

Se llama así al complejo anatómico constituido por los tendones correspondientes a cuatro músculos, y que se fusionan con la capsula subyacente al insertarse finalmente en el troquín o en el troquíter:

1. **Músculo subescapular:** nace en la cara anterior en la fosa subescapular y su tendón se inserta en el troquín humeral. Recibe inervación de los nervios subescapulares superior e inferior.
2. **Músculo supraespinoso:** tiene su origen en la fosa supraescapular, en la cara posterior del omóplato y su tendón pasa en su recorrido por debajo del arco acromioclavicular y se inserta en la parte superior del troquíter humeral. Se encuentra inervado por el nervio supraescapular después de pasar por la escotadura supraescapular.
3. **Músculo infraespinoso:** tiene su origen en la cara posterior de la fosa subescapular y su tendón se inserta en la cara posteroexterna del troquíter. Se encuentra inervado por el nervio supraescapular después de pasar por la escotadura espinoglenoidea.

**4. Músculo redondo menor:** tiene su origen en la cara inferoexterna de la escápula y se inserta en la cara inferior del troquíter. Se encuentra inervado por una rama del nervio circunflejo.

Por otra parte, la cabeza humeral y el manguito rotador se encuentran por debajo del arco coracoacromial, que está constituido por el acromion, el ligamento coracoacromial y la apófisis coracoides. Estos elementos, junto con la articulación acromioclavicular suponen los límites de la salida del tendón supraespinoso (Arteaga 1998, Iannotti 1991, Frieman 1994).

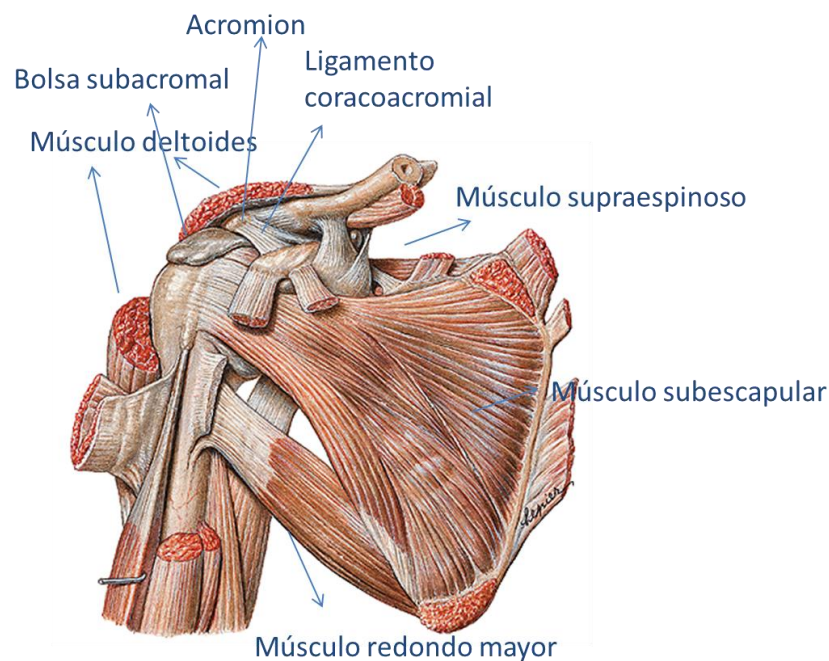


**Fig 1.** Anatomía muscular del manguito rotador humano. Imagen adaptada del archivo de [www.adam.com](http://www.adam.com).

Entrando en mayor detalle, en la anatomía del músculo supraespinoso, destacan los siguientes aspectos: su forma piramidal triangular cuya base es interna y cuyo vértice es externo. La parte externa muscular pasa por debajo del acromion y se continúa con su tendón, que es el tendón supraespinoso. En dicho tendón se pueden distinguir histológicamente la masa tendinosa propiamente dicha y la inserción fibrocartilaginosa. El tendón supraespinoso se agranda y se ensancha hacia la inserción con un margen grueso anterior en forma de cuerda, que a su vez se afina en sentido posterior donde

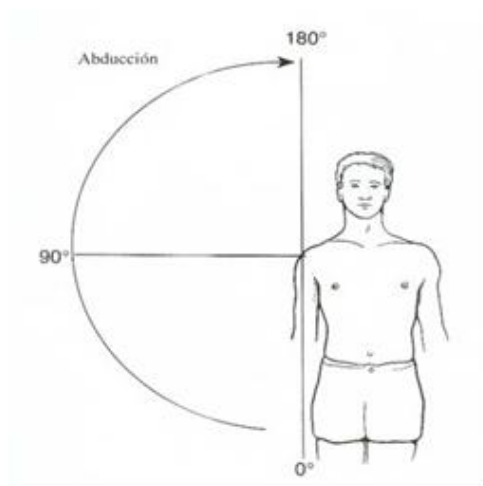
adquiere forma de banda. El patrón fascicular del tendón supraespinoso se une con la trama compacta de la inserción fibrocartilaginosa, a nivel de la cara superior del troquíter humeral, adyacente a la cápsula de la articulación glenohumeral (Fallon *et al* 2002). Dentro del entramado tendinoso existe una zona de menor vascularización llamada “zona crítica” donde los desgarros o roturas ocurren con mayor frecuencia (Codman 1931).

La parte más externa del tendón supraespinoso, una vez superado el arco acromial, está cubierta por el músculo deltoides. Entre el tendón y el acromion se localiza la bolsa subacromial, donde se puede apreciar que la unión del tendón a la capsula articular es muy íntima. Además existe otra estructura muy importante para la funcionalidad del músculo supraespinoso, que es la cuerda del manguito rotador (“Rotador Cable” de Burkhart) (Burkhart 1993), que consiste en una banda colágena gruesa que se extiende desde el ligamento coracohumeral al infraespinoso rodeando en su trayecto la unión fibrocartilaginosa y la “zona crítica”.



**Fig 2.** Vista anterior de los músculos del hombro derecho. Imagen adaptada de Sobotta “Atlas de anatomía humana”

Como se ha mencionado anteriormente, el músculo supraespinoso se encuentra inervado por el nervio supraescapular, rama del plexo braquial procedente de la raíz C5. La acción fundamental de este músculo consiste en la abducción del brazo, igual que el deltoides, pero aportando estabilidad a la articulación glenohumeral en el movimiento de abducción. Se entiende como abducción del hombro a la separación lateral del brazo hasta unos 90°. A partir de esa gradación, se pueden alcanzar otros 90° mediante la rotación de la escápula (Fig 3) (Olivé 2000).



**Fig 3.** Movimiento de abducción del hombro, adaptado de (Olivé 2000).

## 1.2 ESTRUCTURA TENDINOSA

La estructura del tendón está compuesta por un componente celular, los tenocitos, limitado, pero encargado de la secreción del componente más abundante del tendón, la matriz extracelular, compuesta principalmente por colágeno. Ésta se estructura de forma organizada y confiere al tendón sus propiedades particulares que macroscópicamente se traduce en que es blanco y brillante, presenta firmeza pero es flexible.

## **Tenocitos**

Los tenocitos, las células integrantes del tendón productoras de todos los componentes de la matriz extracelular, son ricos en orgánulos responsables de la síntesis y transporte de proteínas, como el retículo endoplasmático rugoso (RER) y el aparato de Golgi (AG). Aparecen en escasa cantidad en la masa tendinosa y presentan un metabolismo bajo, reflejado por un bajo cociente respiratorio (Jozsa *et al* 1997; Khan *et al* 1999).

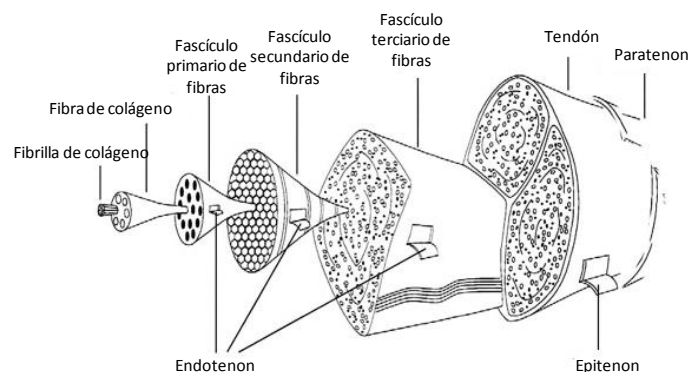
Los tenocitos son células fusiformes en sentido longitudinal, con sección transversal con forma estrellada, con numerosas ramificaciones que se prolongan entre las fibras de colágeno de la matriz, permitiendo de este modo la comunicación entre las células del epitenon, la capa más externa de tejido conjuntivo que recubre el tendón, y los tenocitos. Los tenocitos están expuestos constantemente a las fuerzas mecánicas, que pueden modificar su forma, función, y composición (Almekinders *et al* 1998; Almekinders *et al* 2002).

## **Matriz extracelular**

La fibrilla es la unidad estructural más pequeña, compuesta por moléculas de colágeno, con un diámetro que varía entre 10 y 500 nm (Kastelic *et al* 1978; Miller *et al* 1982; Burgeson *et al* 1992; Jozsa *et al* 1997). Las fibrillas de colágeno forman fibras, y los haces de fibras (fascículos) se encuentran unidos por una fina capa de tejido conectivo laxo denominado endotenon, que posee vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Kastelic *et al* 1978; Ochiai *et al* 1979). Los haces de fascículos a su vez se encuentran rodeados por el epitenon, relativamente innervado e irrigado por vasos sanguíneos y linfáticos (Kastelic *et al* 1978). Los haces de fibras están alineados a lo largo del eje longitudinal del tendón y son responsables de conferir la resistencia del tendón a la

tracción. Además, una pequeña proporción de fibras se localizan de forma transversal, formando espirales y formaciones trenzadas (Józsa *et al* 1991; Józsa *et al* 1997). Esta estructura confiere al tendón la resistencia frente a las fuerzas transversales, fuerzas de corte y rotacionales que actúan sobre el tendón. El tamaño de los haces de fibras se correlaciona de forma directa con el tamaño estructural y la función del tendón. (Józsa *et al* 1997).

Las cargas de compresión que recibe en especial el manguito rotador en el arco coracoacromial, provoca la aparición de una matriz extracelular con proteínas que habitualmente se encuentran en el cartílago o fibrocartílago. Esta composición tan peculiar se produce como mecanismo protector ante las fuerzas de fricción y compresión a las que estos tendones se someten (Vogel *et al* 1989; Matsen *et al* 2009).



**Fig 4.** Estructura del tendón. Imagen adaptada de (Fedorczyk *et al* 2012).

## Colágenos del tendón

Aunque el colágeno tipo I constituye aproximadamente el 60% de la masa del tejido y aproximadamente el 95% del colágeno total (Evans *et al* 1975; von der Mark 1998; Riley *et al* 1994), las fibrillas están compuestas por distintos tipos de colágeno, proteoglucanos y glucoproteínas (Aumailley *et al* 1998).

El colágeno tipo III es el más abundante en el tendón después del colágeno tipo I, que en el tendón supraespinoso humano se sitúa en torno al 3% (Riley *et al* 1994). En los tendones sanos, el colágeno tipo III tiende a estar restringido al endotenon y al epitenon (Duance *et al* 1977) y también aparece dentro de la masa tendinosa en tendones envejecidos o en el sitio de inserción de tendones sometidos a mucho estrés como el tendón supraespinoso (Fan *et al* 1997). El colágeno tipo III produce fibrillas más pequeñas y menos organizadas, lo que determina una disminución de la resistencia global del tendón (Lapiere *et al* 1977).

Otros tipos de colágeno como el colágeno tipo V se encuentran intercalados con el de tipo I, formando una base, un sustrato para la fibrinogénesis y modulando el crecimiento de la fibrilla (Linsenmayer *et al* 1990; Birk *et al* 1990). Por su parte el colágeno tipo IV está limitado a la membrana basal de los vasos sanguíneos del tendón (Von der Mark 1998), y en los tendones sanos forma una red junto con las las fibras de colágeno tipo I, que sirve de sostén (von der Mark 1998; Waggett *et al* 1998), pero en la inserción se encuentra asociado a células, en el fibrocartílago (Waggett *et al* 1998). Los tipos XII y XIV están asociados con la superficie de fibrillas de colágeno tipo I, particularmente en la zona de inserción hueso-tendón (Shaw *et al* 1991). Los colágenos enumerados median en las interacciones con otros componentes de la matriz. Otros colágenos encontrados en menores proporciones incluyen los tipos II, IX, X y XI, cuya función es la de disipar la concentración de la tensión en la interfase hueso-tendón (Waggett *et al* 1998; Fukuta *et al* 1998).

Los colágenos en la matriz se encuentran estabilizados por la formación de puentes cruzados como la hidroxilisilpiridolina (HP) y la lisilpiridolina (LP). La cantidad de HP en el tejido conectivo está relacionada con su función mecánica localizándose las mayores concentraciones en el cartílago hialino y en los discos

intervertebrales, es decir en estructuras fibrocartilagosas. El contenido de HP no varía demasiado una vez alcanzada la madurez, por lo que probablemente estas estructuras no contribuyan demasiado a la alteración de las propiedades físicas del tendón envejecido (Eyre *et al* 1984; Bailey *et al* 1998; Knott *et al* 1998; Bank *et al* 1999).

Existe otra forma de puentes de colágeno, mediante la glucación no enzimática (Bailey *et al* 1998). Los azúcares reducidos como la pentosa, que provienen de la circulación, se unen de forma irreversible con proteínas de la matriz dando lugar a productos finales de glucación avanzada (AGE). Estos productos son responsables de la reducción de la elasticidad y menor solubilidad de los tejidos envejecidos. Además, tienen un efecto sobre las interacciones célula-matriz, provocando alteraciones en las actividades celulares propias de tejidos envejecidos en enfermedades como la artrosis (DeGroot *et al* 2001; Bank *et al* 2002). Debido a que la tasa de recambio de la matriz del colágeno generalmente es baja, los AGE se acumulan de forma gradual en el colágeno con el envejecimiento, contenido que sirve como marcador de la edad molecular del tejido, una propiedad muy útil en los estudios sobre la dinámica de la matriz del tendón (Bank *et al* 1999).

## **Proteoglucanos del tendón**

Los proteoglucanos constituyen un grupo heterogéneo de proteínas con distintas funciones en la matriz, aunque todos tienden a presentar al menos una cadena lateral de glucosaminoglucano (GAG), azúcar complejo con disacáridos que se repiten (Hardingham *et al* 1992). Las variaciones en el contenido de proteoglucanos están asociadas con la función. Así, por ejemplo los tendones de la cabeza corta del bíceps, que son tendones flexores, contienen un 0,2% de proteoglucanos, la mayoría con cadenas laterales de GAG (80%) y el resto con condroitín sulfato, con predominio del

proteoglucano decorina que es característico de los tendones flexores que experimentan grandes cargas de tensión (Riley *et al* 1994). Los tendones supraespinosos tienen también grandes cantidades de proteoglucanos, principalmente condroitín sulfato y en menor proporción dermatán sulfato y keratán sulfato (Riley *et al* 1994), además del agrecano, principal proteoglucano de gran tamaño junto con el biglicano (Berenson *et al* 1996). Esta composición fibrocartilaginosa parece ser el resultado de una continua respuesta fisiológica de carácter reversible ante el estrés celular, es decir, una metaplasia adaptativa frente a la carga compresiva experimentada por el tendón supraespinoso en el manguito rotador. A pesar de esta propiedad protectora, la formación de fibrocartilago podría tener también una importancia patológica, porque ante las lesiones, su formación modifica las propiedades estructurales del tendón, afectando a la respuesta funcional del tendón (Berenson *et al* 1996; Benjamin *et al* 1995).

### **Envejecimiento de la matriz del tendón**

La edad afecta a la matriz del tendón, y lo hace por diferentes vías. Durante la maduración, la densidad celular disminuye significativamente con un incremento notable del contenido de colágeno y una reducción de glucosaminoglucanos (Ippolito *et al* 1980). Después de la madurez no se observa variación importante en la concentración total de colágeno y predomina el colágeno tipo I. Sin embargo, la distribución del colágeno tipo III puede variar, con una mayor proporción incorporada al tipo I (Riley *et al* 1994). Las fibras de colágeno tienden a alargarse, existiendo un incremento de la estabilidad termal y además el tendón se hace más rígido y menos elástico (Moore *et al* 1987; Carlstedt 1987). Disminuye notablemente la solubilidad del colágeno, probablemente por la acumulación de puentes cruzados de AGE (Paul *et al*

1996). En el envejecimiento existe daño físico en el tendón acompañado de un aumento en la cantidad de colágeno desnaturalizado y una mayor tasa de división proteolítica de los componentes de la matriz (Riley *et al* 2002). El envejecimiento se asocia con la ausencia de organización de las fibras, disminución de la celularidad e incremento del contenido de GAG (Aström *et al* 1995; Chard *et al* 1994). Los tendones localizados en hombro, codo, rodilla y tobillo, sobretodo, tienden a experimentar estos cambios degenerativos (Leadbetter *et al* 1992; Jarvinen *et al* 1997).

### **Recambio de la matriz del tendón**

Los procesos de síntesis y degradación de la matriz son importantes para el mantenimiento y para la reparación del tendón. Hay que tener en cuenta en estos procesos que los tenocitos se mantienen activos durante toda la vida, expresando una variedad de proteínas y de enzimas que intervienen en el metabolismo y dinámica de la matriz (Ireland *et al* 2001; Riley *et al* 2001; Riley *et al* 2002). Además el ejercicio energético de los tendones induce la formación de colágeno tipo I y aumenta los niveles peritendinosos de varios mediadores de vasodilatación e inflamación y del lactato y glicerol (Langberg *et al* 1999). Estas actividades presumiblemente implicadas en la respuesta adaptativa del tendón sano, podrían influir también en la tendinopatía generada por un movimiento tendinoso excesivo.

### **Zona de inserción**

Los tendones del manguito rotador se insertan en la cabeza humeral mediante un tejido fibrocartilaginoso especial llamado entesis. La propia estructura y composición de la entesis del tendón supraespinoso amortigua el estrés de la carga. Aunque los

cambios tisulares son progresivos, la entesis se puede dividir en cuatro zonas (Kumagdi *et al* 1994; Wagget *et al* 1997; Fukuta *et al* 1998; Moffat *et al* 2008; Matsen *et al* 2009):

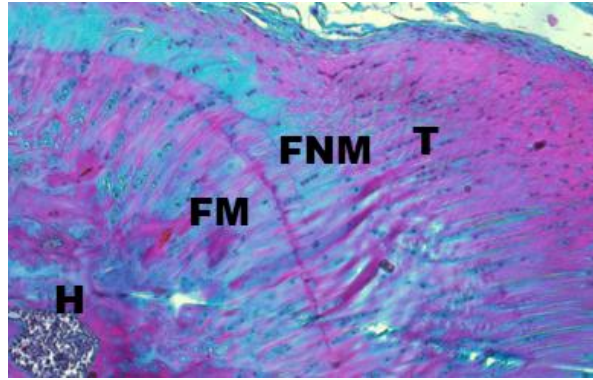
1. La primera zona es la zona del tendón. Contiene fibras bien alineadas de colágeno tipo I con pequeñas cantidades de proteoglicanos, decorina y biglicano.

2. La zona de fibrocartílago no mineralizado. Contiene colágeno tipo II y III con pequeñas cantidades de tipo I, IX, y X. Marca la transición entre el tendón y el hueso.

3. La zona de fibrocartílago mineralizado. Predomina el colágeno tipo II y también una alta proporción de colágeno tipo X.

4. la cuarta zona es el hueso donde predomina el colágeno tipo I con alto contenido mineral (calcificado).

El frente de calcificación se encuentra entre las dos capas de fibrocartílago. En la estructura de la entesis del tendón supraespinoso, cabe destacar la presencia de células parecidas a condrocitos productores de colágeno tipo II, que intervienen en la función biomecánica. Por tanto existe en la zona de la entesis una matriz extracelular parecida al cartílago, la cual está preparada para transferir grandes fuerzas compresivas en dirección a la cabeza humeral (Vogel *et al* 1994; Woo *et al* 1987; Moffat *et al* 2008).



**Fig 5.** Zona de inserción del tendón supraespinoso sano de rata. T=tendón, FNM=fibrocartílago no mineralizado, FM=fibrocartílago mineralizado, H=hueso. Imagen propia del estudio teñida con tricrómico de Masson y tomadas a 100 aumentos.

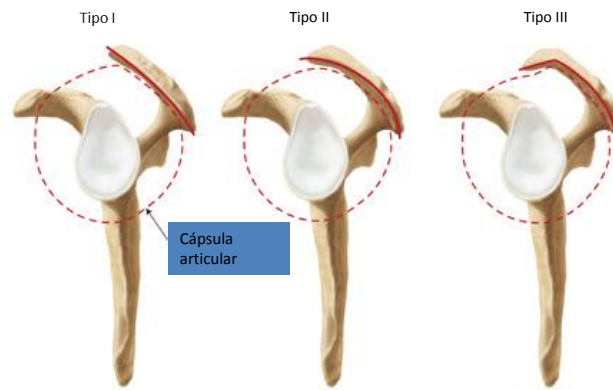
### 1.3 ETIOPATOGENIA DE LAS ROTURAS DEL MANGUITO ROTADOR

Las roturas del manguito rotador constituyen una importante causa de dolor e incapacidad funcional del hombro. Existen dos escuelas (posturas) acerca del origen intrínseco o extrínseco de la patología del manguito rotador:

- Una defiende que el papel principal lo desempeñan **cambios intrínsecos** al propio tendón (Uri *et al* 1997). Las causas intrínsecas están relacionadas con áreas de menor vascularización del tendón, con menor capacidad de reparación del colágeno y una mayor posibilidad de sobrecarga. Los defensores de esta teoría consideran los cambios óseos o ligamentosos del arco coracoacromial como fenómenos secundarios. Esto se basa fundamentalmente en que los desgarros parciales son mucho más frecuentes en el lado articular del tendón con respecto al lado bursal. Este último se debería lesionar, en teoría, más frecuentemente por el rozamiento subacromial (Ozaki *et al* 1988). En este

contexto la “zona crítica” hipovascular del tendón sería un área predispuesta a la degeneración y a la rotura (Codman 1934, Ling *et al* 1990).

- Otra escuela defiende que el origen de la patología deriva de causas extrínsecas en las que el manguito rotador se desgasta por el roce con las estructuras del arco coracoacromial (Neer 1972; Neer *et al* 1983), es decir, por el roce del manguito rotador con estructuras óseas o ligamentosas periféricas. Estos factores extrínsecos se dividen en primarios, si resultan de alteraciones congénitas o adquiridas de la anatomía coracoacromial, y en secundarios cuando resultan de inestabilidad glenohumeral (Uri *et al* 1997). Dentro de estos factores primarios se incluyen la morfología de la parte anterior del acromion que puede ser plana, curva, o en gancho, siendo esta última la que más se asocia con las roturas del manguito rotador (Bigliani *et al* 1991). Otros factores primarios serían la inclinación del acromion, el hueso acromial, los espolones acromiales, los osteofitos acromioclaviculares de orientación inferior, y el engrosamiento del ligamento coracoacromial entre otros (Bigliani 1986, Epstein *et al* 1993, Haygood *et al* 1994, Liberson 1937, Tyson *et al* 1993). En la compresión extrínseca secundaria no es necesaria la existencia de alteraciones morfológicas en el arco coracoacromial, sino que se produce un estrechamiento relativo de la salida de los tendones del manguito rotador provocada por la inestabilidad glenohumeral.



**Fig 6.** Clasificación de la morfología acromial. Imagen adaptada de (Bigliani *et al* 1991).

Actualmente se tiende a considerar conjuntamente los factores intrínsecos y extrínsecos, aunque de un modo más general estas lesiones se consideran que se producen en un contexto de atrapamiento subacromial extrínseco primario, en el que fenómenos degenerativos y acontecimientos traumáticos pueden favorecer o precipitar su instauración (Williams *et al* 2004; Matsen *et al* 2009).

En las primeras fases del fallo de las fibras del manguito, aparecen los desgarros parciales que inicialmente provocan dolor cuando se ejecuta la contracción muscular, produciéndose por tanto una lógica inhibición refleja de la acción muscular. Esta inhibición refleja, junto con la pérdida de fuerza por rotura de fibras del manguito, hace que el músculo pierda estabilidad y equilibrio. Cuando el manguito debilitado ya no pueda impedir la subida de la cabeza humeral por el tirón del deltoides, el manguito residual quedará atrapado entre la cabeza y el arco coracoacromial. Esto provoca un aumento de la abrasión con el movimiento húmero-escapular, contribuyendo aún más a la degeneración del manguito. Aparecen osteofitos degenerativos en el ligamento coracoacromial, que se encuentra sobrecargado con la presión ejercida por la cabeza humeral. Los tendones acaban convirtiéndose en elevadores de la cabeza humeral en vez de ser compresores. Una vez que está afectado todo el grosor del manguito por el

desgarro completo, en muchas ocasiones tiene lugar la abrasión del cartílago articular humeral contra el arco acromial dando lugar a una enfermedad articular degenerativa secundaria llamada artropatía del desgarro del manguito (Neer *et al* 1983; Matsen *et al* 2009).

El deterioro de los músculos del manguito que acompaña inevitablemente a los desgarros crónicos, constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la cirugía reparadora. Los defectos crónicos de los tendones del manguito suelen acompañarse de atrofia, retracción y pérdida del desplazamiento (Nakagaki *et al* 1994). Otros autores (Uthoff *et al* 2003; Safran *et al* 2005) añaden un aumento de la degeneración grasa con el paso del tiempo en lesiones crónicas sin reparar. De hecho autores como (Goutallier *et al* 2003) afirmaron que la degeneración es un factor pronóstico en la cirugía del manguito.

Además de los cambios en el músculo, el tendón sufre cambios en su composición colágena, siendo mayor inicialmente la proporción de colágeno tipo I y colágeno tipo XII, disminuyendo posteriormente con el tiempo su proporción, pero con gran persistencia de colágeno de tipo III (Yokota *et al* 2005).

El colágeno de tipo I es muy resistente a la degradación enzimática, por lo que posee una prolongada vida media. Con el envejecimiento el colágeno experimenta mayor glucación, con acumulación de pentosidina (Verzijl *et al* 2000). La degradación del colágeno se produce extracelularmente y está mediada por proteasas, las colagenasas, que son miembros de la familia de metaloproteasas de la matriz (MMP), capaces de dividir la molécula de colágeno tipo I intacta (Matrisian *et al* 1992; Cawston *et al* 1995; Nagase *et al* 1999). La acción se produce en un lugar específico de la molécula y es el paso limitante en el recambio de colágeno, generando fragmentos que son susceptibles a la acción de otras proteasas, como las gelatinasas. Las MMP con

actividad de colagenasas incluyen las MMP-1, MMP-8 y MMP-3, MMP-2 y MMP-14 (Knäuper *et al* 1996).

Los proteoglucanos en un tendón sano tienen una tasa de recambio superior a la de los colágenos, y es llevado a cabo principalmente por agreganasas (Kaushal *et al* 2000). Se ha comprobado que los catabolitos de agregano y decorina están presentes en el tendón joven y también en el tendón maduro, siendo por tanto este hecho compatible con la existencia de unos niveles elevados de recambio (Campbell *et al* 1996; Rees *et al* 2000).

Dentro del concepto de la tendinopatía crónica existen numerosos estudios que clarifican las características generales de la misma. Estudios realizados en tendones supraespinosos con procesos degenerativos que mostraron una reducción discreta en el contenido total de colágeno, donde existía una mayor proporción de colágeno tipo III en relación con el tipo I (Riley *et al* 1994). Otros autores señalan un aumento notable de los puentes cruzados HP y LP (Bank *et al* 1999). Se han observado hallazgos similares en la tendinopatía crónica en animales (Birch *et al* 1998) y también en estudios más antiguos en lesiones agudas producidas por trauma quirúrgico o por la inyección de colagenasa (Williams *et al* 1980; Silver *et al* 1983; Williams *et al* 1984; Watkins *et al* 1985). Otros estudios revelaron aumento de varios proteoglucanos en tendones con procesos degenerativos (Riley *et al* 1994; Birch *et al* 1998). Las glucoproteínas como la tenascina-C aumentan en el supraespinoso roto, con diferencias en las isoformas expresadas (Riley *et al* 1996). También se observa acumulación de tejido necrótico y de fibrina (Tillander *et al* 2002). Estos cambios en la matriz son compatibles con un proceso de cicatrización presente en el tendón en degeneración, aunque con remodelado incompleto. La evidencia disponible generalmente sustenta la hipótesis de que microlesiones acumuladas producen un deterioro gradual en la calidad del tendón de la

matriz. La matriz experimenta una transformación paulatina de fibrillas de colágeno tipo I organizadas a un tejido constituido por fibrillas que contienen colágeno tipo I y tipo III con una organización al azar (Eriksen *et al* 2002).

Existen razones para creer que una modificación en el recambio de colágeno precede y predispone la rotura tendinosa. Por ejemplo un estudio sobre la edad molecular de la red de colágeno, demostró un mayor nivel de recambio de matriz en tendones supraespinosos en comparación con tendones del bíceps (Bank *et al* 1999). Por lo tanto, por un lado parece ser común un elevado nivel de remodelado en tendones como el supraespinoso, y por otro parece ser un proceso vinculado con el inicio de una patología degenerativa (Riley *et al* 2002). Parece ser que esta tasa de recambio mayor de colágeno que tiene lugar en los tendones supraespinosos, está asociado con un aumento en la expresión y actividad de varios miembros de la familia de MMP, ya que en roturas tendinosas se ha visto una mayor actividad de la MMP-1, y unos niveles reducidos de MMP-2 y MMP-3 con evidencia de mayor desnaturalización y recambio de colágeno (Riley *et al* 2002). La MMP-3 (stromelisin) es considerada la enzima reguladora clave en el control del recambio de la matriz, su disminución podría representar una alteración en el proceso de remodelado normal. Por lo tanto, la tendinopatía podría ser el resultado del fracaso en la reparación o mantenimiento adecuado de la matriz del tendón en respuesta a la tensión mecánica o al microtrauma repetido. Siguiendo esta línea se ha comprobado que el líquido sinovial de la articulación glenohumeral de pacientes con rotura de tendón contiene MMP-1 y MMP-3 (Yoshihara *et al* 2001). Además los niveles de GAG también eran mayores en los líquidos sinoviales provenientes de desgarros totales, fenómeno que es compatible con un mayor recambio de los proteoglicanos de la matriz (Yoshihara *et al* 2001).

Existen estudios donde se ha comprobado que el recambio de la matriz en la patología tendinosa se acompañaba de ausencia de inflamación, aumento en la expresión de genes de colágeno tipo I y III, aumento de versican, biglicano, perlecan, las glucoproteínas laminina, SPARC y tenascina-C y niveles menos abundantes o ausente de MMP3 (tendinopatía dolorosa y rotura de tendón). La pérdida de actividad de MMP-3 se puede asociar con la elevación de proteoglicanos comúnmente encontrados en las diferentes lesiones tendinosas (Ireland *et al* 2001).

## **1.4 CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES DEL MANGUITO ROTADOR**

Las lesiones del manguito rotador se clasifican en función de la profundidad de la misma, su tamaño, y su cronicidad, según los criterios de (Ellman 1991, Ellman 1993).

### **1. Según la profundidad de la lesión**

- Espesor completo
- Espesor parcial:
  - Grupo I: menores de 3 mm.
  - Grupo II: las de 6 mm han llegado como máximo a la mitad del grosor.
  - Grupo III: afectan a más de la mitad del tendón.

### **2. Según el tamaño de la lesión**

- Pequeña: menor de 1 cm.
- Mediana: de 1 a 3 cm.
- Grande: de 3 a 5 cm.
- Masiva: más de 5 cm.

### 3. Según la antigüedad de la lesión

- Agudas: menos de 6 semanas.
- Subagudas: entre 6 semanas y 6 meses.
- Crónicas: más de 6 meses.
- Antiguas: más de 1 año.

## 1.5 SINTOMATOLOGÍA

Existe una gran variabilidad en las manifestaciones clínicas en las roturas del manguito rotador, pero las más frecuentes las podemos resumir en:

**1. La rigidez:** limita el arco de movimiento pasivo y a menudo ocasiona dolor en el punto final del arco, así como dificultad para dormir. Es más frecuente en roturas tendinosas parciales, pero también puede surgir en las de roturas completas (Jackson *et al* 1976). La rigidez se manifiesta por limitaciones en cualquiera de los movimientos del hombro, rotación interna, flexión, rotación externa, abducción, adducción.

**2. La pérdida de fuerza o el dolor:** aparecen sobretodo con la contracción muscular y limitan por tanto la función normal del hombro. Aquí las fibras tendinosas que están debilitadas por la degeneración pueden romperse sin manifestaciones clínicas, u originar sólo síntomas transitorios aunque en otras ocasiones el dolor y el déficit funcional llega a ser incapacitante. A pesar de que las personas con roturas totales en el manguito rotador pueden conservar la capacidad de abducción completa del brazo, por lo general se manifiesta la falta funcional en las fibras tendinosas, con la pérdida de fuerza (Leroux *et al* 1995). Las personas con roturas parciales tienen mucho más dolor con las actividades musculares contra resistencia que quienes tienen roturas totales. Para diferenciar la pérdida de fuerza debida al dolor por el defecto tendinoso, basta con

la inyección subacromial de un anestésico (Ben-Yishay *et al* 1994), comprobando que desaparece.

**3. La inestabilidad:** se habla de inestabilidad glenohumeral cuando existen problemas para que la cabeza del húmero quede centrada en la cavidad glenoidea, y una lesión en el manguito de los rotadores puede ocasionarla. La pérdida del efecto compresivo normal del mecanismo de acción del manguito, y del defecto estabilizador del tendón superior de éste interpuesto entre la cabeza humeral y el arco coracoacromial puede contribuir a la inestabilidad glenohumeral superior, situación que se agrava con el desgaste del borde glenoideo superior y cuando se pierde la función de apoyo normal del arco coracoacromial por erosión o eliminación quirúrgica (Ziegler *et al* 1996).

**4. Crepitación por abrasión:** se manifiesta por la crepitación sintomática con el movimiento glenohumeral pasivo. Entre los factores que contribuyen a su aparición están la hipertrofia de las bolsas, alteraciones secundarias de la superficie inferior del arco coracoacromial, pérdida de la integridad de la cara superior de los tendones del manguito, cambios degenerativos del troquíter y troquín y artropatía por desgarro del manguito rotador (Matsen *et al* 2004).

## 1.6 TRATAMIENTO

En las roturas sintomáticas del manguito rotador la selección del tratamiento oportuno se basa en diversos factores, como la edad y expectativas del paciente, la existencia o no de antecedente traumático, el tamaño de la rotura, el grado de retracción musculotendinosa y el grado de atrofia y de degeneración grasa muscular (Williams *et al* 2004).

## **Tratamiento Conservador**

Aunque este tipo de tratamiento puede ser eficaz a cualquier edad, resulta especialmente apropiado a partir de la sexta década de vida, porque en este grupo de edad es más prioritario el alivio del dolor que la plena recuperación funcional. Normalmente estos pacientes suelen presentar roturas crónicas en manguitos con una pobre calidad tisular y una avanzada atrofia muscular, factores que complican la reparación y la posterior recuperación.

El tratamiento conservador incluye el uso combinado de calor local y antiinflamatorios no esteroideos en infiltraciones subacromiales, con el fin de controlar el dolor. Posteriormente se introducen ejercicios rehabilitadores de estiramiento capsular y fortalecimiento muscular, durante más o menos 6-12 semanas, que van dirigidos a la recuperación funcional. Esto puede suponer un alcance de resultados favorables hasta un 68% de los casos (Rockwood *et al* 2003).

## **Tratamiento quirúrgico**

El objetivo de la cirugía del manguito rotador es mejorar el bienestar y la función del hombro. La cirugía se debe de considerar en los casos en que el paciente sufra un desgarro agudo y grande del manguito o que haya un defecto crónico que conlleve síntomas intensos que no mejoren tras al menos 3 meses de medidas conservadoras (Matsen *et al* 2009). Por tanto el objetivo es establecer de nuevo la continuidad entre el músculo y el hueso de modo que se pueda recuperar la fuerza y la función (Dugas *et al* 2002).

Según otros autores, en líneas generales el tratamiento quirúrgico está indicado en pacientes con enfermedad del manguito rotador que han tenido un tratamiento conservador previo de más de 12 meses, afectación severa o una rotura del manguito de

más de 1 cm<sup>2</sup> con síntomas tendinosos. En estos casos estaría indicado practicar una descompresión subacromial. Todos los demás pacientes pueden ser tratados con medidas conservadoras, esperando un resultado favorable en el 85% de los casos (Bartolozzi *et al* 1994).

En los casos de rotura aguda la reparación debe llevarse a cabo en un plazo breve de tiempo, antes de que surjan la retracción, fibrosis, la degeneración de los bordes tendinosos y se desencadene la atrofia muscular. Pero en casos crónicos no constituye una urgencia y es preferible realizar previamente un programa que mejore la movilidad y el fortalecimiento del hombro (Gartsman 2009).

Los factores determinantes para una reparación duradera de un desgarró, son la calidad del tendón, la calidad muscular y la cantidad de tejido tendinoso perdido. Partiendo de la base de que la potencia del tendón disminuye con el envejecimiento y el desuso, la probabilidad de que se produzca una reparación duradera disminuye en hombros de personas mayores y con baja actividad, situación que justamente se dan en las lesiones crónicas. En los desgarró crónicos, la cirugía está más indicada para aliviar el dolor, mejorar la función y prevenir lesiones tendinosas mayores en el futuro, pero hay que insistir que sobretodo está indicada para aliviar el dolor. No debería operarse un paciente que sólo presente una impotencia funcional (Bokor *et al* 1993).

Con el tratamiento quirúrgico se pretende conseguir una reparación completa del desgarró para recuperar la fuerza muscular y eliminar o reducir el compromiso subacromial con el objetivo de aliviar la sintomatología dolorosa y prevenir las re-roturas. Es necesario además por un lado, preservar el músculo deltoides, y por otro prevenir la rigidez postquirúrgica. La finalidad última es influir favorablemente y de una forma natural sobre la unidad musculotendinosa mediante un alivio significativo del dolor y una mejora sostenida de la capacidad funcional (Williams *et al* 2004).

Una primera descripción de una reparación del tendón supraespinoso es atribuida a Codman EA, en 1911, aunque ya existían antecedentes en cirugía de la inestabilidad glenohumeral (Perthes 1906). En 1972 Neer propuso la acromioplastia anterior abierta combinada con resección del ligamento coracoacromial, artroplastia acromio-clavicular y sutura tendón-hueso. Esta técnica, estándar durante mucho tiempo, alcanza una prevalencia de resultados favorables próxima al 85% (Watson *et al* 2002; Severud *et al* 2003).

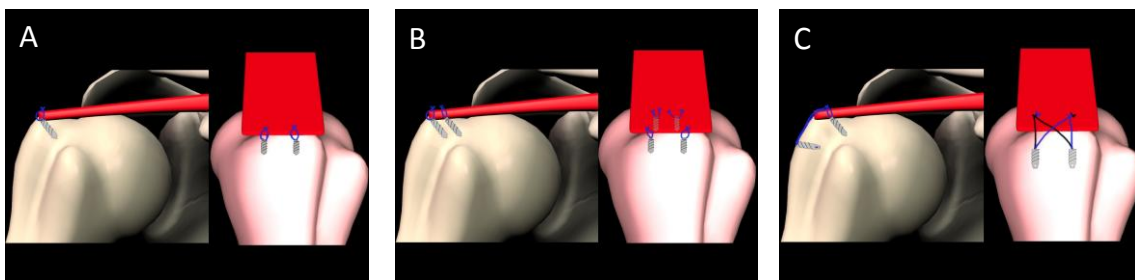
De todas formas la necesidad de intervenir las roturas de manguito es cuestionada, ya que su prevalencia alcanza el 50% tanto en estudios cadavéricos (Jerosch *et al* 1991; Lehman *et al* 1995; Sakurai *et al* 1998), como en poblaciones asintomáticas (Milgrom *et al* 1995; Sher *et al* 1995; Miniaci *et al* 1995; Yamaguchi *et al* 2001; Connor *et al* 2003; Schibany *et al* 2004). Aunque más de la mitad de las roturas indoloras acaban manifestándose clínicamente (Mancuso *et al* 2002), y a pesar que el tratamiento conservador ha probado su eficacia sobradamente (Yamaguchi *et al* 2001), el aumento de la esperanza y calidad de vida ha elevado la prevalencia de roturas en pacientes activos de edad avanzada, impulsando las indicaciones quirúrgicas (Mancuso *et al* 2002).

El tratamiento clásico para la sutura del tendón, la descompresión subacromial, o el desbridamiento simple consiste sobretodo en la cirugía abierta. Variantes a este tratamiento han sido las incisiones mini-open (McCluskey *et al* 2006; Duralde *et al* 2008) y fundamentalmente la reparación asistida por artroscopia (Paulos *et al* 1994; Liu 1994; Baker *et al* 1995), técnica donde se realiza la acromioplastia y la liberación mediante técnica artroscópica con la posterior reparación del desgarro del manguito mediante una incisión mínima a nivel del músculo deltoides. Pero aunque existen numerosos estudios artróscopicos con resultados clínicamente aceptables, la cirugía

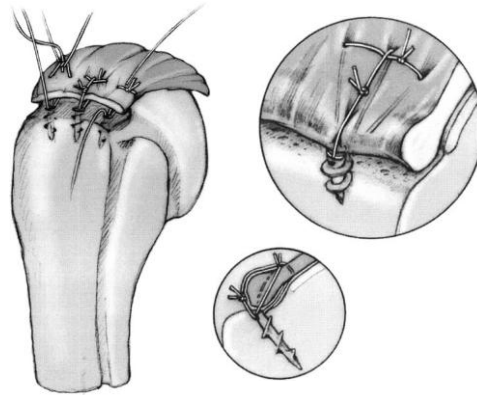
abierta ofrece buenos resultados en comparación (Ogilvie-Harris *et al* 1993). Pero en la actualidad se utiliza sobretodo la atroscopia y la cirugía abierta se reserva para los casos fallidos, como segunda opción.

Dentro de los procedimientos técnicos podemos destacar los más utilizados que son:

- Reparación en hilera simple: consiste en una sola fila de anclajes.
- Reparación en doble hilera: consiste en dos filas de anclajes, una medial y otra lateral. Fue descrita teóricamente porque restaura la anatomía y mejora la biomecánica (Lo y Burkhart 2003).
- Reparación con sutura transósea o puente: es una modificación de la doble hilera, en la que la fila lateral se coloca en la cara más lateral del troquíter, simulando una sutura transósea. Es frecuente utilizar dentro de esta modalidad la técnica de reparación con sutura Mason-Allen modificada, la cual ejerce una presión constante del tendón al hueso y la fuerza ejercida por el tendón está repartida de forma equilibrada. Estudios recientes aportan buenos resultados en cuanto a biomecánica, cobertura de la huella de inserción y resistencia de este tipo de reparación.



**Fig 7.** Sutura en hilera simple (A), sutura en doble hilera (B), sutura transósea (C). Imagen adaptada de <http://seattleclouds.com/myapplications/Albertosh/Hombro/Medroturacompleta.html>.



**Fig 8.** Sutura tendinosa usando la técnica modificada de Masson-Allen. Imagen adaptada de (Scheibel et al 2003).

El uso de diferentes técnicas de sutura depende de entre otras circunstancias, de las preferencias del equipo de cirugía, del estado en el que está el tendón residual, de la morfología, tamaño y localización del desgarró. La técnica de resonancia magnética preoperatoria, que tiende a minusvalorar el tamaño de la rotura (Mellado *et al* 2005; Mellado *et al* 2006), puede definir muy bien su morfología (en “C”, en “U”, longitudinal) (Davidson *et al* 2005), y el grado de retracción, contribuyendo así a una buena planificación quirúrgica y el empleo del tipo de sutura. Parece ser que las suturas en doble hilera proporcionan mayor resistencia (Ma *et al* 2006), aunque por otro lado se ha visto que sus resultados son similares al resto de suturas (Anderson *et al* 2006). El número de anclajes óseos no parece ser determinante (Fealy *et al* 2006). Las suturas bioreabsorbibles son las más utilizadas y especialmente en artroscopia. Sin embargo los parches o membranas sintéticos o biológicos todavía no son recomendados porque todavía están en estudio (Moore *et al* 2006; Iannotti *et al* 2006), aunque amplían mucho la esperanza de encontrar un tratamiento eficaz, y esta tesis quiere contribuir a ello.

En general se puede observar que para reparar este tipo de lesiones se emplean procedimientos quirúrgicos que incluyen el uso de una sutura (Bishop *et al* 2006; Cho *et al* 2010; Koh *et al* 2010; Toussaint *et al* 2011) que permite la unión del tendón desgarrado a su lugar de inserción ósea. Sin embargo, la eficacia de esta técnica no es plenamente satisfactoria, debido a la elevada frecuencia de re-rotura (Galatz *et al* 2001).

Este fracaso clínico en lesiones degenerativas se ha asociado a distintos factores preoperatorios como la edad (Bjornsson *et al* 2011), la reducción de la distancia acromio-humeral (Saupe *et al* 2006), el tamaño del desgarro (Galatz *et al* 2001), el grado de atrofia y la degeneración con aparición de grasa muscular, la retracción del tendón (Bjornsson *et al* 2011; Cofield *et al* 2001) o los factores quirúrgicos, tales como la elevada tensión a la que se somete el tendón una vez reinsertado (Bartolozzi y otros, 1994; Cofield *et al* 2001; Gimbel *et al* 2007; Hersche y Gerber, 1998). Conjuntamente, estos factores influyen en la curación y remodelación final que determina en última instancia el resultado clínico. Los ancianos que presentan una rotura total del tendón supraespinoso, presentan una de por sí, una reducción en la capacidad natural de curación del tendón dañado y también una menor resistencia a las fuerzas mecánicas, por lo que estos dos factores unidos juegan en contra para conseguir una reparación adecuada durante el postoperatorio, donde el proceso de cicatrización está alterado.

## **1.7 NUEVOS ENFOQUES EN LA REPARACIÓN**

Por lo tanto, se necesita generar nuevos enfoques para mejorar el proceso de curación en términos biomecánicos y conseguir una curación más natural, especialmente en la zona de inserción. En este contexto, se ha investigado diferentes terapias en el campo de la regeneración del tendón, tales como inyección local de las MSCs (Nourissat *et al* 2010), uso de factores de crecimiento (Ide *et al* 2009; Manning

*et al* 2011) o la ingeniería de tejidos mediante el uso de membranas biológicas bioactivas en diferentes modelos animales (Dejardin *et al* 2001; Santoni *et al* 2010), que han aportado una mejoría en la reparación del tendón, aunque la regeneración completa todavía no se ha conseguido.

La ingeniería tisular, donde cada vez más se estudian la utilización de materiales nuevos a modo de andamiaje o parche para reconstruir o reparar estructuras orgánicas dañadas, ofrece claramente alternativas nuevas, un marco nuevo para abordar las alteraciones tendinosas (Longo *et al* 2012), ya que se pretende conseguir con ello lo mismo que en la reparación de otros tejidos de naturaleza mecánica, es decir, conseguir un aumento de la fuerza mecánica, mejorando también la cantidad y calidad del tejido reparado (Franceschi *et al* 2008). Se piensa que los andamios (“scaffolds”) o parches con características intrínsecas tales como una buena fuerza mecánica y una buena capacidad de retención de sutura, si son aplicados de forma adecuada en una cirugía, pueden ofrecer la capacidad de reparar ya desde el tiempo cero hasta incluso periodos más largos después de la intervención quirúrgica, es decir permitir el proceso de reparación durante el postoperatorio. Pero claro está, en contraprestación todavía existen numerosas preguntas relacionadas con su indicación, aplicación quirúrgica, seguridad, mecanismos de acción, y eficacia que aún necesitan esclarecerse (Longo *et al* 2012).

Dentro de los nuevos materiales estudiados como andamios, encontramos polímeros artificiales, membranas biodegradables y biomateriales derivados de animales y humanos (Baber *et al* 2006). Dentro de todo esto, se puede afirmar que la estrategia más innovadora en la reparación del tendón reside en el uso de andamios temporales, de matrices extracelulares (ECMs), que además de mejorar la función mecánica, pretenden mejorar también la calidad de vida del paciente (Ronga *et al*

2009; Maffulli *et al* 2010; Maffulli *et al* 2011). Las ECMs son por tanto andamios temporales que sirven para acelerar la biología de la reparación tisular (Thomopoulos *et al* 2002; Derwin *et al* 2006).

Pero un paso más allá en la ingeniería de tejidos estaría en el uso a la vez de andamios y MSCs para conseguir reparaciones más efectivas del tendón dañado (Ouyang *et al* 2002; Ouyang *et al* 2003; Nourissat *et al* 2010; Lee *et al* 2012), por lo que dentro de las nuevas estrategias reparadoras estaría incluida ésta, y formaría parte de un concepto más global que es la Medicina Regenerativa.

## **1.8 GENERALIDADES DE LAS MSCs**

Las MSCs se han encontrado en distintos tejidos adultos como el periostio, el tejido adiposo, la membrana sinovial, musculo, dermis, médula ósea, e incluso trabécula ósea (Tuan *et al* 2002), pero es normalmente la médula ósea la fuente más accesible y rica en MSCs. Las MSCs se distinguen de las células madre hematopoyéticas porque son negativas para los marcadores de superficie CD11b, CD14, CD34, CD45 y antígeno leucocitario humano (HLA)-DR, pero si expresan CD73, CD90 y CD105, y son capaces de diferenciarse a múltiples linajes como hueso y cartílago (Dominici *et al* 2006).

La médula ósea adulta contiene entre sus tipos celulares un grupo de células madre multipotentes definidas por Caplan en 1991 como células madre mesenquimales (MSCs). Poseen características propias de una célula madre como la división asimétrica que permite la la autorenovación poblacional y la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares dentro del linaje mesodérmico, entre los que se incluyen los tenocitos del tendón. Esta plasticidad celular hace que sean un foco de atención dentro de las terapias regenerativas para diferentes tipos de tejidos. Además a estas características propias de las MSCs hay que añadir que segregan un amplio espectro de macromoléculas

bioactivas que proporcionan tanto capacidades inmunomoduladoras como regenerativas en determinados microambientes de tejidos lesionados. La capacidad que tienen las MSCs de establecerse en el foco del tejido lesionado, y participar en la respuesta ante una lesión, mediante la secreción de factores paracrinos vía secreción de factores de crecimiento, citoquinas, mediadores antifibróticos o mediadores angiogénicos (Djouad *et al* 2009) o la activación de factores tróficos definen en gran medida el concepto de Medicina Regenerativa (Caplan *et al* 2007). Alexandre Friedenstein en 1976 fue el primero en describirlas en médula ósea, donde aislaron un conjunto de células precursoras de fibroblastos, que eran capaces de formar colonias discretas, unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F), capaces de formar hueso y cartílago.

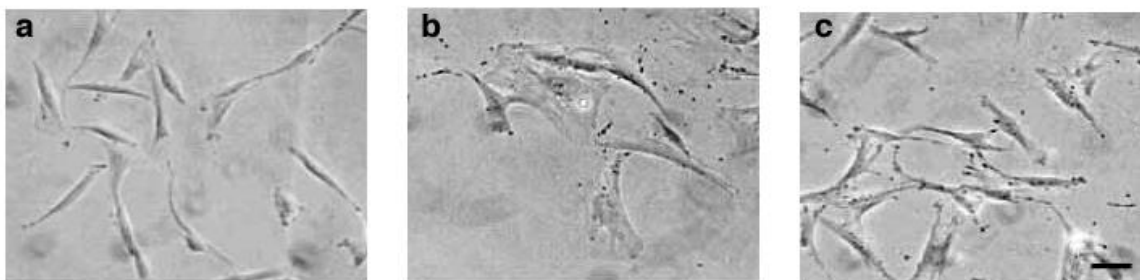
Además tradicionalmente las MSCs se definían por su capacidad de adherencia rápida al plástico. Después de la formación de colonias UCF-F adheridas al plástico de cultivo, las células no adheridas flotantes en el medio son descartadas con los cambios de medio, siendo éstas últimas en su mayoría células hematopoyéticas y células madre hematopoyéticas, que tienen una baja capacidad de adherencia al plástico de cultivo (Friedenstein *et al* 1987).

Estudios posteriores se han interesado también por el potencial de diferenciación de las MSCs y además por los mecanismos que regulan la diferenciación hacia un tipo celular concreto, como el hueso o el cartílago. En esta línea autores como (Pittenger *et al* 1999) mostraron que las células obtenidas por aspiración de médula ósea humana eran capaces de permanecer en un estado de no diferenciación cuando se cultivaban *in vitro* periodos largos de tiempo, y además se podía inducir la diferenciación de una sola célula de colonias aisladas, a células del linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico, si se cultivaban en un medio adecuado.

Otros autores como (Kurnetsov *et al* 1997) señalaron como al cultivar células estromales de médula ósea en un medio con suero, eran capaces de formar colonias de morfología fibroblástica en respuesta a factores como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor beta transformante de crecimiento (TGF-beta), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), o el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

## 1.9 POTENCIAL DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS MSCs

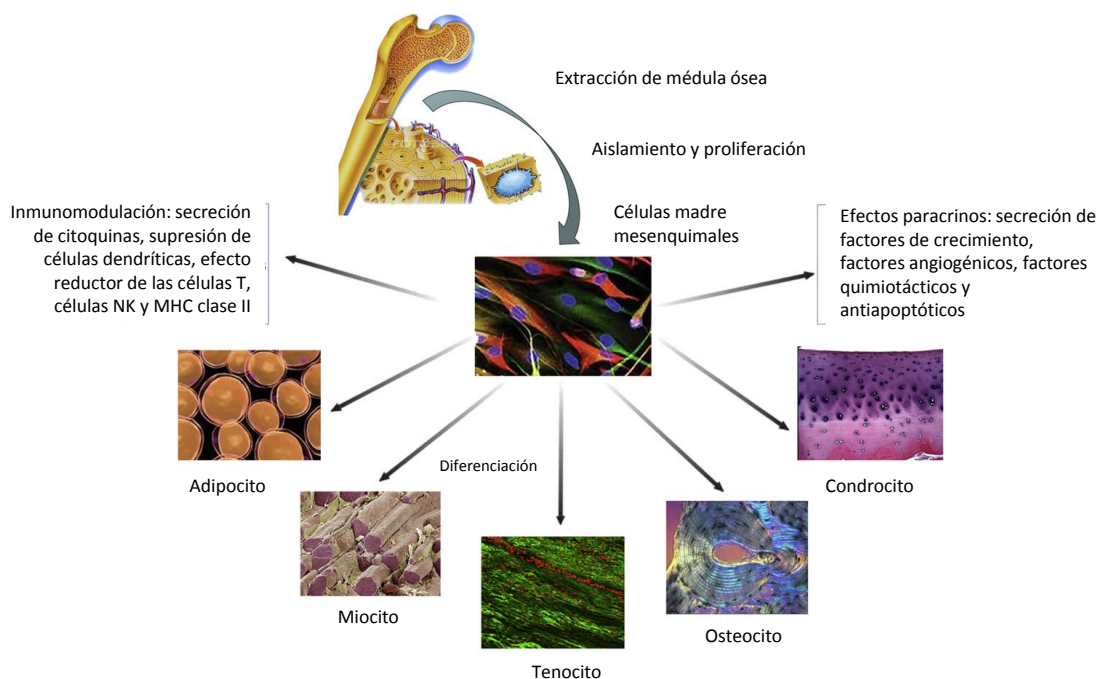
Uno de los principales atractivos de las MSCs reside en la posibilidad de su aislamiento de la médula ósea y su capacidad para proliferar rápidamente *in vitro*. Las MSCs desde el descubrimiento, se han clasificado como una población heterogénea tanto en términos de morfología, como de capacidad proliferativa y potencial de diferenciación. Por tanto a nivel clonal se pueden encontrar diferentes fenotipos: células alargadas fibroblásticas (células con forma de huso), células alargadas y aplanadas y células delgadas con forma de estrella (Muraglia *et al* 2000).



**Fig 9.** Tres fenotipos observados en colonias BMSCs: células con forma de huso (a), células con forma larga y aplanada (b) y células con forma de estrella (c) (Bar, 40mm) (adaptado de Muraglia *et al* 2000).

Las colonias derivadas de UCF-F, tienen tamaños y diámetros variados, indicando diferentes capacidades de proliferación o diferenciación. El potencial proliferativo de las células madre se puede aumentar gracias a distintos factores de crecimiento como EGF, PDGF y FGF-2 (Martín *et al* 1997). El aumento del potencial proliferativo de las MSCs lleva consigo una disminución en el potencial de diferenciación de las mismas, ayudando así al mantenimiento del número de células progenitoras en cultivo. Por ejemplo (Martín *et al* 1997) mostraron como FGF-2 disminuía la expresión de marcadores osteogénicos de diferenciación como la fosfatasa alcalina (ALP) en BMSCs en cultivo, las cuales aumentaron notablemente de tamaño.

Además de la capacidad proliferativa, las MSCs se han convertido realmente en un gran atractivo dentro de la Medicina Regenerativa gracias a su potencial de diferenciación hacia distintos tipos celulares dentro del linaje mesodérmico que como mínimo es el linaje condrocítico, adipogénico y osteogénico.



**Fig 10.** Esquema funcional de las MSCs. Imagen adaptada de (Nixon *et al* 2012).

## 1.10 AUTORENOVACIÓN, MIGRACIÓN Y FENÓMENO DE REPARACIÓN

Este proceso hace referencia a la ruta biológica y a los mecanismos que preservan las MSCs indiferenciadas, es decir, mantienen la población de células madre en estado potencial de célula madre. En este proceso intervienen distintos factores de crecimiento (Kolf *et al* 2007). Además en los procesos de autorenovación se ve implicada la ruta biológica de la WNT (Kleber *et al* 2004).

Las células madre adultas en sus respectivos nichos se autorenewan para mantener una población constante y a la vez también están disponibles para participar en la reparación y mantenimiento de tejidos. Un nicho está compuesto por tres componentes principales, el componente celular, la matriz extracelular y los espacios tridimensionales, y el componente matriz contiene todos los elementos necesarios para modular el “pool” de células madre. Además las células del nicho producen también factores paracrinos que junto con los factores generados por el microambiente local son reguladores imprescindibles de la función de las células madre (Scadden 2006). En este sentido, aunque la reparación de algunos tejidos está influenciada por la división de células diferenciadas en un estado post-mitótico del propio tejido, normalmente se requiere el envío de señales a las células madre o progenitoras para anidar o acudir en el lugar de la lesión y diferenciarse en el tipo celular necesario. Así las MSCs, además de tener su nicho principal en la médula ósea, son capaces de anidar en otros tejidos como el pulmón o los músculos (Francois *et al* 2006). Se ha visto que la capacidad de una MSC para anidar en otro tejido depende en parte de la expresión de Stro-1 (Bensidhoum *et al* 2004) y otros estudios demuestran *in vitro*, que la migración de las MSCs está regulada por el factor-1/CXCR4 derivado del estroma y por el complejo factor de crecimiento hepatocítico/c-Met (Son *et al* 2006).

## 1.11 FUNCIÓN DE LAS MSCs

Actualmente muchos estudios donde se aplican MSCs están basados sobre todo en las propiedad de plasticidad que tienen las MSCs, pero aún no existen estudios rigurosos sobre los mismos. (Caplan y Dennis 2006) al estudiar los resultados de la aplicación clínica de las MSCs en infartos cerebrales, lesiones cardíacas, y lesiones meniscales, no proporcionan datos de la función plástica de las MSCs, sino de la función trófica. Dicha función está fundamentada en los biofactores que producen estas células que hacen que en el lugar de la lesión haya un aumento de la fibrosis, apoptosis local, una promoción de la angiogénesis y además promueven a las células progenitoras del huésped a dividirse y diferenciarse.

Otros autores como (Boomsma *et al* 2012) comprobaron que las MSCs secretan factores que actúan de forma paracrina que promueven la angiogénesis, alteran la migración celular aumentándola e inhiben la apoptosis. Entre estos factores se encuentran la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y la MCP1 $\alpha$  son capaces de promover la migración celular de las MSCs y MCP-1 tiene un efecto protector de la apoptosis por reducción de la caspasa-3.

Todos estos factores hacen que el uso de las MSCs en la Medicina Regenerativa supongan un gran atractivo, al cual, hay que añadir otra característica importante, definida por su potencial inmunomodulador.

## 1.12 FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS MSCs

Las MSCs son capaces de modular la respuesta inmune. La inmunosupresión mediada por las MSCs requiere una activación preliminar de las propias MSCs por las células del sistema inmune, mediante la secreción de la citoquina proinflamatoria INF $\gamma$ , sola o conjugada con TNF $\alpha$ , IL- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (Krampera *et al* 2006; Ren *et al* 2008; Groh

*et al* 2005; Le Blanc *et al* 2003). Especialmente este paso de activación por INF $\gamma$ , se ha visto in vivo en un modelo de enfermedad injerto contra huésped (Polchert *et al* 2008), e incluso se ha visto su importancia en MSC de ratones deficientes en INF $\gamma$ , que no presentaban actividad inmunosupresiva (Ren *et al* 2008).

Las MSCs humanas adultas expresan niveles intermedios del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y HLA clase I, y MHC-HLA de clase II ni moléculas coestimuladoras como CD80 (B7-1), CD 86 (B7-2), CD40. Gracias a todas estas características las MSCs muestran una hipoinmunogenicidad (klyushnenkova *et al* 2005). Los mecanismos exactos de esta inmunomodulación todavía son desconocidos puesto que intervienen diversos elementos como el contacto celular, y los factores solubles como la producción de la indoleamina 2,3 – dioxigenasa (IDO), TGF- $\beta$ 1, la producción de la PGE2, producción del NO, factor de crecimiento de hepatocitos, y la síntesis de citoquinas (Dennis *et al* 2002; kolf *et al* 2007; Meisel *et al* 2004; Jorgensen *et al* 2008).

Las MSC inducen la inhibición de los LTs (CD4-CD8) de manera eficiente sin llevarlos a apoptosis (Angoulvant *et al* 2004; Bartholomew *et al* 2002; Di Nicola *et al* 2002; Klyushnenkova *et al* 2005; Krampera *et al* 2003), la inhibición de la proliferación linfocítica inducida por mitógenos asociados a la célula B o linfocito B, permaneciendo la proliferación del linfocito B secuestrada en fase G0/G1 del ciclo celular sin generar apoptosis (Augello *et al* 2005; Glennie *et al* 2005; Comoli *et al* 2008), y sus efectos sobre las Células presentadoras de antígeno juega un papel importante en la inhibición de la célula T (Groh *et al* 2005; Nauta *et al* 2006).

## 1.13 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LESIONES CRÓNICAS DEL TENDÓN SE

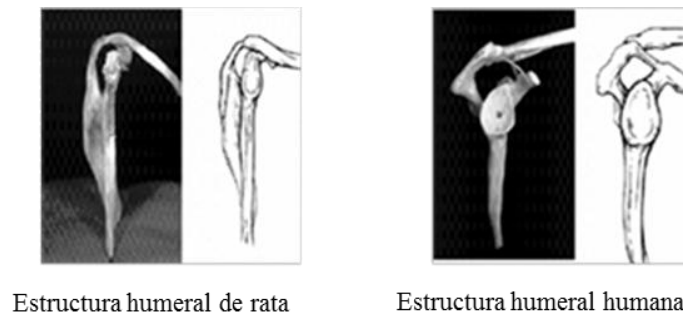
Para poder investigar la eficacia, seguridad y mecanismos de acción de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, son necesarios modelos animales como primera vía traslacional (Derwin *et al* 2010).

Según este estudio los rasgos principales que se buscan en un modelo animal de lesión crónica de hombro serían:

- Similitud anatómica y funcional con el hombro humano.
- Posibilidad de establecer una lesión crónica.
- Tamaño del tendón suficiente para ensayar las mismas técnicas reparadoras utilizadas en el caso humano.
- Incidencia de re-rotura en un porcentaje amplio de sujetos.
- Ausencia de recuperación espontánea del tendón o formación de cicatriz sin tratamiento.
- Capacidad de medida de resultados clínicos (resultados de biomecánica e histología).

En primates evolucionados y en algún marsupial (el “Ualabi” o canguro rojo) se ha encontrado un manguito rotador similar al humano. Esta similitud apoya la teoría de que la aparición del manguito rotador en el proceso evolutivo es paralela al desarrollo anatómico para la adaptación a la actividad aérea. Estos animales utilizan la extremidad anterior en su vida cotidiana para poder balancearse y pasar de un árbol a otro desde el plano sagital (Sonnabend y Young 2009). Pero el uso de primates evolucionados o marsupiales tiene una implicación ética muy importante, que hace que se desestimen como modelo animal.

El modelo de rata desarrollado por Solowsky *et al*, está considerado como el mejor debido a las grandes similitudes anatómicas y funcionales con el hombro humano, donde se aprecia que el acromion de la rata se proyecta anteriormente desde la cabeza humeral hasta la clavícula, creando un arco cerrado sobre el tendón supraespinoso. Entonces cuando la rata corre, excava, llega por encima de la cabeza (por ejemplo para comer), el tendón supraespinoso discurre bajo el arco acromial, similar al hombro humano, y este movimiento repetitivo, hace que el tendón supraespinoso de la rata pueda desarrollar lesiones parecidas a las ocurridas en el hombre (Soslowsky *et al* 1996). Por eso este modelo es ideal para el estudio de la reparación de las lesiones crónicas del tendón supraespinoso que cursan con desgarramiento completo.



**Fig 11.** Comparativa anatómica del hombro humano y el hombro de rata. Vista lateral. Imagen adaptada de (Soslowsky *et al* 2000).

A grandes rasgos, dada la necesidad de mejorar el tratamiento de las lesiones crónicas con rotura del tendón SE, la Terapia Regenerativa puede ofrecer un marco idóneo para investigar nuevas alternativas, que mediante el empleo de MSCs puedan producir cambios en el proceso reparativo, que propicien la recuperación de este tipo de lesiones.

# **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Las lesiones del manguito rotador se consideran la causa principal del hombro doloroso, y las roturas del tendón supraespinoso en concreto, concentran un gran porcentaje de re-rotura postquirúrgica, a pesar de los nuevos avances tanto en la técnica artroscópica, o en la cirugía abierta clásica, como en el empleo de diferentes suturas. Recientemente se han abierto nuevas puertas hacia la reparación de este tipo de lesiones, gracias a los avances en la ingeniería de tejidos, enmarcados en el campo de la Terapia Regenerativa, al cual este estudio debe su principal inspiración.

Por tanto la hipótesis de este estudio es la siguiente:

*“El uso de MSCs dentro de la Terapia Regenerativa, proporcionan una ayuda eficaz en el proceso de reparación tisular de las lesiones crónicas con rotura total del tendón supraespinoso”*

Para abordar esta hipótesis, los objetivos a cumplir serían:

1. Desarrollo de un modelo de lesión crónica del tendón supraespinoso.
2. Validar dicho modelo mediante estudios biomecánicos (carga máxima, rigidez y deformación) e histológicos (organización fibrilar, celularidad y vascularidad).
3. Comparativa de tres estrategias reparadoras (sutura, membrana OrthADAPT®, y membrana OrthADAPT® con MSCs alogénicas) en distintos tiempos de reparación (uno, dos y tres meses), mediante criterios biomecánicos (carga máxima, rigidez y deformación), histológicos (organización fibrilar, celularidad, vascularidad), e inmunohistoquímicos (presencia de colágeno tipo I y tipo III).
4. Este estudio quiere poner de manifiesto si el empleo de MSCs es seguro y que resultados proporciona, teniendo en cuenta que la única manipulación importante es la expansión en cultivo, frente a otros estudios donde se estimulan las MSCs con factores de crecimiento, sobretodo.



# **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### **3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO**

Para reproducir en la medida de lo posible las condiciones reales observadas en pacientes afectados por este tipo de lesiones, se desarrolló un modelo de lesión-reparación animal, donde se tuvieron en cuenta aspectos relevantes como la edad, puesto que es un tipo de lesión asociada al envejecimiento, y la situación clínica debido a que existe una cronicidad de la lesión.

En este estudio se emplearon un total de 120 ratas Sprague-Dawley machos y hembras de 9 meses de edad, que es la edad equivalente a la edad avanzada humana. Los pesos estaban comprendidos entre 400-600g, y procedían de los laboratorios Charles River.

La realización de este estudio se aprobó de forma favorable por la Comisión de Ética y Bienestar Animal del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. También se remitió una comunicación escrita de este estudio a la Sección de Protección Animal de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid.

Para la realización de este estudio se utilizaron los quirófanos del Animalario del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (número de registro ES280790000088).

De forma general el diseño del estudio englobó un total de 30 ratas que se utilizaron para desarrollar el modelo de lesión crónica del tendón SE y comprobar la existencia de dicha lesión. De forma similar un total de 90 ratas se utilizaron para explorar las diferentes estrategias terapéuticas de reparación (30 por grupo de reparación) sobre el modelo de lesión crónica ya definido.

### **3.2 ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN**

Los animales del estudio se mantuvieron en el estabulario del Hospital Clínico San Carlos en las condiciones exigidas en el RD 1201/2005 en materia de protección de

animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. El cumplimiento de estas exigencias estuvo a cargo del personal veterinario del Animalario del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, quienes elaboraron eficazmente un protocolo de supervisión de los animales siguiendo las directrices propuestas por David Morton, que incluyeron los aspectos siguientes:

- REDUCCIÓN: Se limitaron el número de animales haciendo un cuidadoso diseño de los grupos.
- REFINAMIENTO: Se utilizaron técnicas mínimamente invasivas, como la técnica de microcirugía.
- REEMPLAZAMIENTO: No existe actualmente otro modelo inanimado que pueda aportar la información obtenida del desarrollo de estas técnicas de lesión y reparación.

### **3.2.1 Eutanasia y técnica de extracción de las piezas escápulo-humerales**

Para poder extraer las piezas escapulo-humerales los animales se eutanasiaron en una caja cerrada herméticamente y creándose una atmósfera de CO<sub>2</sub>. Se extrajeron las piezas escápulo-humerales del estudio mediante la siguiente técnica:

Se comenzó por un abordaje quirúrgico con disección y desinserción del músculo deltoides, seguido de una luxación acromioclavicular con desinserción del tendón y músculo subescapular, infraespinoso, redondo mayor y menor de la escápula, así como de toda la musculatura y tejido para escapular. Con esto se consigue dejar íntegramente el músculo supraespinoso y su tendón objeto de este estudio en todo su recorrido hasta su inserción en la parte superior del troquíter humeral. Por otro lado se procede a la desinserción de toda la musculatura perihumeral y ligamentos que conforman el codo. Por tanto la pieza está definida por la articulación escapulo-humeral,

músculo supraespinoso y tendón SE con todo su recorrido. Estas piezas están destinadas al estudio Biomecánico, histológico e inmunohistoquímico que conforman este estudio.



**Fig 12.** Pieza escápulo-humeral.

### **3.2.2 Protocolo de anestesia y analgesia**

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia general y analgesia sobre una manta térmica. Para ello se administró como anestésico Medetomidina 0,3mg/Kg I.P (Domtor®, Pfizer, Madrid, España) y Fentanilo 0,3mg/Kg I.P (Fentanest®, CERN Pharm, Barcelona). Luego se procedió a una entubación orotraqueal con un Abbocath de 14G y se ventiló con un ventilador mecánico Datex-Ohmeda. El mantenimiento anestésico se realizó con Isoflourano al 2% (Isoflo®; Esteve, Barcelona, España). (Fluothane® Astrazeneca farmaceutica España, S.A).

Todos los animales operados, en el postoperatorio se mantuvieron con el antibiotico Enrofloxacino 5mg/Kg/24h s.c (Baytril 2,5%®), con el antiinflamatorio Meloxicam 0,3mg/Kg/24h s.c (Metacam® Boehringer Igelheim, Alemania), el analgésico buprenorfina 0.1mg/Kg/12h s.c (Buprex®, Schering-Plough, Madrid) y Metamizol Magnésico 25mg/Kg/12h s.c (Nolotil®, Boehringer Igelheim, Alemania) durante tres días. Los animales en sus jaulas tenían libre movilidad de sus miembros locomotores.



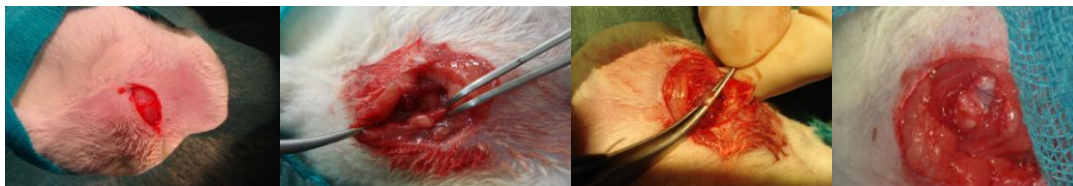
**Fig 13.** Rata en su jaula. Imagen propia del estudio.

### **3.3 DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL DE LESIÓN CRÓNICA DEL MANGUITO ROTADOR**

La técnica quirúrgica consistió en una incisión cutánea de 2 cm en la zona superolateral de la articulación escápulo-humeral con un bisturí del número 11, seguido de una disección del tejido subcutáneo y graso existente. A continuación se seccionó el músculo deltoides anterior, lateral y posterior de su inserción en el acromion y la clavícula, produciéndose una retracción del mismo de 1cm, apreciándose el tendón SE en su recorrido por debajo del arco acromioclavicular. Para apreciar mejor la zona, se realizó una rotación externa humeral y mediante bursectomía se disecó hasta tener claramente delimitados el borde anterior y posterior del tendón SE que queda definido por los tendones de la porción larga de biceps (que marca el límite anterior) y el tendón infraespinoso (que marcaría el límite posterior). Con la punta de un bisturí del nº 11 se seccionó el tendón SE (que se marcó con una sutura Prolene 5-0) de manera perpendicular al eje mayor en la zona de su inserción en el troquíter, desbridando a su vez los restos del mismo incluido el fibrocartílago de la zona de inserción. Se tuvo especial cuidado en mantener intactos el resto de los tendones y las estructuras de la

articulación escápulo-humeral. Finalmente, se reinsertó de nuevo con sutura Vicryl 5-0 el músculo deltoideos a la zona acromio-clavicular, seguido de la reinserción del músculo trapecio, suturando eficazmente el tejido conjuntivo y la piel del animal con puntos de sutura simple. En ningún momento se procedió a la inmovilización de la zona operada, los animales estaban en sus jaulas con todas sus extremidades libres.

Los animales se eutanasiaron al mes (n=10), a los 2 meses (n=10), a los 3 meses (n=10) y se extrajeron las piezas escápulo-humerales tal y como se explica en el apartado 3.2.1. La mitad de las ratas en cada grupo (n=5) se emplearon para el análisis biomecánico y la otra mitad (n=5) para la evaluación histológica, en los diferentes puntos del estudio (1, 2 y 3 meses desde la provocación de la lesión del tendón SE).



**Fig 14.** Desarrollo quirúrgico del modelo de lesión crónica.

### **3.4 DIFERENTES ESTRATÉGIAS REPARADORAS PARA LA LESIÓN CRÓNICA DESARROLLADA EN EL MODELO ANIMAL**

En el estudio se van a comparar tres estrategias diferentes para intentar reparar la lesión crónica desarrollada en el tendón SE. Para ello se emplearon para cada estrategia 30 ratas:

- Estrategia mediante procedimiento quirúrgico utilizando sutura (Prolene® 6/0). Se realizó la inserción del tendón SE mediante túnel transóseo humeral con un hilo de sutura Prolene® 6/0 simulando la cirugía convencional realizada sobre este tipo de lesiones.

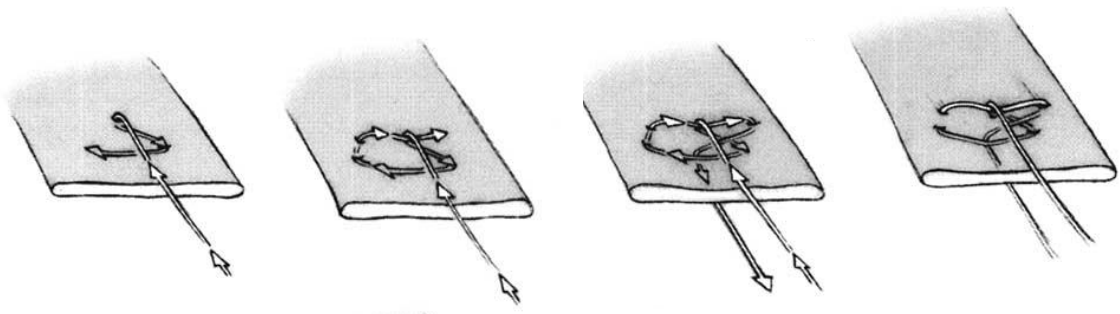
- Estrategia mediante procedimiento quirúrgico usando una membrana comercial de colágeno tipo I (OrthADAPT® (Bioimplant Pegasus Biologics, Inc)) autorizada para uso humano. Esta matriz quirúrgica que se utilizó para unir el tejido tendinoso a la cabeza humeral mediante puntos de sutura simples.
- Estrategia mediante procedimiento quirúrgico usando una membrana comercial de colágeno tipo I (OrthADAPT® (Bioimplant Pegasus Biologics, Inc)) autorizada para uso humano donde se ha sembrado previamente  $1 \times 10^6$  MSCs alogénicas de ratas de la misma edad. Después se procedió a la cirugía reparadora exactamente igual que la estrategia solo con la matriz OrthADAPT.

En todas las estrategias se seccionó el tendón SE tal y como se describe en el apartado 3.3 y al mes de haberse producido esta lesión crónica, se procedió a su reparación mediante estas estrategias reparadoras. Las ratas se eutanasiaron a un mes (n=30), dos meses (n=30) y tres meses (n=30) después de la segunda cirugía y se extrajeron las piezas escápulo-humerales tal y como se describe en el apartado 3.2.1. Para cada alternativa quirúrgica se emplearon 15 piezas para realizar el análisis biomecánico y otras 15 para el estudio histológico.

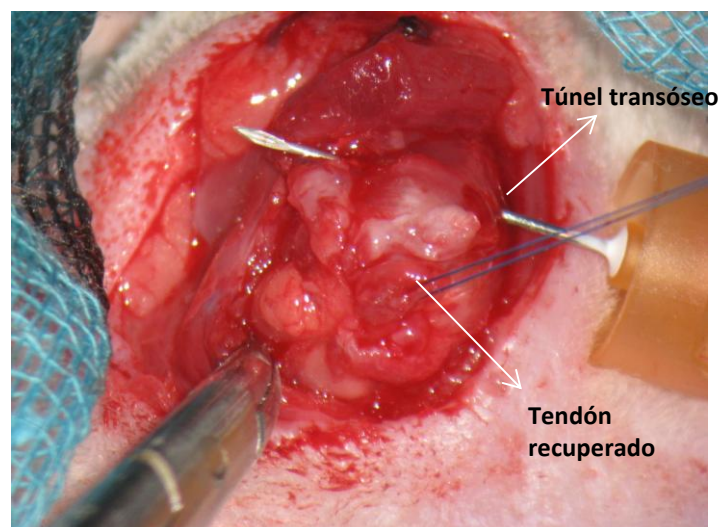
### **3.4.1 Modelo de Lesión Crónica y Reparación con sutura Prolene® 6/0**

La técnica quirúrgica consistió en una incisión cutánea de 2 cm en la zona superolateral de la articulación escápulo-humeral con un bisturí del número 11, seguido de una disección del tejido subcutáneo y graso existente. A continuación se seccionó el músculo deltoides anterior, lateral y posterior de su inserción en el acromion y la clavícula, produciéndose una retracción del mismo de 1cm. En este punto se apreciaba un infiltrado inflamatorio rodeado de un plastrón cicatricial. Mediante bursectomía se

recuperó el tendón SE embebido en el plastrón, con una pinza quirúrgica, junto con restos de tejido cicatricial. Con ayuda de un bisturí del número 11 se resecó del troquíter los restos cicatriciales del plastrón. Posteriormente se procedió mediante un túnel transóseo realizado con una taladradora (Dremel®, Alemania) a pasar una sutura no reabsorbible Prolene® 6/0 intratendinosa mediante la técnica Mason-Allen para reparar el tendón SE. Así se aproximó el extremo distal del tendón a su zona de inserción, dejándolo unido al troquíter. Luego se tensó bien el hilo para garantizar una buena adaptación del tendón al troquíter. Por último se anudó la sutura y se procedió al cierre quirúrgico por planos como se describe en el apartado 3.3.



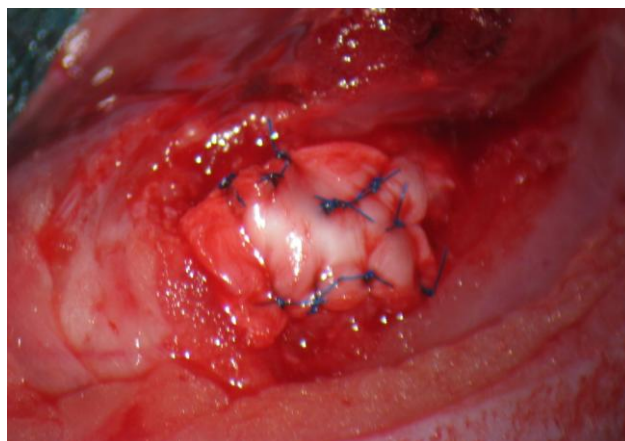
**Fig 15.** Detalle del desarrollo de la técnica Mason-Allen (Scheibel *et al* 2003).



**Fig 16.** Túnel transóseo y sutura Mason-Allen del tendón recuperado.

### **3.4.2 Modelo de Lesión Crónica y Reparación con membrana comercial de colágeno tipo I con y sin MSCs**

El procedimiento quirúrgico se realizó exactamente igual que en el apartado 3.4 pero una vez realizada la sutura tendinosa con Prolene® 6/0 se colocó encima una matriz de OrthADAPT® de 3-4mm de ancho por 3-4mm con o sin células sembradas según proceda, y se suturó con puntos simples alrededor con sutura no reabsorbible Polipropileno 7/0 (Prolene® 7/0 Ethicon, New Jersey, USA). Se comenzó a suturar por el centro y se continuó por los laterales de la matriz en el sentido de las agujas del reloj.



**Fig 17.** Reparación con membrana OrthADAPT®.

## **3.5 PREPARACIÓN DE MSCs EN LA MEMBRANA OrthADAPT®**

### **3.5.1 Extracción de fémures**

Las MSCs se obtuvieron del canal femoral de ratas, machos y hembras, de 9 meses de edad. Para ello primero se extrajeron los fémures de las ratas eutanasiadas según el apartado 3.2.2 en una campana de extracción mediante excisión quirúrgica cutánea de 4 cm desde la zona superolateral de la articulación coxofemoral hasta la zona condilar distal del fémur. A continuación se seccionaron y disecaron toda la zona

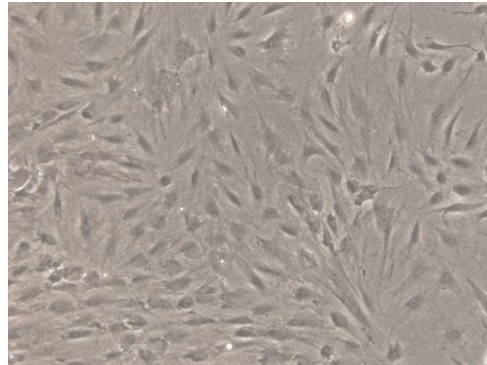
muscular (cuadriceps, isquiotibiales, flexores de cadera y aductores) hasta quedar expuesto el tejido óseo femoral en toda su extensión. Después se procedió a su extracción forzando la rotación externa de cadera y con ayuda del bisturí del número 11 seccionando toda la zona tendinosa de la unión acetabular y patelar. A continuación cada fémur se limpió cuidadosamente eliminando todo el tejido adherente, con ayuda de un bisturí del número 11 y gasas estériles empapadas en etanol 100% (Merck España). Como último paso se lavaron cuidadosamente en suero fisiológico estéril y se depositaron en una placa petri estéril de 100-mm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA), para proceder a la extracción de la médula ósea en una cabina de flujo laminar Bio-II A modelo AV-100 (Telstar).

### **3.5.2 Obtención de las MSCs**

Una vez extraídos los fémures, se practicó una osteotomía al hueso y con ayuda de una jeringa con 5 ml medio de cultivo insertada en un ABOCAT, se procedió a la extracción de toda la médula ósea en la placa Petri estéril. Posteriormente se introdujo todo el medio de cultivo con la médula ósea en un tubo de tipo Falcon de 15 ml y se añadieron 5ml más de medio de cultivo. Se centrifugó el tubo 1500 rpm 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se cultivó en placas de 100-mm de diámetro con medio de cultivo LG-DMEM (low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Paisley, UK)) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), 2mM de glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), 0,01% de estreptomina y 0,06% de penicilina G (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Los cultivos primarios se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, con cambios de medio completo cada 2 ó 3 días, seleccionando los clones de

MSCs por su adherencia al plástico. La morfología de estas células era fibroblastoide o forma de huso mayoritariamente cuando se adherían al plástico, examinadas en contraste de fases al microscopio óptico (Leica DMI 4000B®, Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España).



**Fig 18.** Morfología típica fibroblastoide de las MSCs en confluencia. Imagen propia del estudio tomada a 200 aumentos.

Los clones aislados con el uso de esta técnica dan lugar a células con forma fibroblastoide y otros autores han comprobado que son capaces de tener una diferenciación multipotencial (Pittinger *et al* 1999).

### **3.5.3 Preparación de la membrana de colágeno tipo I con las MSCs**

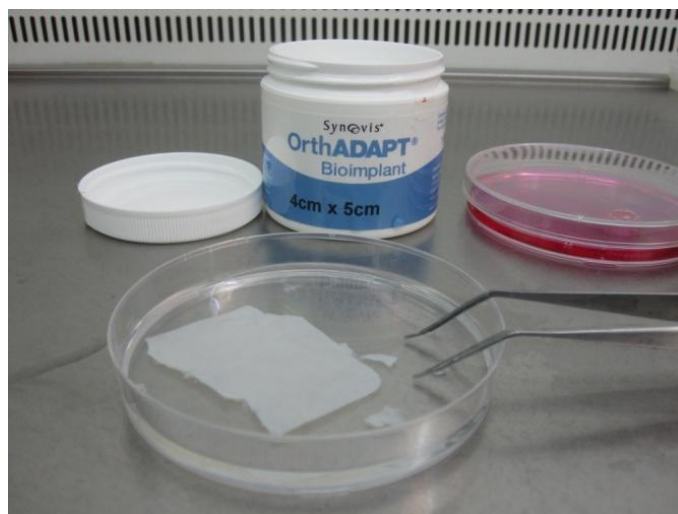
Cuando los cultivos llegaron a la confluencia, las células se levantaron con tripsina al 0,25% más 1mM EDTA (Gibco BRL Life Technologies, Inc.) durante 5 minutos a 37°C. Se recogen en un tubo 15ml con FBS para neutralizar la acción enzimática de la tripsina, se centrifuga, se descarta el sobrenante y se resuspende el sedimento celular en 1ml de medio completo. A continuación se cuentan las células determinando su viabilidad mediante el ensayo de exclusión por Azul Tripán: el colorante azul tripán sólo puede penetrar y teñir las células muertas o con la membrana celular dañada, lo que permite la diferenciación entre células viables e inviables

mediante la simple observación bajo el microscopio. La concentración de células viables (no teñidas) se determina mediante el uso de una cámara de contaje celular (cámara de Neubauer). Para este ensayo se requiere la toma de un volumen mínimo de suspensión celular (10  $\mu$ l) y sigue el siguiente esquema:

- Extraer una pequeña alícuota de 20  $\mu$ L y colocarla en un tubo tipo eppendorf
- Preparar un tubo eppendorf con 90  $\mu$ L de azul tripan (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y añadir 10  $\mu$ L de muestra celular.
- Resuspender las células y colocar 10  $\mu$ L de la suspensión en la cámara de Neubauer y contar al microscopio óptico, seleccionando un cuadrante. Para tener el número de células se ejecuta la siguiente ecuación:

$N^{\circ} \text{ Cel/mL} = N \text{ Células} \times Fd \times 10000 / N^{\circ} \text{ cuadrantes}$ , donde Fd es el factor de dilución

Una vez contadas las MSCs, se prepararon las alícuotas resuspendiendo  $1 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ l de suero salino. La membrana se re-hidrató en condiciones estériles según las instrucciones del fabricante, y se cortaron piezas de 3mm de membrana de colágeno tipo I en condiciones estériles. Se depositaron  $1 \times 10^6$  células en la membrana durante cinco minutos, antes del evento quirúrgico.



**Fig 19.** Representación de la preparación de la membrana OrthADAPT®.

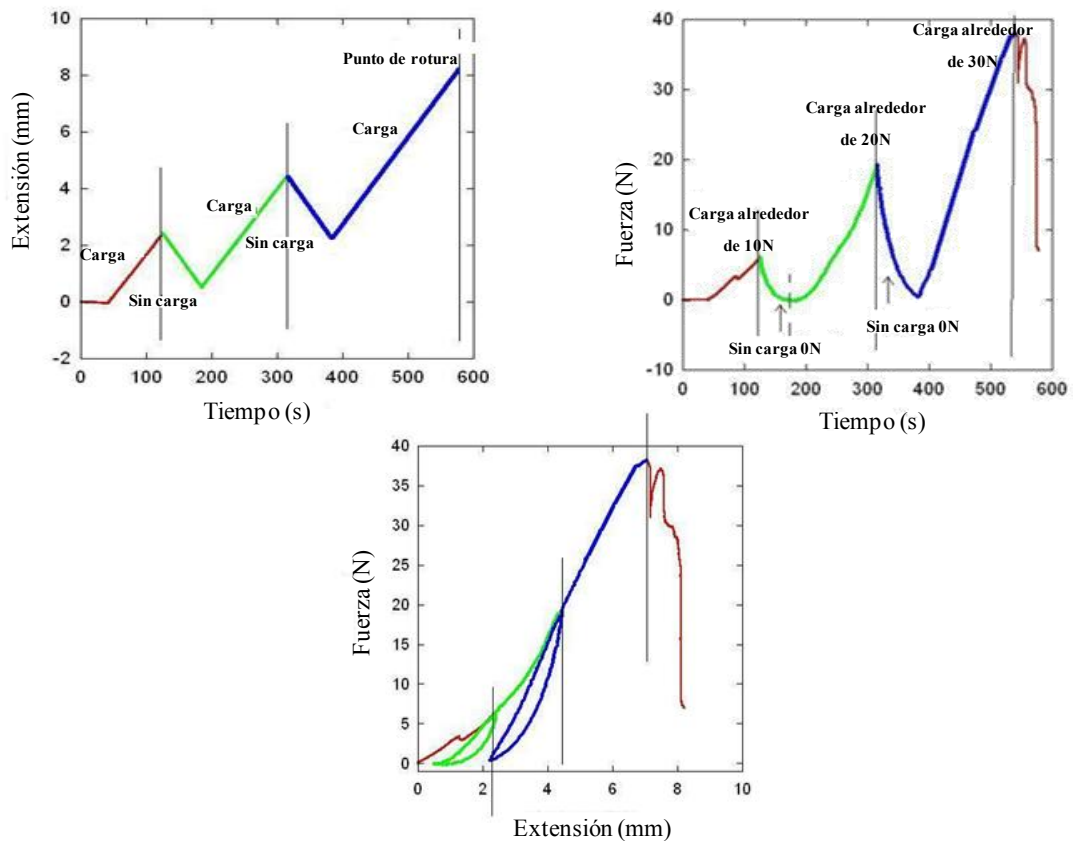
### 3.6 ANÁLISIS BIOMECÁNICO

El estudio biomecánico se llevó a cabo en el grupo GBMB-UPM, Grupo de Biomateriales y Materiales Biológicos-UPM (Universidad Politécnica de Madrid - E.T.S.I. de Caminos, Canales y Puertos)-Departamento de Física.

Las piezas húmero-escápula obtenidas para este análisis se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su ensayo. Para el estudio biomecánico, las piezas se embebieron fuertemente en una resina elástica epoxi (Araldit Rápido – Ceys®), de modo que húmero y escápula formaban un ángulo de  $90^{\circ}$ . Para preparar la resina, se mezcló en proporciones iguales (50%/50%) dos especies de pegamento-Araldit. Se prepararon dos tubos para el ensayo, uno pequeño de silicona de 15mm de diámetro para el húmero y otro mayor de polipropileno de 25mm de diámetro para la escápula. En un extremo de cada tubo se puso un material inorgánico de alta rugosidad para evitar los deslizamientos. Luego la resina se introdujo en el tubo pequeño y se embebió el húmero de la pieza preservando el ángulo de  $90^{\circ}$  fisiológico natural del tendón. Igualmente se preparó la resina de un tubo de mayor tamaño donde se embebió la parte escapular de la pieza. Así se consiguió una inclusión fuerte que evitaría el deslizamiento de las piezas durante el ensayo de tracción. Además para reforzar, la resina se fijó a la muestra en ambos extremos mediante el uso de “superglue”. Los tendones se envolvieron en una gasa con suero fisiológico para protegerlos.

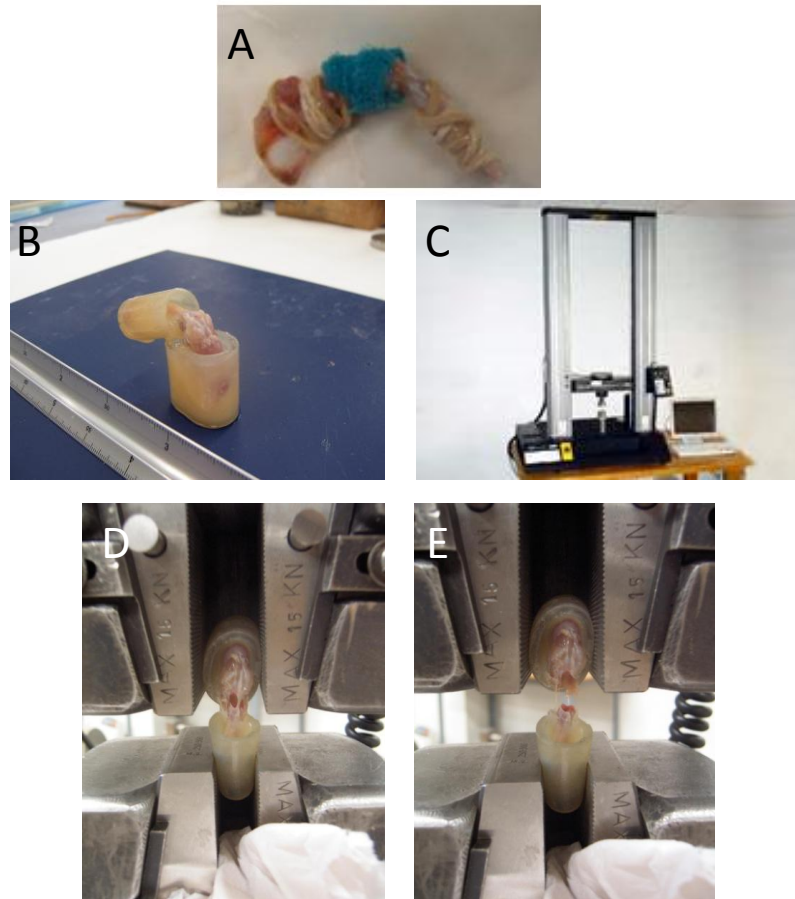
El análisis se hizo en paralelo según el eje del tendón SE en su posición fisiológica, en un aparato Instron 5866. La velocidad del ensayo aumentó hasta 1,8 mm/min. Durante el ensayo las piezas se sometieron a una fuerza de carga de 10 Newtons (N) para ratas de 451-600g y 5 Newtons (N) para ratas con peso comprendido entre 300-450g. Posteriormente se descargaron a la posición inicial y luego se sometieron de nuevo a carga hasta rotura. Cada 10 milisegundos, a través de un

software específico, se registraron los datos de fallo (N) y de desplazamiento (deformación) hasta el punto de rotura (mm) obteniéndose unos gráficos con la progresión del proceso tal y como se muestra en la figura 20.



**Fig 20.** Representación gráfica tipo de las medidas registradas con el aparato Instron 5866, para determinar los parámetros biomecánicos de carga máxima y elongación, durante el ensayo de una pieza escápulo-humeral.

El fallo o carga máxima se definió como el valor máximo de carga necesario expresado en Newton para producir la rotura del tendón (SE) de forma permanente. El parámetro rigidez es una estimación y se definió como la pendiente de la carga máxima dividida por el desplazamiento del tendón en el punto de rotura.



**Fig 21.** Pieza preparada para montaje en resina (A). Pieza incluida en resina (B). Aparato Instron 5866 (C). Colocación de la pieza montada en el aparato Instron (D). Ensayo de carga (E).

## 3.7 ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

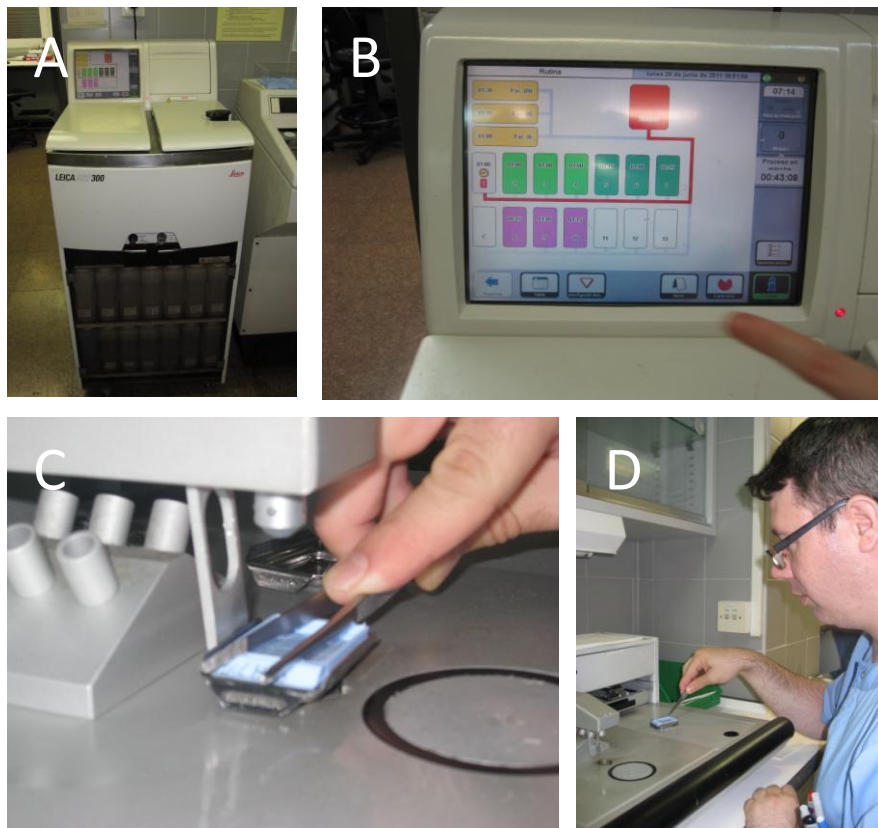
### 3.7.1 Procesamiento decalcificación e inclusión en parafina

Las piezas escapulohumerales destinadas al estudio histológico se fijaron en primer lugar con formaldehído 4% p/v (Química Clínica Aplicada S.A, Amposta, España) estabilizado a pH 7, durante dos días. Posteriormente se sometieron a un proceso de decalcificación con una solución decalcificante (Cal-Rite, Richard-Allan-Scientific, Campus Drive, Kalamazoo) que contiene entre sus componentes ácido fórmico, formaldehido y metanol durante 10-12 días.

Al finalizar este proceso y comprobando una correcta decalcificación de las piezas, se pasó al tallado de las mismas cortándolas en sus extremos cuidadosamente

para que cupiesen en los “cassettes” de inclusión en parafina, se lavaron con agua desionizada, se incluyeron en los “cassettes” de inclusión en parafina y se deshidrataron en un procesador automático Leica ASP 300 durante 3 horas y 45 minutos , el cual utiliza concentraciones crecientes de etanol de 70°, 96° y 100°, terminando en lavados de xilol.

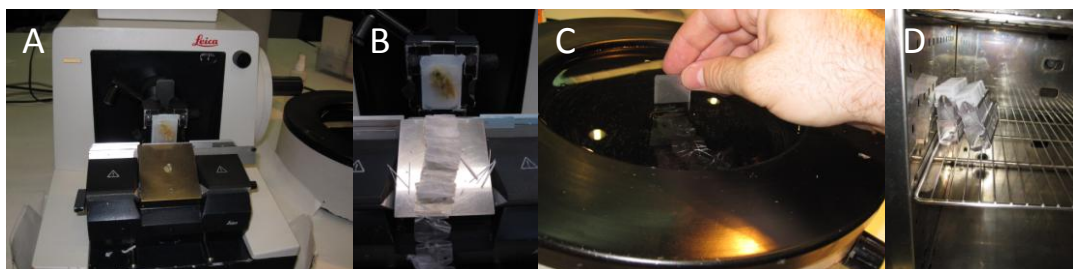
Las piezas se montaron en un molde metálico mediante inclusión en parafina en un parafinero PEC 3003-D (Tesda) con placa a 60°C, y posteriormente se enfriaron en placa de hielo. Posteriormente se desmoldaron, y se almacenaron para ser cortados.



**Fig 22.** Imágenes del procesador automático Leica ASP 300 (A, B). Montaje de piezas en parafina en parafinero PEC 3003-D (Tesda) (C, D).

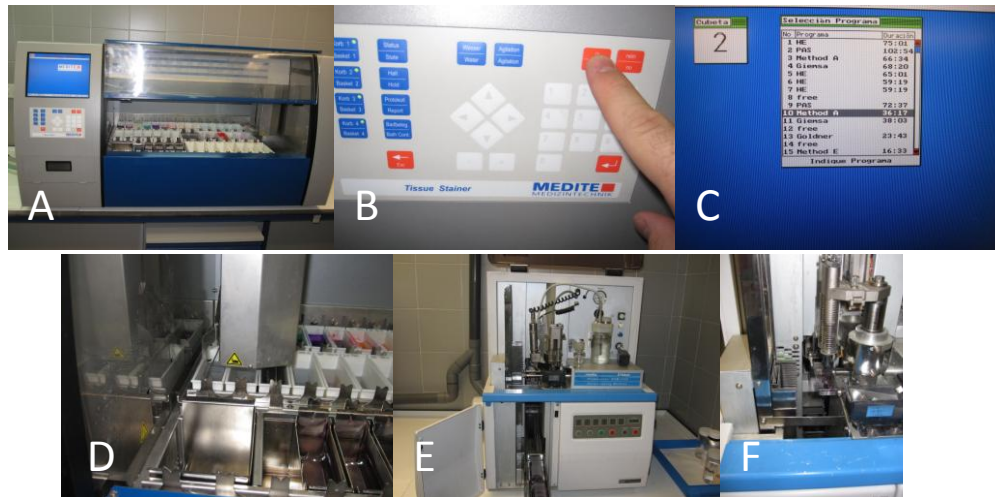
### 3.7.2 Preparación de los cortes histológicos para tinción Hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson

De cada bloque se hicieron treinta secciones histológicas longitudinales consecutivas de 4  $\mu\text{m}$  de grosor en micrótopo Leica Jung RM2055 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania). Las secciones se montaron sobre portaobjetos (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Alemania) en baño de agua caliente y secados al aire. Posteriormente se desparafinaron en estufa a 70°C.



**Fig 23.** Corte del bloque en microtomo Leica Jung RM2055 (A, B). Montaje de corte en baño (C). Desparafinación en estufa (D).

Posteriormente se realizaron sobre los cortes las tinciones de Tricrómico de Mason y Hematoxilina-eosina en un teñidor automático (Tissue Stainer TS44C, Medite Medizintechnik, Alemania), seleccionando el programa de tinción adecuado. Al finalizar, los portaobjetos se montaron con cubreobjetos 24 x 60 mm (Menzel-Gläser, Alemania) en un montador automático (Promounter® RCM 2000, Medite Meisei, Alemania).



**Fig 24.** Teñidor automático Tissue Stainer TS44C (A). Selección del programa de tinción (B,C). Proceso de tinción automática (D). Montaje en montador automático Promounter® RCM 2000.

### 3.7.3 Protocolos de tinción y valoración microscópica

#### 3.7.3.1 Tinción hematoxilina-eosina

Es una tinción básica que sirve para ver sobre todo estructuras celulares, por lo que en este estudio se ha empleado para ver la celularidad existente. La hematoxilina tiñe el núcleo celular de azul más o menos intenso. Como contratinción se utiliza la eosina, un colorante débilmente ácido que colorea el citoplasma, el tejido conjuntivo y las fibras de colágeno de un color rosado.

Se utilizó el protocolo del teñidor automático donde se sumergían los cortes histológicos en hematoxilina de Carazzi (Química Clínica Aplicada S.A, Amposta, España) durante 15 minutos, en baño de agua 15 minutos y en eosina (Merck, Dramstadt, Alemania) durante 30 segundos. Más detalladamente, los portaobjetos con los cortes desparafinados pasan por los siguientes pasos: Xilol 2 x 3'. Xilol 1 x 4'. Etanol 100° 2 x 1'. Etanol 96° 2 x 1'. Agua destilada 4'. Hematoxilina de Carazzi 15'. Agua destilada 15'. Eosina 30''. Etanol 96° 2 x 1'. Etanol 100° 2 x 30''. Xilol 3'. Montaje automático en Eukitt® (O. Kindler GmbH, Ziegelhofstrabe, Freiburg).

### **3.7.3.2 Tinción Tricrómico de Masson**

Con la tinción Tricrómico de Masson se aprecia una buena visualización y estudio de las fibras colágenas que forman haces. Se llama Tricrómico porque utiliza tres colorantes distintos. La tinción más común utiliza hematoxilina, azul de anilina y fucsina, pero existen variaciones como la empleada en este estudio. Así la Hematoxilina nos permite apreciar los núcleos celulares en color morado o marrón, el Verde Luz nos ofrecería la tinción azul del tejido conjuntivo, sobre todo de los haces de fibras colágenas y el Rojo Mallory nos teñiría de color rojo estructuras oxidadas, empaquetamientos muy fuertes de haces y el tejido muscular. Esta técnica ya ha sido empleada previamente para el estudio de cicatrización del tendón (Casalechi *et al* 2009; Lyras *et al* 2009a).

Se utilizó el protocolo del teñidor automático donde se sumergían los cortes histológicos en hematoxilina de Harris (Merck, Dramstadt, Alemania) durante 2 minutos, en el reactivo uno (ácido fosfomólico 1%) 2 minutos, en el reactivo dos (Rojo Mallory) 10 segundos y en el reactivo tres (Verde Luz (Light Green Goldner, Bio-optica, Milan, Italia)) 30 segundos. Más detalladamente, los portaobjetos con los cortes desparafinados pasan por los siguientes pasos: Xilol 3 x 2'. Etanol 100° 2 x 1'. Etanol 96° 2 x 1'. Agua destilada 1'. Hematoxilina de Harris 2'. Agua destilada 5'. Reactivo uno 2'. Agua destilada 3'. Reactivo dos 10''. Reactivo tres 30''. Agua destilada 2'. Etanol 96° 2 x 1'. Etanol 100° 2 x 20''. Xilol 2'. Montaje automático en Eukitt® (O. Kindler GmbH, Ziegelhofstrabe, Freiburg).

### **3.7.3.3 Valoración microscópica**

La evaluación se hizo tras el examen microscópico de los cortes histológicos en un microscopio óptico de alta resolución, equipado con diferentes objetivos (x10, x20,

x40) (Leica DMI 4000B®, Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España), y un software informático que permitió capturar y guardar las imágenes (Leica Application suite v3.5.0).

Para realizar la valoración de las tinciones histológicas tanto en los casos de lesión crónica como en los casos de reparación, se utilizó una escala de valoración semicuantitativa basada en la escala de (Astrom y Rausing 1995), adaptándola a este estudio, teniendo en cuenta las características histológicas clave en los procesos de cicatrización que marcan la evolución de la misma y están relacionadas con la respuesta fisiológica normal de tendón ante un daño de tipo crónico. Los cortes histológicos se evaluaron de forma independiente por dos investigadores ciegos a los grupos de estudio. Posteriormente se ponían en común las valoraciones, y si existían diferencias en la valoración de alguno de los cortes histológicos se otorgaba una valoración tras alcanzar el consenso entre los investigadores.

<b>Valor</b>	<b>GRADO DE ORGANIZACIÓN DE LAS FIBRAS</b>
<b>0</b>	<b>Fibras de colágeno paralelas, vasos paralelos a las fibras, buena tinción.</b>
<b>1</b>	<b>Tinción más transparente, estructura más difusa</b>
<b>2</b>	<b>Ondulaciones regulares</b>
<b>3</b>	<b>Patrón irregular de fibras, metacromasia</b>

<b>Valor</b>	<b>GRADO DE VASCULARIDAD</b>
<b>0</b>	<b>Arterias paralelas a las fibras de colágeno</b>
<b>1</b>	<b>Patrón hipervascular irregular</b>
<b>2</b>	<b>Vasos gruesos en tejido hiper celular</b>
<b>3</b>	<b>Vasos de apariencia nodular o perpendiculares a las fibras</b>

<b>Valor</b>	<b>GRADO DE CELULARIDAD</b>
<b>0</b>	<b>Hilera de células con núcleo delgado</b>
<b>1</b>	<b>Hilera de células con núcleo redondeado</b>
<b>2</b>	<b>Incremento de la celularidad</b>
<b>3</b>	<b>Áreas focales con celularidad reducida</b>

**Tabla 1.** Escala histológica semicuantitativa del proceso de cicatrización del tendón SE.

### 3.7.4 Tinción inmunohistoquímica (detección de colágeno tipo I y tipo III)

Para poder evaluar el tipo de colágeno sintetizado en las zonas tendinosas de cicatrización, el estudio se centró en el primer mes y en el tercer mes de reparación. Para ello se escogieron las piezas escápulo-humerales reparadas más representativas histológicamente, embebidas en parafina, una para cada punto temporal y tipo de reparación, y se cortaron en micrótopo automático de dos a cuatro cortes destinados al estudio inmunohistoquímico. Por otro lado se hizo también la valoración sobre un tendón sano de ratas de la misma edad. Para ello se utilizaron portas especiales para tinción inmunohistoquímica Vision biosystems plus slides (Visión biosystem™, Newcastle, United Kingdom) y se emplearon distintos protocolos para cada anticuerpo utilizado. Los anticuerpos específicos empleados fueron los siguientes:

**Colágeno tipo I:** Anticuerpo de tipo policlonal, anti-colágeno tipo I murino, desarrollado en conejo (Rabbit Anti-rat Collagen type I Polyclonal Antibody®, Acris antibodies Inc, San Diego. Estados Unidos). Este anticuerpo es específico al 100% para la detección de colágeno de tipo I de rata de tendón, piel, córnea y hueso, siendo su uso válido para cortes en parafina.

**Colágeno tipo III:** Anticuerpo de tipo policlonal, anti-colágeno tipo III murino, desarrollado en conejo (Rabbit Anti-rat Collagen type III Polyclonal Antibody®, Acris antibodies Inc, San Diego. Estados Unidos). Este anticuerpo es específico al 100% para la detección de colágeno de tipo III de rata diferentes tejidos y órganos, siendo su uso válido para cortes en parafina.

La metodología para la realización de las técnicas IHQ se dividía en las siguientes fases:

1. Preparación de los cortes de tejido para la reacción antígeno-anticuerpo: Tras desparafinar e hidratar los cortes de tejido mediante inmersión sucesiva en xilol

(2 baños de 15 minutos), alcohol de gradación decreciente (100°, 96° y 70°) (2 baños de 5 minutos en cada uno) y agua destilada, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno diluido al 3% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad en una caja de cartón.

2. Desenmascaramiento antigénico: solamente se hace en los portas para la detección de colágeno tipo III. Se utilizó un método previamente estandarizado, mediante tratamiento de los cortes de tejido con una solución de pepsina al 1% en solución de HCl 0,1N, e incubándose en estufa a 37°C 1 hora en cámara húmeda.
3. Suero bloqueante: Por último, se procedió a tratar los cortes con suero BSA al 1% en TRIS-HCl) durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, para bloquear las posibles uniones inespecíficas de las distintas inmunoglobulinas.
4. Reacción antígeno – anticuerpo: Se llevó a cabo mediante la incubación de los cortes de tejido con el anticuerpo primario anti-colágeno (tipo I ó tipo III), diluido 1:100 en tampón TRIS con 0,3% Tritón durante 2 horas en cámara húmeda en oscuridad a 4°C.
5. Desarrollo de la reacción antígeno-anticuerpo para su visualización en microscopía óptica: Se llevó a cabo utilizando un procedimiento técnico estandarizado comercial (Vectastain ABC Kit®, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EEUU). Previamente se realizaron varios lavados con PBS a temperatura ambiente (un total de 3 de 10 minutos cada uno), para retirar los restos de anticuerpo primario no unido. La técnica de visualización consiste, básicamente, en la incubación de los cortes de tejido con un anticuerpo anti-

inmunoglobulinas de conejo desarrollado en cabra y conjugado con HRP (Acris antibodies Inc, San Diego. Estados Unidos) diluido 1:500 en agua durante 30 minutos en cámara húmeda en oscuridad. Posteriormente, se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. Por último, los cortes se revelaron con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), diluido en una solución que contenía 1,5 ml de Tris y una gota de DAB durante 2 minutos a temperatura ambiente, que sirve como sustrato para la técnica complejo avidina-biotina-peroxidasa. Para finalizar se lava con tampón TRIS dos veces. Luego se procedió al montaje automático utilizando Eukitt.

### **3.7.5 Valoración inmunohistoquímica**

La evaluación se hizo tras el examen microscópico de los cortes histológicos con un microscopio óptico de alta resolución, equipado con diferentes objetivos (x10, x20, x40) (Leica DMI 4000B®, Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España), y un software informático que permitió capturar y guardar las imágenes (Leica Application suite v3.5.0).

La valoración inmunohistoquímica se basó en dos conceptos, que son por un lado la extensión de la reacción y por otro la intensidad de la reacción con los anticuerpos específicos. Para ello se utilizó una escala semicuantitativa que bibliográficamente ya se ha utilizado en la valoración del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles en oveja (Crovace *et al* 2008). El resultado de la valoración se basó en la suma de los dos conceptos dando un valor comprendido entre 0 y 6.

<b>Valor</b>	<b>Extensión de la reacción inmunohistoquímica</b>
<b>0</b>	<b>Inexistente</b>
<b>1</b>	<b>Menos del 50% del corte histológico</b>
<b>2</b>	<b>Entre el 50-80% del corte histológico</b>
<b>3</b>	<b>Más del 80% del corte histológico</b>
<b>Valor</b>	<b>Intensidad de la reacción inmunohistoquímica</b>
<b>0</b>	<b>Inexistente</b>
<b>1</b>	<b>Débil</b>
<b>2</b>	<b>Moderada</b>
<b>3</b>	<b>Fuerte</b>

**Tabla 2.** Escala inmunohistoquímica semicuantitativa para valorar la presencia de colágenos.

Los cortes se evaluaron por dos investigadores de forma independiente. Posteriormente se ponían en común las valoraciones y si existían diferencias se otorgaba una valoración tras alcanzar consenso.

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se calculó la mediana con el rango intercuartílico (IQR) para cada análisis. Para realizar las comparaciones estadísticas se empleó el test no-paramétrico Mann-Whitney U. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.01.



# **4. RESULTADOS**



## 4.1 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE LESIÓN CRÓNICA EN RATA

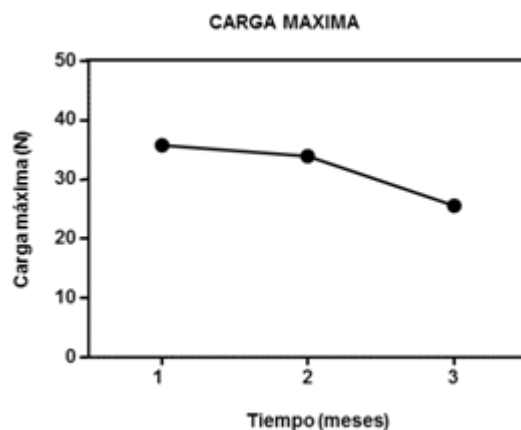
### 4.1.1 Estudio biomecánico

En la tabla 3 se recogen las características biomecánicas del tendón SE en términos de carga máxima, rigidez y deformación en aquellos animales en los que se realizó la sección-desinserción del tendón SE valorado a uno dos y tres meses. Los valores registrados en el tendón lesionado, están expresados como mediana [percentil 25%–75%]. El número de animales incluidos en esta parte del estudio eran 15. Las piezas en el ensayo biomecánico rompen por el punto más débil, y concretamente en las piezas sin reparar rompieron por diferentes puntos al habitual, que es la unión hueso-tendón.

Lesión Crónica			
Tiempo (meses)	1	2	3
Carga Máxima (N)	35,78[26,25–50,23]	33,90 [32,25–40,88]	25,65 [9,70–39,50]
Rigidez (N/mm)	5,20 [3,57–6,35]	4,0 [3,4–7,75]	3,90 [1,65–4,97]
Deformación (mm)	7,55 [6,38–8,98]	8,40 [5,57–9,86]	7,90 [4,59–9,10]

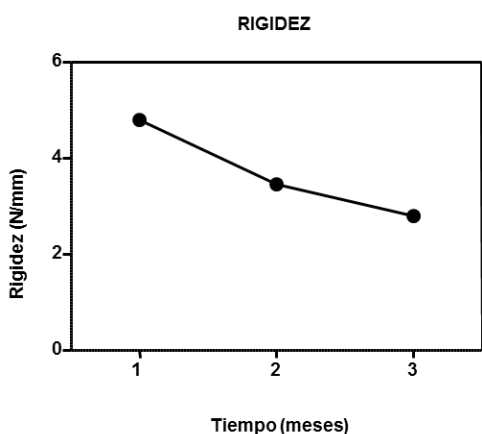
**Tabla 3.** Valores de carga máxima (N), rigidez (N/mm) y deformación (mm) definidos como la mediana [percentil 25% –75%] de los tendones SE lesionados.

Biomecánicamente se observó una disminución progresiva en la carga máxima soportada y rigidez del tendón SE, mientras que la deformación no sufrió prácticamente ningún cambio con el tiempo. Gráficamente se observó como la carga máxima va disminuyendo en los tres puntos del estudio (fig 25).

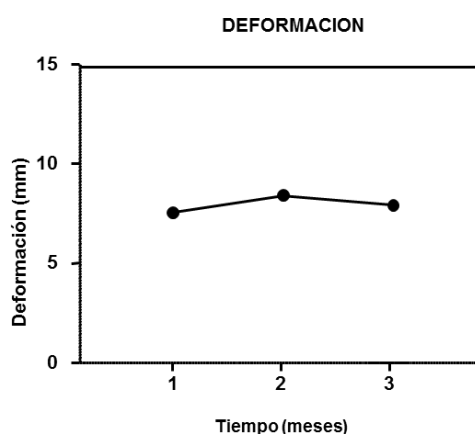


**Fig 25.** Representación gráfica de la carga máxima (N) registrada por el tendón SE.

A su vez, como se refleja en la figura 26 la rigidez del tendón SE tras lesión disminuyó con el tiempo y la deformación no experimentó cambios a lo largo del estudio (fig 27).



**Fig 26.** Representación gráfica de rigidez (N/mm) registrada por el tendón SE.

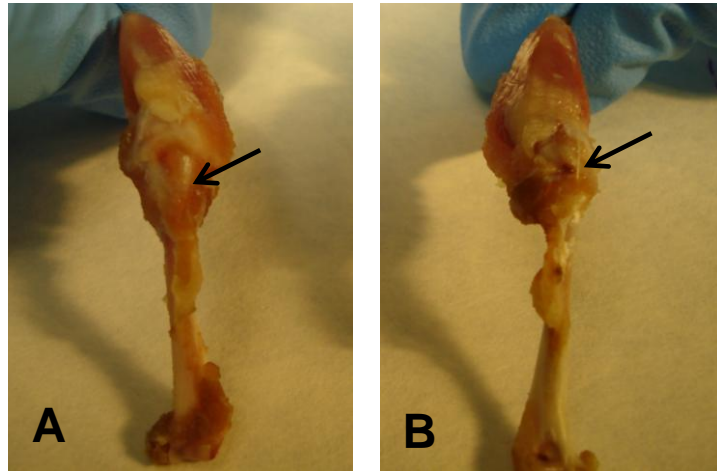


**Fig 27.** Representación gráfica de la deformación (mm) registrada por el tendón SE.

#### 4.1.2 Estudio histológico

Previamente el examen macroscópico de las piezas mostró una retracción en la unidad musculotendinosa en la zona superoexterna de la escápula con formación alrededor del arco acromioclavicular de un tejido cicatricial con numerosas adherencias

postquirúrgicas tal y como se muestra con flechas negras la figura 28, donde se compara un hombro sano con un hombro lesionado de rata.



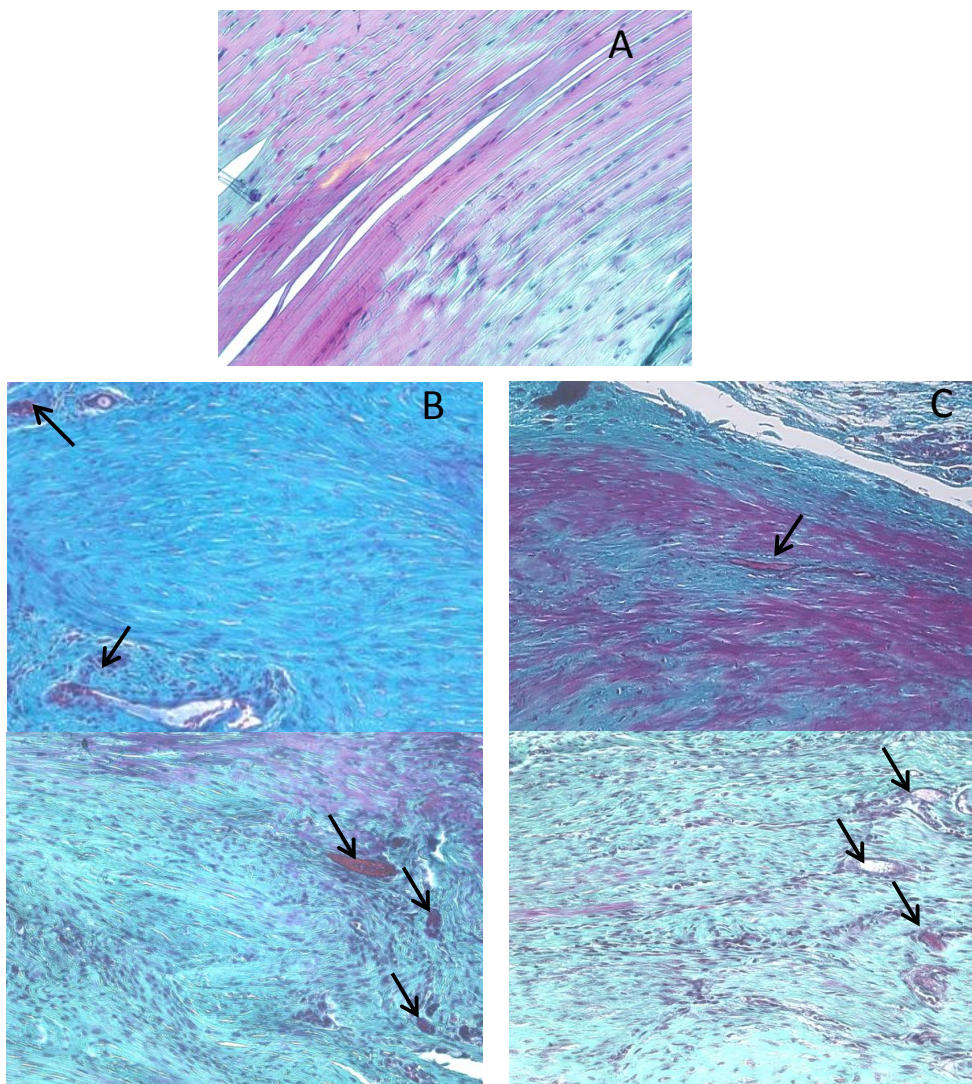
**Fig 28.** Examen macroscópico de un hombro lesionado (B) con retracción del tendón SE en comparación con un hombro sano (A).

La evaluación de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson se reflejó según la escala semicuantitativa para cada característica histológica en la siguiente tabla, donde los valores registrados en el tendón lesionado, están expresados como la mediana [percentil 25%–75%]. El número de animales incluidos en esta parte del estudio fueron 15.

Meses	<b>Lesión Crónica</b>		
	Vascularidad	Orientación de las fibras	Celularidad
1	1,50 [0,25–2,00]	3,00 [2,00–3,00]	2,00 [1,00–2,00]
2	1,00 [0,00–2,00]	2,75 [2,00–3,00]	1,13 [1,00–2,00]
3	1,00 [0,00–1,25]	3,00 [3,00–3,00]	2,00 [1,00–2,00]

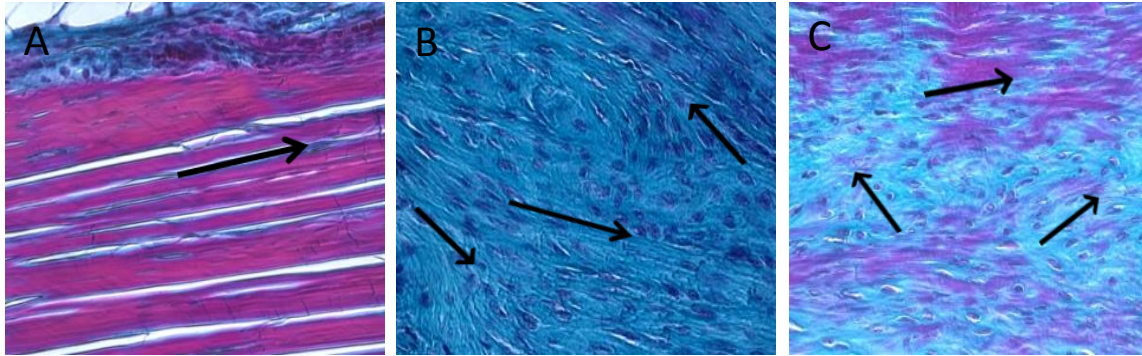
**Tabla 4.** Valores histológicos definidos como la mediana [percentil 25% –75%] de los tendones SE lesionados.

La vascularidad inicialmente en el grupo lesionado en comparación con un tendón SE normal mostró un incremento con un patrón hipervasculares. Este patrón fue disminuyendo en el tiempo, sin llegar a alcanzar los niveles de vascularidad presentes en un tendón sano. En la figura 29 se muestra como al mes de producirse la lesión es visible un patrón hipervasculares irregular del tejido conjuntivo adyacente que además, invade el tejido tendinoso. Este patrón de vascularización aún estaba presente dentro de la masa tendinosa a los tres meses de generarse la lesión.



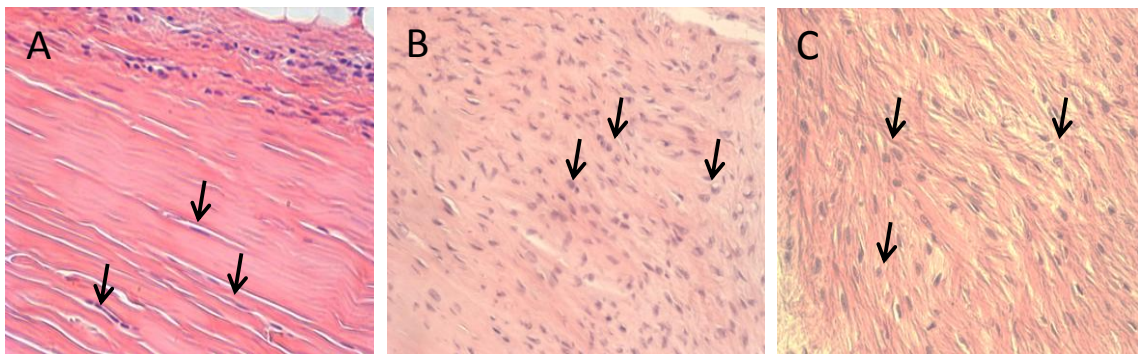
**Fig 29.** Imágenes representativas del patrón vascular en el tendón SE lesionado a 1 (B) y 3 (C) meses, en comparación con un tendón SE sano (A). Imágenes tomadas a 200 aumentos.

Por otro lado en cuanto a la desorganización de las fibras colágenas, la tinción con Tricrómico de Masson mostró un patrón irregular y desorganizado que se mantuvo en todos los puntos del estudio tal y como se muestra en la figura 30.



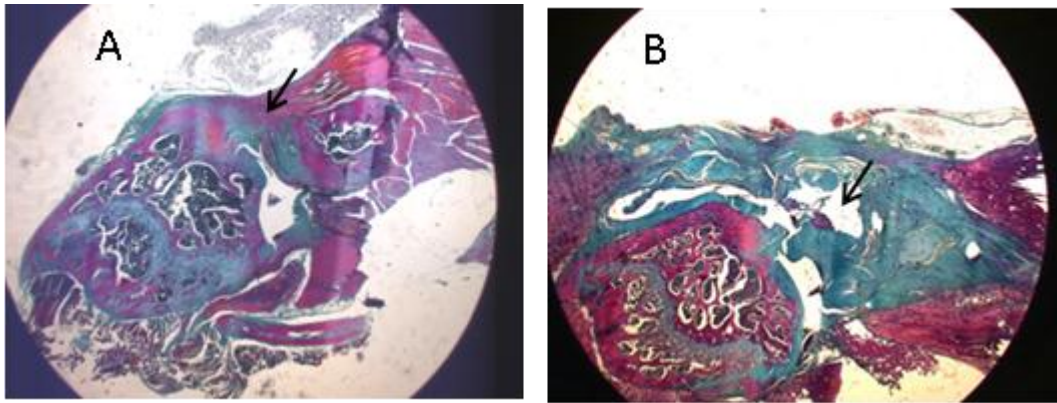
**Fig 30.** Imágenes representativas del patrón organizativo (flechas negras) de los haces de colágeno en el tendón SE lesionado a 1 (B) y 3 (C) meses, en comparación con un tendón SE sano (A). Imágenes tomadas a 400 aumentos.

La densidad celular de carácter fibroblástico aumentó en el tendón lesionado como se muestra en la figura 31. Además en el tendón sano las células eran fibroblastos con núcleo alargado (tenocitos) y en el tendón lesionado eran fibroblastos con núcleo ovoide.



**Fig 31.** Imágenes representativas de la celularidad existente en el tendón SE lesionado (flechas negras) a 1 (B) y 3 (C) meses, en comparación con un tendón SE sano (A). Imágenes tomadas a 400 aumentos.

Además la retracción del tendón SE en la unidad musculotendinosa deja una especie de hueco localizándose alrededor un tejido fibrótico que indica que no hay regeneración e imita las características de una lesión crónica del tendón SE en los hombros humanos afectados.



**Fig 32.** Imagen representativa de la retracción del tendón SE una vez producida la lesión (B) en comparación con un tendón sano (A). Imágenes tomadas a 125 aumentos.

Dado que no se produce reparación en ningún punto temporal del estudio, se decidió escoger el punto temporal un mes con la lesión producida, para repararlo con las diferentes estrategias reparadoras objeto de estudio.

## **4.2 EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES ESTRATEGIAS REPARADORAS DEL TENDÓN SE LESIONADO**

### **4.2.1 Estudio biomecánico**

En la tabla 5 se recogen las características biomecánicas del tendón SE en términos de carga máxima, rigidez y deformación en aquellos animales en los que se realizó una lesión crónica del tendón SE y una reparación al mes siguiente, con tres estrategias reparadoras diferentes, con posterior evaluación a uno dos y tres meses. Los valores registrados en el tendón reparado, están expresados como mediana [percentil 25%–75%]. En esta parte del estudio se han incluido 15 piezas para cada estrategia

reparadora. En el grupo de sutura 3 y en el grupo MSC-membrana 3 meses hubo una pérdida de 2 piezas en cada uno durante el análisis biomecánico, estableciéndose una  $n=13$  para cada uno. Hay que destacar que todas las piezas del ensayo que estaban reparadas, rompían en el punto más débil, que era justamente, la zona reparada, la unión hueso-tendón.

<b>REPARACIÓN DEL TENDÓN</b>				
	Meses	Sutura	Membrana	MSC-Membrana
Carga maxima (N)	1	32,7 [29,61–42,20]	22,15 [10,68–37,41]	26,95 [20,08–31,60]
	2	30,37 [19,03–39,91]	30,09 [19,15–48,54]	28,80 [19,15–36,10]
	3	21,65 [9,00–31,23]	28,64 [25,60–38,65]	44,00 [43,90–47,13]
Rigidez (N/mm)	1	4,80 [3,97–5,70]	2,80 [1,97–3,97]	2,40 [1,75–3,42]
	2	3,45 [1,97–3,65]	4,00 [3,40–7,75]	2,50 [1,80–4,00]
	3	2,80 [1,50–3,60]	3,90 [1,65–4,97]	4,40 [3,95–5,0]
Deformación (mm)	1	7,73 [5,24–9,528]	5,70 [4,17–8,67]	8,18 [3,05–15,03]
	2	10,53 [7,75–11,96]	8,78 [6,35–11,64]	7,03 [4,19–12,09]
	3	7,86 [4,67–11,50]	4,10 [2,70–9,15]	7,81 [4,70–11,16]

**Tabla 5:** valores de carga máxima (N), rigidez (N/mm) y deformación (mm) definidos como la mediana [percentil 25% –75%] de los tendones reparados con tres estrategias reparadoras

La tabla 6 muestra los valores de  $p$  del análisis biomecánico mediante el test estadístico U de Mann whitney, reflejando las comparaciones que son significativas.

TENDÓN REPARADO		Valor <i>p</i>	Significación
Carga máxima	Membrana vs MSC-Membrana a 3 meses	0,0357	*
	MSC-Membrana a 1 mes vs MSC-Membrana a 3 meses	0,0238	*
	Sutura vs MSC-Membrana a 1 mes	0,1714	ns
	Sutura vs MSC-Membrana a 3 meses	0,0571	ns
	Sutura vs Membrana a 3 meses	0,2857	ns
Rigidez	Sutura a 1 mes vs Sutura a 3 meses	0,0498	*
	Sutura a 1 mes vs Sutura a 2 meses	0,0408	*
	Sutura vs MSC-Membrana a 3 meses	0,0498	*
	Sutura vs Membrana a 3 meses	0,2500	ns
	MSC-Membrana a 1 mes vs MSC-Membrana a 3 meses	0,0683	ns
Deformación	Sutura vs Membrana a 3 meses	0,7850	ns
	Sutura vs MSC-Membrana a 3 meses	1,0000	ns
	MSC-Membrana a 1 mes vs MSC-Membrana a 3 meses	0,9040	ns

**Tabla 6.** Valores de *p* estadísticos de los parámetros carga máxima (N), rigidez (N/mm) y deformación (mm) de las tres estrategias reparadoras.

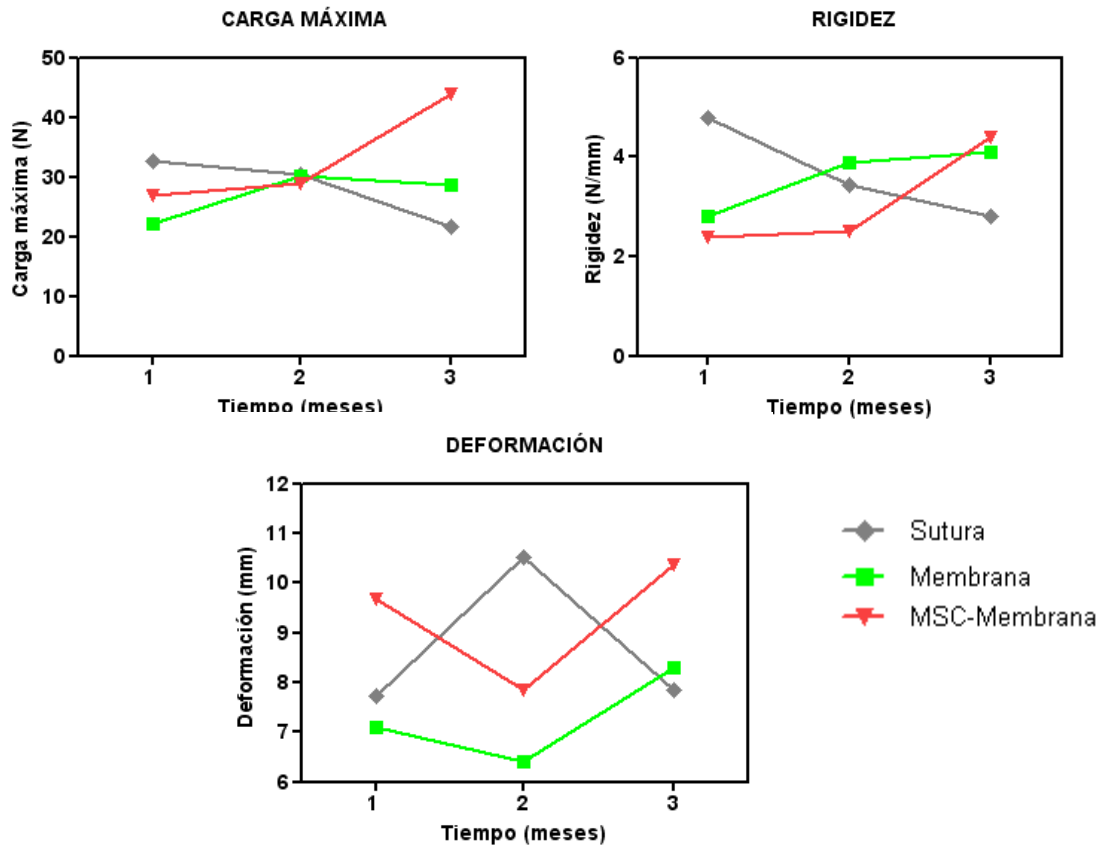
En los animales reparados por el tratamiento quirúrgico con sutura, la carga máxima disminuyó con el tiempo de reparación. Esta pérdida progresiva podría asemejarse con los fracasos clínicos de pacientes con lesión crónica del tendón SE, que tras la primera cirugía existe una alta tasa de re-roturas, con la consiguiente pérdida de la carga soportada por el tendón SE.

Por otro lado se observó un incremento en el valor de la carga máxima con el tiempo de reparación en los animales tratados con la membrana y MSCs, en comparación con los animales tratados solo con la membrana, alcanzándose diferencias significativas a tres meses de reparación ( $p=0,0357$ ). Además el propio tratamiento con la membrana y MSCs alcanzó diferencias significativas a los tres meses con respecto al primer mes de reparación ( $p=0,0238$ ). El grupo tratado con MSCs casi alcanzó diferencias significativas con respecto al grupo de reparación con sutura en el tercer mes, pero que no sucedió con el grupo de reparación con membrana sola. Por tanto se podría decir que la adicción celular a las reparaciones proporciona una mejoría frente a los tratamientos convencionales.

Con lo que respecta al parámetro de la rigidez que representa la estabilidad tisular, en el grupo de animales tratados con sutura disminuyó progresivamente desde el primer mes de reparación alcanzándose diferencias significativas al tercer mes ( $p=0,0498$ ), mientras que en los grupos tratados con membrana o membrana y MSCs aumentó durante el tiempo de reparación. Además en el grupo de animales tratados con la membrana y MSCs este parámetro casi alcanzó diferencias significativas en el tercer mes con respecto al primero, pero si alcanzó dichas diferencias en comparación con el grupo de animales tratados con sutura ( $p=0,0498$ ).

El parámetro biomecánico de la deformación, que marca la elasticidad del tejido, no mostró cambios significativos en los tres grupos de estudio, aunque los valores fueron menores en el grupo de animales tratados solo con la membrana con respecto a los otros dos grupos de estudio, que tenían valores similares.

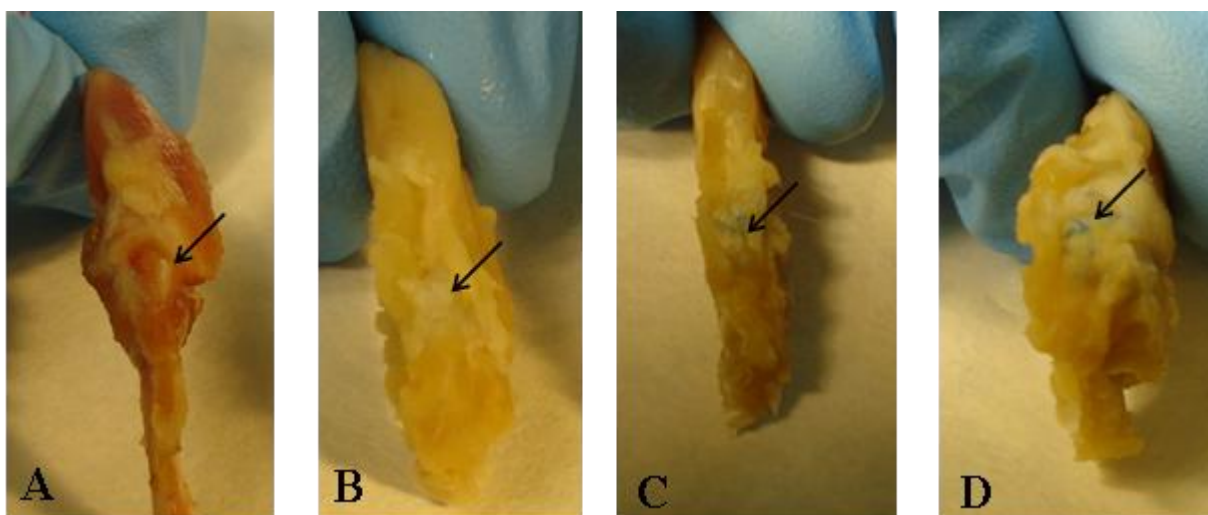
Estos resultados expresados gráficamente en la figura 33 mostraron de manera similar como la reparación con sutura, tal y como se hace en la práctica clínica habitual, presentó una pérdida de la resistencia al fallo mecánico y rigidez conforme avanza el tiempo de reparación. Sin embargo la reparación con la matriz de colágeno, en la que si bien los valores de resistencia a rotura no fueron superiores a los registrados en los animales tratados con sutura, la evolución de esta reparación en el tiempo, en términos de carga máxima y rigidez, aumentaron. Este aumento fue significativamente superior en los animales tratados con la membrana y MSCs. Por tanto el tratamiento con células provocó una mayor resistencia mecánica del tendón ( $p<0,05$ ) y una rigidez superior ( $p<0,05$ ).



**Fig 33.** Representación gráfica de la carga máxima (N) de la rigidez (N/mm) y la deformación (mm) registrada por el tendón SE reparado con tres estrategias diferentes.

#### 4.2.2 Estudio histológico

Previamente el examen macroscópico de las piezas reparadas comparadas con un hombro normal a tres meses de reparación, mostraron un tejido cicatricial de carácter inflamatorio alrededor de la zona de reparación más abundante en el caso de la reparación con sutura, frente a la utilización de membrana. Además el empleo de MSCs ofreció una visión más limpia de la zona de reparación, característica indicativa de un menor cuadro inflamatorio cicatricial. En todos los casos existió una unión cicatricial en la zona de inserción humeral.



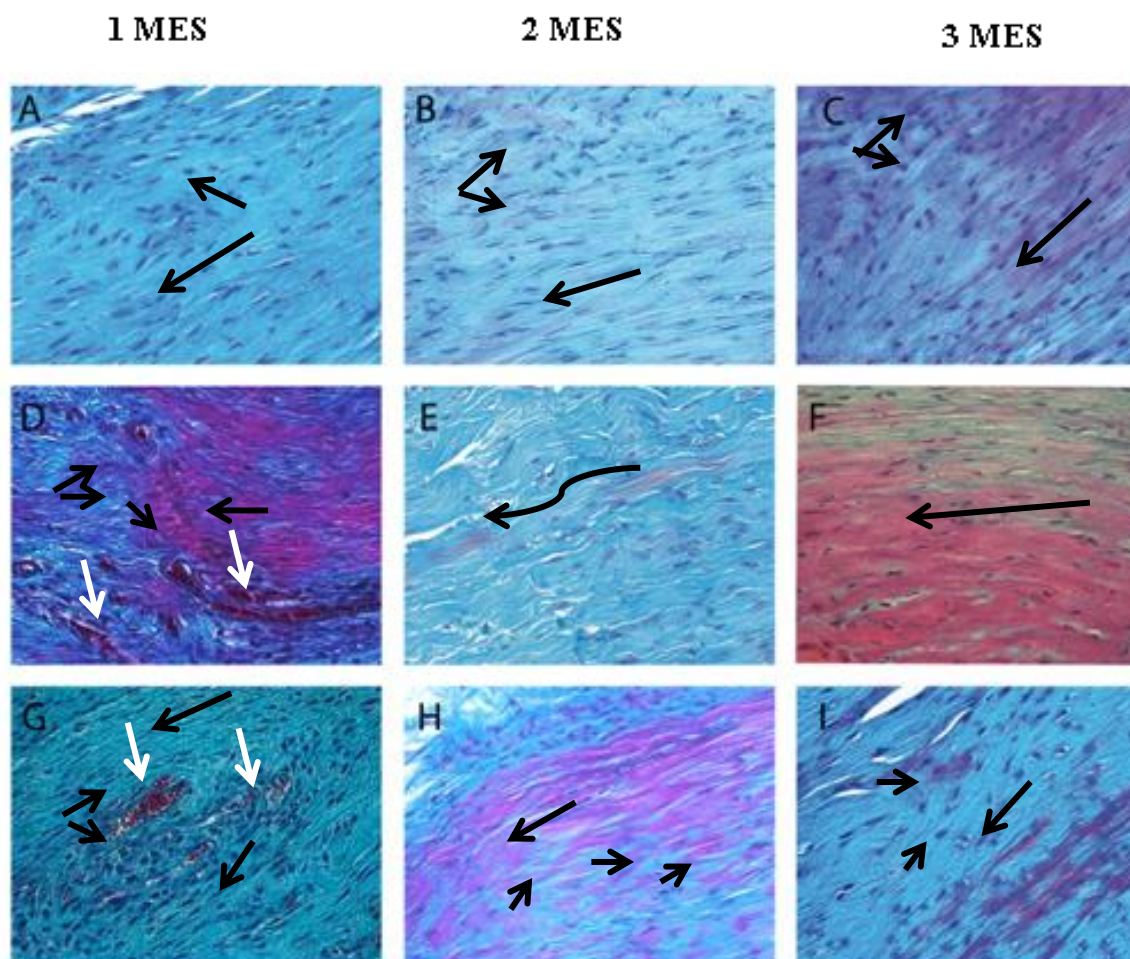
**Fig 34.** Examen macroscópico de hombros con lesión crónica del tendón SE y reparación con sutura (B), membrana (C) y membrana con MSCs (D) en comparación con un hombro sano (A).

La evaluación de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson mostraron los valores reflejados en la siguiente tabla que están expresados como la mediana [percentil 25%–75%]. El número de animales incluidos en esta parte del estudio eran 15 para cada grupo de reparación.

<b>REPARACIÓN DEL TENDÓN</b>				
	Meses	Sutura	Membrana	MSC-Membrana
Vascularidad	1	1.00[0.75—1.25]	2.00[2.00—2.75]	1.50[1.00—2.25]
	2	1.00[0.00—1.25]	1.00[0.25—1.75]	1.00[1.00—2.00]
	3	1.00[0.75—1.25]	0.50[0.00—1.00]	1.00[0.00—1.25]
Orientación de fibras	1	2.50[2.00—3.00]	3.00[2.25—3.00]	2.00[1.75—3.00]
	2	2.00[2.00—2.25]	2.00[1.25—3.00]	3.00[2.00—3.00]
	3	2.00 [0.75—3.00]	1.50[1.00—3.00]	3.00[3.00—3.00]
Celularidad	1	1.50[0.75—2.25]	2.00[2.00—2.00]	2.00[0.75—2.00]
	2	1.50[0.75—2.00]	2.00[1.00—2.00]	2.00[2.00—2.00]
	3	1.50[0.75—2.00]	0.50[0.00—1.75]	2.00[2.00—2.00]

**Tabla 6.** Valores histológicos definidos como la mediana [percentil 25% –75%] de los tendones SE reparados.

En la figura 36 se muestran las imágenes de tinción con Tricrómico de Masson donde se puede apreciar los resultados de vascularidad (flechas blancas) y orientación fibrilar (flechas negras) en las tres estrategias reparadoras.



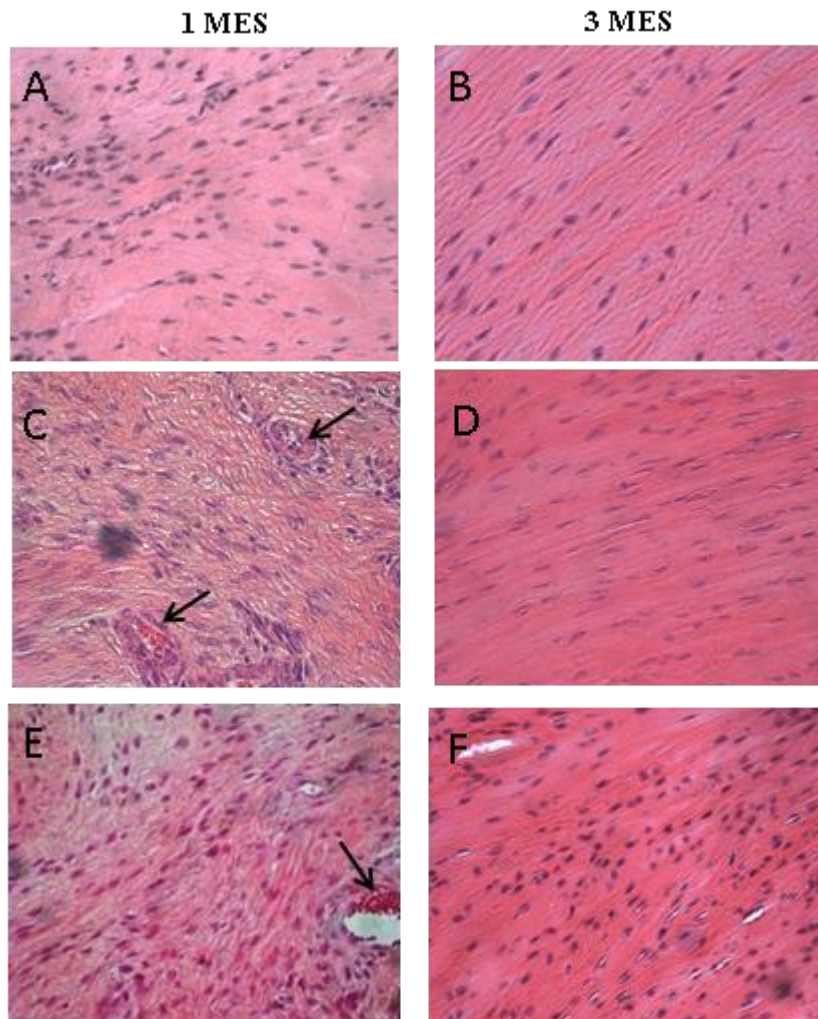
**Fig 36.** Imágenes representativas de los tres tipos de reparaciones a uno, dos y tres meses, grupo sutura (A, B y C), grupo membrana (D, E y F) y grupo membrana con MSCs (G, H e I), teñidas con Tricrómico de Masson. Flechas blancas (vascularidad), flechas negras (orientación fibrilar). Imágenes tomadas a 400 aumentos.

Los animales tratados con sutura mostraron valores similares de vascularidad y organización de los haces de fibras de colágeno con un patrón hipervascular y una organización irregular con abundancia de ondulaciones en los paquetes fibrilares durante todo el tiempo del tratamiento.

Los tendones reparados sólo con la membrana inicialmente mostraron vasos sanguíneos con paredes gruesas invadiendo el tejido tendinoso, pero durante el tiempo de tratamiento se observó una disminución en el patrón vascular alcanzándose en el tercer mes de reparación valores cercanos a los existentes en un tendón SE sano. En cuanto a la organización fibrilar, se observó inicialmente un patrón completamente irregular que también se suavizó durante el tiempo de tratamiento, alcanzándose al tercer mes de reparación un patrón mejor organizado pero todavía desorganizado en comparación con un tendón SE sano.

Con respecto a los tendones reparados con membrana y MSCs, el patrón vascular fue bastante homogéneo durante todo el tiempo de tratamiento, mostrando valores similares al tratamiento con sutura, es decir, un patrón hipervascular irregular con vasos que tienen preferentemente paredes delgadas. En cuanto a la organización fibrilar no se observó mejoría con el tiempo de tratamiento, siendo éste irregular y desorganizado todavía en el tercer mes de reparación.

En la figura 37 se muestran imágenes de secciones histológicas teñidas con Hematoxilina-eosina donde se pudo apreciar los resultados de celularidad en las tres estrategias reparadoras a uno (figuras A, C y E) y tres meses de reparación (figuras B, D y F). Además con flechas negras se señala la vascularidad existente en el primer mes de reparación con membrana y membrana con MSCs, mostrándose el cuadro inflamatorio inicial, donde sobre todo se aparecieron vasos con paredes gruesas en la reparación con membrana y vasos de paredes más delgadas en la reparación con membrana y MSCs, invadiendo el tejido tendinoso.



**Fig 37.** Imágenes representativas de los tres tipos de reparaciones a uno y tres meses, grupo sutura (A,B), grupo membrana (D, E) y grupo membrana con MSCs (G,H), teñidas con Hematoxilina-eosina, tomadas a 400 aumentos. Flechas negras (vascularidad).

Se pudo observar que los animales tratados con sutura mostraron unos niveles elevados de celularidad durante todo el tratamiento, donde parte de las células fibroblásticas no formaron hileras, coexistiendo células con núcleo delgado (similar a las células residentes de tendón) y células con núcleo redondeado (típica de células que expresan activamente matriz extracelular) en una proporción similar.

Los animales tratados con membrana, inicialmente mostraron niveles elevados de celularidad con pérdida total de formación de hileras y con mayor cantidad de células con núcleo redondeado. Sin embargo al tercer mes de reparación, los niveles de

celularidad tuvieron una bajada considerable, apareciendo de nuevo la formación de hileras y predominando las células con núcleo delgado, aunque no llegan a alcanzar los niveles y morfología típicos de la celularidad de un tendón sano.

Los animales reparados con membrana y MSCs mostraron durante todo el tiempo de tratamiento niveles elevados de celularidad, con un predominio de células de núcleo redondeado aunque parte de ellas formaron hileras en el tercer mes de reparación.

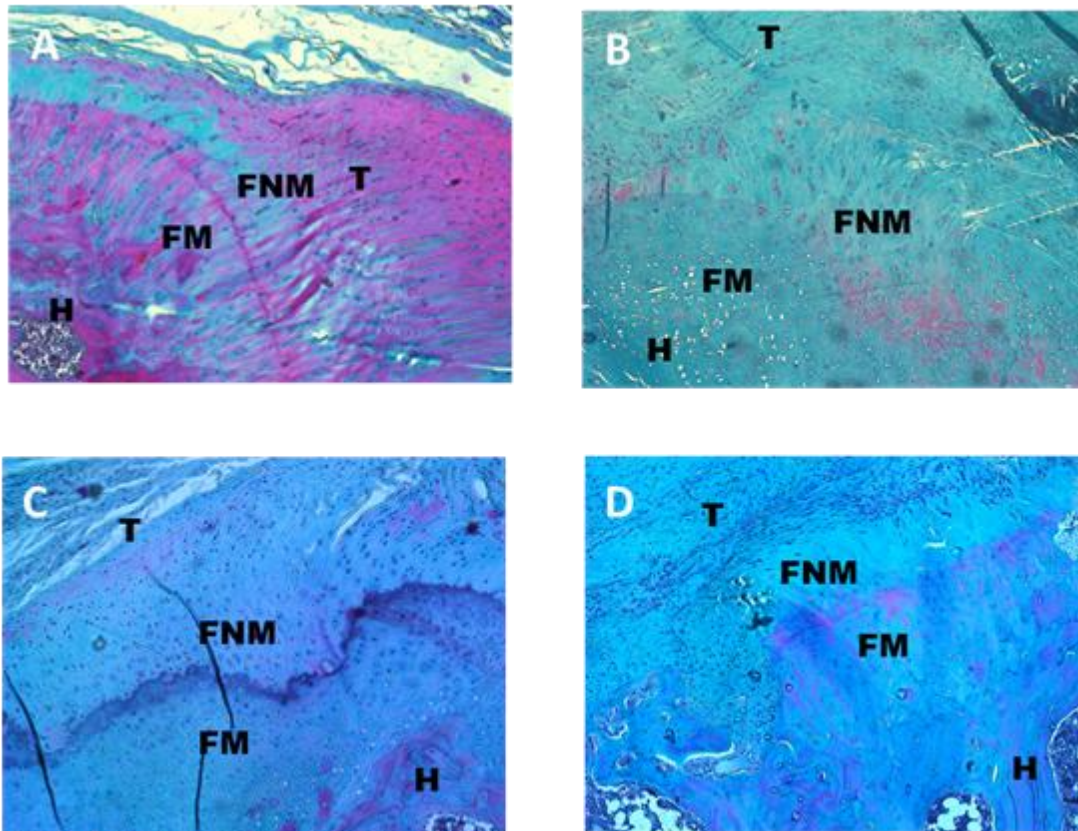
### **Evaluación histológica de la zona de transición hueso-tendón**

Dentro del estudio histológico también se evaluó cual fue el estado de zona de transición hueso-tendón durante el tiempo de reparación, sobre todo en el último punto temporal de reparación, a fin de caracterizar la calidad de la reparación y buscar una conexión con los resultados de resistencia biomecánicas.

Un tendón supraespinoso sano de una rata de la misma edad (9 meses) (Fig A) mostró las cuatro zonas típicas en la zona de transición hueso-tendón características de las inserciones directas: hueso (H), una capa más o menos densa de fibrocartilago mineralizado (FM), una línea interfásica que es el frente de calcificación, una capa de fibrocartilago no mineralizado (FNM) donde pueden apreciarse ya la disposición celular de condrocitos pequeños en hileras y haces de fibras colágenas superficiales en disposición paralela al eje tendinoso penetrando hasta zona de periostio y fibras profundas penetrando tangencialmente o en ángulo recto dentro de la masa ósea, y la zona tendinosa (T) con las hileras típicas de células fibroblásticas con núcleo alargado.

La presencia de un fibrocartilago en la zona de transición hueso-tendón confiere al tendón sus propiedades de resistencia mecánica y en este estudio se observó que a tres meses de reparación, la estrategia que ofreció una disposición de las fibras

colágenas paralelas ancladas en el periostio y una capa de FNM más parecida a la capa FNM del tendón sano, fue la reparación con MSCs. Además en las reparaciones con sutura o con membrana sin MSCs mostraron una capa de fibrocartilago tanto mineralizado como no mineralizado más abundante que en el tendón sano, con una menor organización de haces paralelos y compactos de fibras colágenas.



**Fig 38.** Imágenes representativas de la entesis en las tres estrategias reparadoras en comparación con una entesis de un tendón sano (A), siendo (B) la reparación con sutura, (C) la reparación con membrana y (D) la reparación con MSCs, teñidas con Tricrómico de Masson. FNM (fibrocartilago no mineralizado), FM (fibrocartilago mineralizado) y H (hueso). Imágenes tomadas a 100 aumentos.

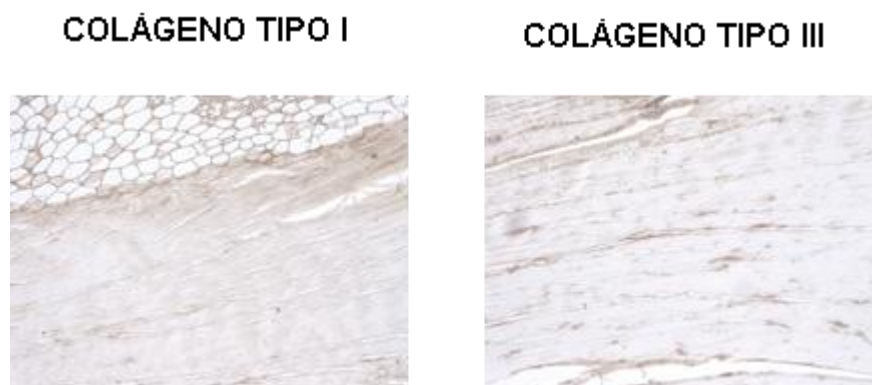
### 4.2.3 Evaluación inmunohistoquímica

El tipo de colágeno presente en los cortes histológicos en la zona de reparación del tendón se identificó mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas para el colágeno de tipo I y colágeno tipo III. Se llevó a cabo utilizando una escala

semicuantitativa sobre los cortes de una rata de la misma edad. Se evaluaron dos parámetros, la intensidad de la reacción inmunohistoquímica y la extensión de la reacción inmunohistoquímica por todo el corte teñido. Cada uno de estos parámetros podía alcanzar un valor máximo de 3, y el sumatorio de ambos parámetros constituía el valor final de la evaluación inmunohistoquímica, para cada tipo de colágeno (valor máximo era 6).

#### 4.2.3.1 Valoración inmunohistoquímica de un tendón sano

Primeramente se hizo la valoración inmunohistoquímica de un tendón sano donde se otorgó un valor total de 5 para el colágeno tipo I y un valor 2 para el colágeno tipo III. A pesar de la edad avanzada de la rata (9 meses) el colágeno de tipo I seguía siendo el predominante en el tejido tendinoso pero el colágeno de tipo III también aparece, aunque en menor proporción, debido al incremento natural en el tendón asociado al envejecimiento, tal y como se muestra en la figura 39 y en las tablas 7 y 8.



**Fig 39.** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para el colágeno de tipo I y III en un tendón sano, tomadas a 200 aumentos.

#### 4.2.3.2 Valoración inmunohistoquímica del colágeno de tipo I en los tendones reparados

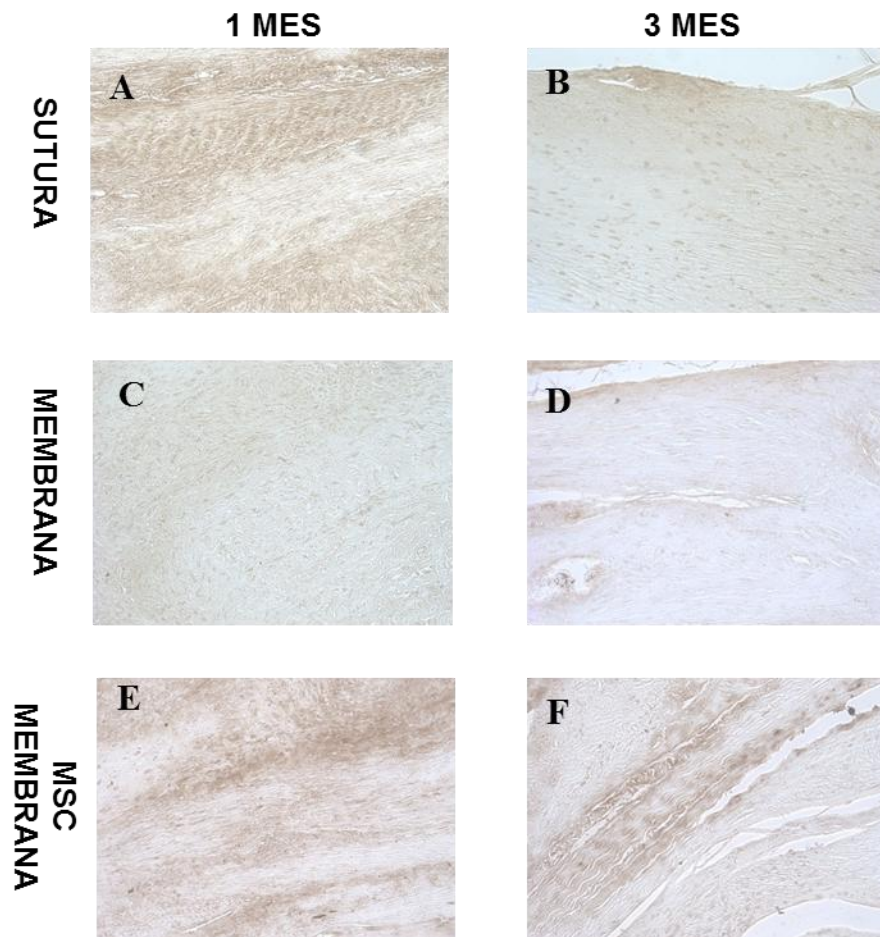
En la tabla 7 se reflejaron los valores asignados en la valoración inmunohistoquímica para el colágeno de tipo I.

<b>COLAGÉNO TIPO I</b>				
	<b>Mes</b>	<b>Extensión</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Total</b>
<b>Control</b>	-	3	2	<b>5</b>
<b>Sutura</b>	1	2	2	<b>4</b>
	3	1	1	<b>2</b>
<b>Membrana</b>	1	2	1	<b>3</b>
	3	1	1	<b>2</b>
<b>MSC-membrana</b>	1	2	2	<b>4</b>
	3	1	2	<b>3</b>

**Tabla 7.** Valores inmunohistoquímicos para el colágeno de tipo I en todos los grupos reparados y el grupo control.

El colágeno de tipo I constituye prácticamente la totalidad de la matriz extracelular del tejido tendinoso en un tendón sano. En este estudio se observó en el primer mes de reparación, tanto en el grupo reparado con sutura como en el grupo reparado con membrana y MSCs que mantuvieron niveles de colágeno de tipo I cercanos al control, y sin embargo el grupo reparado solo con membrana fue el que mostró niveles inferiores con respecto al control. Conforme avanzó el tiempo de reparación, se encontró como los niveles de colágeno de tipo I estaban más disminuidos en el grupo reparado con sutura y en el grupo reparado solo con membrana con respecto al grupo reparado con membrana y MSCs, el cual mantuvo valores de intensidad semejantes al grupo control. El propio hecho de reparar supuso una disminución en la extensión de la reacción inmunohistoquímica en todos los grupos y

sin embargo la intensidad solo disminuyó más acusadamente durante todo el tiempo de reparación en el grupo reparado solo con membrana, tal y como se muestra en la tabla 7 y en la figura 40.



**Fig 40.** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para el colágeno de tipo I de los tendones reparados, tomadas tomadas a 200 aumentos.

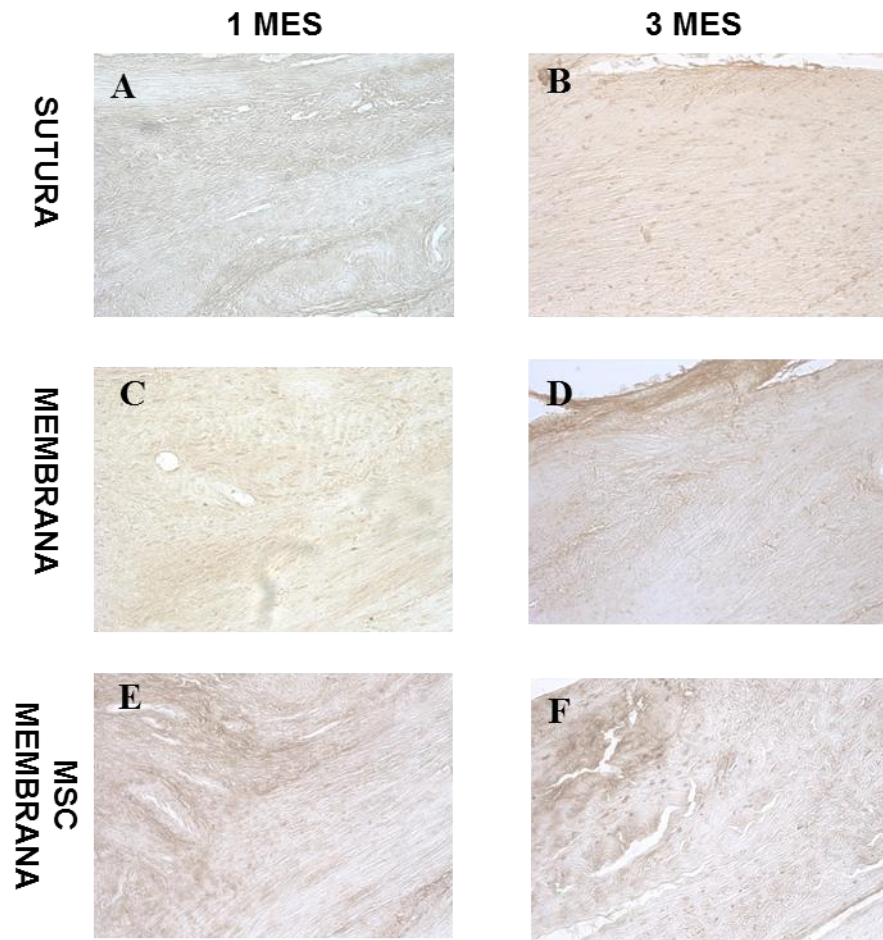
#### **4.2.3.3 Valoración inmunohistoquímica del colágeno de tipo III en los tendones reparados**

En la tabla 8 se reflejaron los valores asignados en la valoración inmunohistoquímica para el colágeno de tipo III.

<b>COLAGÉNO TIPO III</b>				
	<b>Mes</b>	<b>Extensión</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Total</b>
<b>Control</b>	-	1	1	<b>2</b>
<b>Sutura</b>	1	2	2	<b>4</b>
	3	2	3	<b>5</b>
<b>Membrana</b>	1	2	2	<b>4</b>
	3	2	2	<b>4</b>
<b>MSC-membrana</b>	1	2	1	<b>3</b>
	3	2	1	<b>3</b>

**Tabla 8.** Valores inmunohistoquímicos para el colágeno de tipo III en todos los grupos reparados y el grupo control.

Los niveles de colágeno de tipo III con respecto al colágeno de tipo I aumentan con el envejecimiento del tendón, en los procesos degenerativos, en otras patologías tendinosas y en los primeros estadios de cicatrización del tendón. En este estudio se observaron en el primer mes de reparación un aumento en los niveles de colágeno tipo III en todos los grupos de reparación, si bien esté fue mayor en los grupos reparados sin MSCs. Además estos niveles se mantuvieron elevados en los grupos reparados sin MSCs, con predominio abundante en el grupo reparado con sutura. Sin embargo el grupo reparado con membrana y MSCs mostrarán durante todo el tiempo de reparación niveles de colágeno de tipo III discretamente elevados con respecto al control. Los grupos reparados no mostraron diferencias con respecto a la extensión de la reacción inmunohistoquímica, pero si en el parámetro de intensidad, mostrando el grupo MSC-membrana valores similares al control, tal y como se muestra en la tabla 8 y en la figura 41.



**Fig 41.** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para el colágeno de tipo III de los tendones reparados, tomadas a una magnificación x200.



# 5. DISCUSIÓN



El aumento de la esperanza y calidad de vida en las sociedades modernas, han creado un marco especial donde existe una prevalencia en las roturas en alguno de los tendones del manguito rotador, sobre todo en sujetos activos de edad avanzada, impulsando por tanto, la necesidad de las indicaciones quirúrgicas (Mancuso *et al* 2002). Pero la pertinencia o no de la intervención quirúrgica es también un asunto controvertido, por un lado por la alta tasa de re-roturas y por otro lado por los buenos resultados que parece ser se obtienen del desbridamiento combinado con descompresión subacromial por la técnica artroscópica, (Burkhart *et al* 1993). Aun habiéndose comprobado que la técnica de descompresión artroscópica no ofrece mejores resultados que la cirugía abierta mediante sutura (Ogilvie-Harris *et al* 1993), cada vez más la técnica artroscópica gana más adeptos, sobre todo en lo referente a la disminución del dolor postquirúrgico y recuperación funcional (Kowalsky *et al* 2011; Walton *et al* 2012; Lin *et al* 2013; Lee *et al* 2013; Robinson *et al* 2013; Anakwenze *et al* 2013). Pero se ha comprobado que los resultados de la descompresión artroscópica pueden tender a deteriorarse con el tiempo (Zvijac *et al* 1994). Además todavía sigue siendo prevalente una tasa de re-rotura que se estima entre el veintinueve y el treinta y dos por ciento (Chung *et al* 2013; Walton *et al* 2012; Robinson *et al* 2013) manifestando además otros autores una alta tasa de re-roturas cuando se comparan con las técnicas mini-open (Zhang *et al* 2013) o alta tasa de re-rotura entre la semana seis y veintiséis después de la reparación artroscópica (Iannotti *et al* 2013). Pero todavía hoy en día se sigue utilizando la técnica de cirugía abierta mediante hilo de sutura, y las hay que emplean suturas novedosas que no parecen ofrecer diferencias con la sutura tradicional mediante túnel transóseo (Waltrip *et al* 2003; Demirhan *et al* 2003; Onay *et al* 2013), que es la técnica empleada en este estudio. La técnica mediante túnel transoseo proporciona una mejor área de contacto y presión entre el tendón del manguito rotador y el área de inserción

(Apreleva *et al* 2002; Park *et al* 2005). Estudios cadavéricos donde se reparaba con la técnica del tunel transoseo muestran unas buenas características biomecánicas después de la reparación (Ahmad *et al* 2005; Chhabra *et al* 2005; Bicknell *et al* 2005; Tuoheti *et al* 2005; Yu *et al* 2005; Behrens *et al* 2012)

Además se utiliza en este estudio un tipo de suturado que es la sutura Mason-Allen modificada, proporcionando así una disminución en la probabilidad de estrangulamiento del tendón, pinzamiento o irritación que suele causar el nudo (Lee BG *et al* 2012).

A pesar de los grandes avances en los procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de las lesiones del manguito rotador, ya sea por artroscopia o cirugía abierta (Gazielly *et al* 1994; Galatz *et al* 2004), todavía existe un número significativo de roturas tendinosas postquirúrgicas, que complican aún más la recuperación, sobre todo en los casos de roturas tendinosas masivas, que afectan a más de un tendón del manguito rotador. Hay que tener en cuenta que hasta un 25% de las reparaciones tendinosas, cursan con sintomatología postoperatoria. Los indicadores generales del mal pronóstico suelen atribuirse al estado del paciente, donde se incluiría la edad avanzada, origen de las molestias, actividad laboral, evolución prolongada del cuadro, tabaquismo, desnutrición, inyecciones de corticoides repetidas, artrosis crónica, o antecedentes de acromioplastia y reparación del manguito. Además de estos factores, se puede añadir la aparición de una debilidad severa, la aparición de la inestabilidad gleno-humeral o la rigidez excesiva del hombro, que claro está pueden influir negativamente en el pronóstico postoperatorio. La prevalencia de las lesiones crónicas del manguito rotador, parecen tener un índice mayor en ancianos, es decir la edad avanzada que junto con la elevada tensión a la que se somete la sutura en la operación, desencadenan todo un cuadro de complicaciones postquirúrgicas que conducen a la temida re-rutura. De hecho

la existencia de un desgarro tendinoso de gran amplitud, especialmente si es degenerativo, con retracción proximal severa, degeneración muscular avanzada (atrofia), pinzamiento subacromial acusado, o artrosis gleno-humeral incipiente o antigua, perjudica el pronóstico postquirúrgico y puede llegar incluso a desaconsejarse la cirugía (Ellman *et al* 1986; Iannotti *et al* 1994; Sonnabend *et al* 2002; Romeo *et al* 1999). Además de todos estos factores, los malos resultados pueden derivarse de una mala o deficiente técnica quirúrgica, con una deficiente pre-evaluación radiológica, subestimación del tamaño de la lesión, una descompresión subacromial conservadora que provoca atrapamiento residual, o una descompresión subacromial excesivamente agresiva que puede provocar la rotura acromial, desencadenar una dehiscencia deltoidea o lo que es peor, una inestabilidad gleno-humeral. Además la movilización deficiente de los márgenes tendinosos junto con una mala descompresión subacromial, o el mal uso del material de sutura pueden producir rigidez en el hombro, tensión, aumentándose por tanto, las probabilidades de re-roturas. Incluso aún haciendo una técnica impecable, las re-roturas siguen siendo frecuentes. Además a todo esto hay que añadir que una mala rehabilitación postoperatoria también puede conducir a un fracaso en la intervención quirúrgica (Ellman *et al* 1986; Iannotti *et al* 1994; Bigliani *et al* 1997; Romeo *et al* 1999; Sonnabend *et al* 2002; Davidson *et al* 2000; Davidson *et al* 2005).

Por un lado, en este estudio se necesitaba desarrollar un modelo animal que reprodujese lo mejor posible, las condiciones observadas en pacientes ancianos que tienen una lesión crónica que cursa rotura completa del tendón supraespinoso. Para ello era necesario que existiera una similitud anatómica y funcional con el hombro humano. El modelo de rata desarrollado por Soslowsky *et al*, está considerado como el mejor debido a esas mismas similitudes anatómicas y funcionales con el hombro humano, donde se aprecia que el acromion de la rata se proyecta anteriormente desde la cabeza

humeral hasta la clavícula, creando un arco cerrado sobre el tendón supraespinoso. Entonces cuando la rata corre, excava, alcanza por encima de la cabeza (por ejemplo para comer), el tendón supraespinoso discurre bajo el arco acromial, similar al hombro humano, y este movimiento repetitivo, hace que el tendón supraespinoso de la rata se predisponga a sufrir lesiones parecidas a las ocurridas en el hombro humano (Soslowsky *et al* 1996; Soslowsky *et al* 2000; Soslowsky *et al* 2002). Por eso este modelo es ideal para el estudio de la reparación de las lesiones crónicas del tendón supraespinoso que cursan con desgarro completo. Entre las ventajas podemos añadir, que la rata permite obtener un gran número de especímenes, aumentando las posibilidades de realización de diferentes estudios que pueden ser entre otros, histológicos, inmunohistoquímicos, biomecánicos y moleculares (Thomopoulos *et al* 2002). Además existen pocos estudios sobre las re-roturas postquirúrgicas del manguito rotador en el modelo de rata tal y como señala (Galatz *et al* 2009). Por tanto el modelo de rata es un buen modelo animal para estudiar reparaciones tendón-hueso, y para el uso de andamios, parches o “scaffolds” que permiten la reparación del manguito dañado (Cole *et al* 2007), o también para probar injertos biológicos nuevos, para reparar defectos grandes (Zalavras *et al* 2006; Perry *et al* 2007; Ide *et al* 2009). De hecho además existen estudios donde se ha empleado la rata, como modelo para reproducir los problemas clínicos de la reparación de las lesiones crónicas del manguito rotador humanas (Gimbel *et al* 2004; Barton *et al* 2005; Galatz *et al* 2005; Gimbel *et al* 2007; Perry *et al* 2009). Teniendo en cuenta que los desgarros crónicos en la rata tienen reparación espontánea hasta al menos 16 semanas (Gimbel *et al* 2007), este modelo permite estudios de reparación tendón-hueso en el contexto clínico de una lesión crónica del tendón. Entre las limitaciones podemos destacar la ausencia de una acumulación de carácter irreversible de grasa muscular cuando existe un desgarro

crónico (Barton *et al* 2005), lo cual hace que sea un modelo poco indicado para el estudio de patología muscular asociada a las lesiones crónicas. A esto hay que añadir la limitación que supone el pequeño tamaño de los tendones del hombro que hace imposible el empleo de muchas técnicas de reparación humana estándares como la artroscópica, y al igual que otros animales, existe formación de tejido cicatricial y curación espontánea en las lesiones del manguito rotador en ausencia de tratamiento (Zalavras *et al* 2006; Ide *et al* 2009), lo cual limita algunos estudios de eficacia de determinados tratamientos nuevos para extrapolar al uso humano. Las lesiones del manguito rotador se han estudiado en muchos modelos animales, entre los que destacan, el conejo (Fabis *et al* 2001; Sano *et al* 2002; Matsumoto *et al* 2002; Uhthoff *et al* 2003; Koike *et al* 2005; Funakoshi *et al* 2005; Kobayashi *et al* 2006; Koike *et al* 2006; Funakoshi *et al* 2006; Chang *et al* 2009; Chen *et al* 2011), cabra (St Pierre *et al* 1995; Fealy *et al* 2006; MacGillivray *et al* 2006), oveja (Gerber *et al* 1999; Coleman *et al* 2003; Gerber *et al* 2004; Meyer *et al* 2004; Schlegel *et al* 2006; Meyer *et al* 2006; Zhang *et al* 2010; Lovric *et al* 2013; Onay *et al* 2013) y perro (Aoki *et al* 2001; Oguma *et al* 2001; Dejardin *et al* 2001; Inoue *et al* 2002; Kimura *et al* 2003; Aoki *et al* 2004; Adams *et al* 2006; Derwin *et al* 2009; Bey *et al* 2011; Smith *et al* 2012), pero anatómicamente divergen bastante del hombro humano en el acromion, la clavícula y la apófisis coracoides que no cubren el manguito rotador mediante un arco. El tamaño es mayor en estos animales lo que permite estudiar diferentes técnicas quirúrgicas en el tiempo cero (Gerber *et al* 1994; Cummins *et al* 2005; Sileo *et al* 2007; Klinge *et al* 2007; Baums *et al* 2008; Nelson *et al* 2008), y después de la reparación (Ozbaydar *et al* 2008; Klinger *et al* 2008), pero normalmente estos animales se emplean para el estudio de lesiones agudas, donde se daña y se repara a la vez, en contraposición a las lesiones crónicas tan prevalentes, que caracterizan los desordenes del manguito rotador humano

en el sujeto anciano. Por tanto bibliográficamente estos animales de mayor tamaño se han empleado en el estudio de reparaciones de lesiones agudas hueso-tendón usando desde factores de crecimiento (Rodeo *et al* 2007; Seeherman *et al* 2008), hasta andamios “scaffold” (Dejardin *et al* 1999; Sano *et al* 2002; Zalavras *et al* 2006; Adams *et al* 2006; Schlegel *et al* 2006; Chen *et al* 2007; McAdams *et al* 2007; Nicholson *et al* 2007; Derwin *et al* 2009). Pero el modelo de rata reúne la primera e indiscutible primera premisa para el estudio de estas lesiones crónicas que es la similitud anatómica con el hombro humano.

En base al modelo de rata diseñado por Soslowky *et al*, en el presente estudio se diseñó un modelo experimental de lesión crónica con rotura completa del tendón supraespinoso, mediante técnicas quirúrgicas previamente descritas por (Thomopoulos *et al* 2002) en la reparación de una rotura producida entre el tendón y el hueso. El modelo experimental en rata propuesto por (Gimbel *et al* 2004) basado también en el modelo de Soslowky *et al*, mostraba que las propiedades biomecánicas, inicialmente disminuían, pero con el paso del tiempo desde que se produjo la lesión, iban incrementándose progresivamente (a las 4, 8 y 16 semanas). Gimbel *et al*, explican que en la zona lesionada, se crean adhesiones y conexiones a los tejidos circundantes, muchas veces con carácter permanente, contribuyendo así a un aumento en la carga máxima soportada por el tendón. Estas adhesiones y conexiones posiblemente se forman como parte una posible respuesta remodeladora inicial, que con el tiempo, se solo se traduce en un remodelado parcial, observándose un tendón más largo, y un aumento en la rigidez de la unidad musculotendinosa. Gimbel *et al* se apoyaron en los estudios realizados previamente por (Hersche and Gerber 1998), en roturas del tendón supraespinoso del manguito rotador humano que llevaban tiempo hechas (de larga duración), donde observaron también un aumento en la rigidez de la unidad

musculotendinosa. Estas roturas se compararon con roturas que llevaban muy poco tiempo hechas (de corta duración), es decir el control era una rotura aguda. Por lo tanto realmente sus resultados solo podrían ser comparados en nuevos estudios sobre las lesiones de carácter crónico con los coincidentes en el punto de la semana 16 que se podría considerar ya una rotura de carácter crónico (de larga duración), pero no antes.

Sin embargo en el presente estudio, el modelo de lesión crónica solo se evaluó hasta la semana 12, pero fue suficiente porque mostró en ese intervalo de tiempo desde que se produjo la lesión, un descenso claro en las propiedades biomecánicas, la carga máxima y la rigidez. Esto puede ser en parte explicado en base al conocimiento que se tiene de otros animales donde la formación de un tejido cicatricial (Zalavras *et al* 2006; Ide *et al* 2009) proporciona ese aumento en las propiedades biomecánicas, pero en contraposición en este estudio a medida que transcurría el tiempo desde que se produjo la lesión, ocurría una degradación del mismo, disminuyendo por tanto los parámetros biomecánicos al dejar de existir esta resistencia natural. Además a esto hay que añadir que la naturaleza intrínseca de los tendones, les hace ser hipocelulares y avasculares, por lo que de por sí, tienen una pobre capacidad regenerativa (Bray *et al* 1996) que se acentúa aún más cuando existe, como en este estudio, una rotura completa. Muy probablemente el uso de animales que en parte están más envejecidos (ratas a partir de 9 meses de edad), ha facilitado esta situación, donde la capacidad espontánea de regeneración se encuentra disminuida, siendo por tanto la situación más parecida a la que de forma prevalente ocurre en el caso de lesiones crónicas en el tendón supraespinoso del hombro humano del anciano.

El examen macroscópico de las piezas escápulo-humerales mostraron un “espacio” en la zona de inserción del hueso como consecuencia de la retracción del tendón SE y en conjunto la unidad musculotendinosa, y que a diferencia del modelo de

Soslowsky *et al*, se observó durante todo el tiempo del estudio en la zona de la lesión, indicando que nunca se invadió completamente por tejido cicatricial. Hay que tener en cuenta que una de las causas de la no regeneración espontánea de un tendón lesionado, puede deberse a la existencia de un ambiente ya empobrecido, marcado por un aumento de la vascularidad, una baja calidad del tejido tendinoso y óseo (Deutsch *et al* 2008; Keener *et al* 2010) , además de la presencia de una atrofia muscular y degeneración grasa (Cho *et al* 2010), es decir, los tejidos se encuentran envejecidos generándose fallos en la regeneración, cosa que no sucede en lesiones en tejidos tendinosos más jóvenes que se recuperan de forma más temprano y más favorablemente (Boileau *et al* 2005). En esta línea, el examen histológico ofreció signos clave que marcaban esta degeneración, como son la presencia de un tejido fibrovascular en el área de la lesión en los estadios iniciales, con un patrón hipervasculatura irregular que es característico de los primeros estadios de regeneración (Sharma *et al* 2006), además de una desorganización marcada de las fibras colágenas, junto con un aumento en la celularidad. Lo que no se observó fue una degeneración grasa clara que invadiera el tejido tendinoso retraído, ni una atrofia muscular marcada, muy probablemente debido en parte al tiempo de observación (12 semanas) que todavía es relativamente pronto, y por otra parte al tratarse de animales que viven poco tiempo (12 meses), casi no hay tiempo para que se manifiesten signos claros de un envejecimiento tisular, aunque empiezan a mostrar algunos como la acumulación de más grasa corporal en general y una menor elasticidad de los tejidos.

Normalmente en el proceso natural de regeneración tendinosa, cuando ésta tiene lugar, lo hace en tres fases claramente diferenciadas, una fase inicial inflamatoria con proliferación celular y fenómenos de angiogénesis creándose un tejido fibrovascular inmaduro (James *et al* 2008), una fase proliferativa de haces de colágeno y una fase de

remodelación a las 6-8 semanas desde que se produjo la lesión, donde desciende normalmente la celularidad y aparece un patrón fibrilar más organizado, aunque nunca se alcancen niveles similares a un tendón sin lesionar (Sharma *et al* 2006; James *et al* 2008). En este estudio aparecieron los fenómenos inflamatorios iniciales y los fenómenos proliferativos, pero todavía a las 12 semanas el patrón fibrilar se mostró desorganizado, con una alta celularidad, y con la presencia de vascularidad dentro de la masa tendinosa, presumiblemente en respuesta a un posible proceso reparativo (Matthews *et al* 2006), pero que al final, no tuvo éxito. Además durante todo el tiempo del estudio existió un predominio de células con núcleo ovoide en un tejido desorganizado e hipervascular, sobre las células típicas del tendón, fibroblastos con núcleo alargado (tenocitos) en un tejido organizado e hipovascular, características que en su conjunto se corresponden con estudios histopatológicos realizados en rata (Dourte *et al* 2010) y en humanos (Fukuda *et al* 1990, Gazielly *et al* 1994) con lesión crónica del manguito rotador.

En resumen, estos resultados indican que este modelo experimental es adecuado porque reproduce en su mayor parte, las características clínicas observadas en pacientes afectados por este tipo de lesiones del tendón supraespinoso del manguito rotador, entre las que destacan, una baja resistencia y rigidez biomecánica, así como unos rasgos histológicos que muestran una elevada vascularidad y celularidad. A esto posiblemente hay que sumarle un ambiente más empobrecido donde los tejidos circundantes también empiezan a estar más envejecidos, menos elásticos y con menos capacidad regenerativa. Todos estos factores contribuyen a que la regeneración espontánea del tendón supraespinoso no ocurra, haciendo de este modelo, un modelo idóneo para comparar distintas estrategias terapéuticas, tanto quirúrgicas como estrategias enmarcadas en el

contexto de la terapia regenerativa, que es objetivo de este estudio, para reparar lesiones de carácter crónico.

Dentro de la Ingeniería de tejidos y la Terapia Regenerativa existen numerosos estudios que abarcan desde la administración de factores de crecimiento, hasta el uso de andamios “scaffolds”. Los “scaffolds” biológicos principales, son los que se obtienen de tejidos de mamíferos (humano, porcino, bovino, y equino) (Chen *et al* 2009). Estos tejidos son tratados para eliminar cualquier rastro de componente no colágeno, reteniendo su colágeno natural, estructura y propiedades biomecánicas. Ejemplos claros son el uso de submucosa de intestino, dermis y pericardio, que se someten a un proceso de purificación en cascada, que conlleva la eliminación de lípidos o depósitos grasos, conlleva una rotura celular, y un proceso de esterilización (Chen *et al* 2009).

La submucosa intestinal porcina (Restore®) (DePuy Orthopaedics, Richmond, VA) se ha utilizado en estudios de reparación del manguito rotador en humanos (Iannotti *et al* 2006), y se puede concluir que el caso de roturas completas y masivas de los tendones del manguito rotador no mejora la tasa de reparación del tendón o las características clínicas. También otros autores como (Metcalf *et al* 2002) en un estudio humano han observado resultados fallidos ante el uso de Restore®, donde hubo una completa resorción del injerto en 12 semanas, con el consiguiente fallo clínico, y autores como (Sclamberg *et al* 2004) observaron re-rotura posquirúrgica. Otro grupo investigador, (Zheng *et al* 2005) en estudios de eficacia y seguridad del Restore®, comprobaron que ésta, poseía múltiples capas de células, por tanto había restos de DNA porcino, que al implantarlo en ratón y en conejo, para la reparación del manguito rotador, la membrana desencadenó una gran reacción inflamatoria caracterizada por una inflamación de linfocitos. También (Walton *et al* 2007), en pacientes con reparación del manguito rotador con Restore® experimentaron una disminución en fuerza después de

la reparación, una lenta resolución del dolor tras actividad, y no hubo un descenso en la tasa de re-roturas cuando se comparaban con pacientes sometidos a reparación del manguito rotador con las técnicas quirúrgicas convencionales. Además los autores de este estudio desaconsejan totalmente Restore® por la gran respuesta inflamatoria que se deriva de la implantación de este xenoinjerto.

La dermis porcina (Permacol®) (Tissue Science Laboratories PLC, Aldershot, Hampshire, UK) es una capa simple de piel dérmica de cerdo que ha sido también utilizada en diversos estudios. (Soler *et al* 2007) al reparar desgarros masivos del manguito rotador, al cabo de 3-6 meses desde la operación, los pacientes mostraron síntomas de re-roturas con señales de inflamación. Por el contrario (Badhe *et al* 2008) evaluando 10 pacientes con roturas de manguito rotador y tratados con Permacol®, solo dos pacientes mostraron rotura del injerto.

Otro tipo de membrana utilizada en ensayos clínicos es GraftJacket® (Wright Medical Technology, Inc.), una matriz acelular dérmica obtenida de banco de piel humanas, compuesta por colágenos de tipo I, III, IV, y VII, elastina, condroitin sulfato, proteoglicanos y factor de crecimiento de fibroblastos. Forma una membrana basal que preserva los canales de los vasos para permitir la infiltración de fibroblastos y tejido vascular, con mínima respuesta inflamatoria en el huésped (Adams *et al* 2006; Coons *et al* 2006; Walton *et al* 2007). Estudios sobre GraftJacket han demostrado que soporta mayor carga biomecánica que el Permacol® o el Restore®, aunque todavía es más débil que el uso de tendones autólogos (Derwin *et al* 2009). (Ide *et al* 2009) comprobaron en reparaciones de roturas del manguito rotador con GraftJacket que tenían mayor grado de tendón maduro que el grupo no tratado. (Bon *et al* 2008) en reparaciones de roturas masivas comprobaron que la tasa de fallo era del 19% con GraftJacket, resultado mucho más bajo que el 38% al 95% de tasa de fallo registrada en reparaciones masivas sin el

injerto (Bishop *et al* 2006; Galatz *et al* 2006; Gerber *et al* 2000; Zumstein *et al* 2008). (Snyder *et al* 2009) además han comprobado en estudios que GraftJacket® no produce calcificación, infección o respuesta inflamatoria a 3 meses. Las fibras de colágeno estaban mejor alineadas y hubo mejoría en la reparación hueso-tendón.

Allopatch® (Musculoskeletal Tissue Foundation, Edison, NJ), es una ECM procedente de fascia humana, que es comparable con GraftJacket® en rigidez, fuerza, y retención tisular (Barber *et al* 2009). Pero las también las ECMs alogénicas pueden contener también restos de DNA de la fuente alogénica del donante, y pueden inducir respuesta inflamatoria en el huésped (Gilbert *et al* 2009).

En resumen, el empleo de ECMs biológicas como “scaffolds”, sobre todo los xenoinjertos y en menor proporción los aloinjertos comerciales, pueden causar respuesta inflamatoria en el huésped, que puede causar dolor, y edema en el lugar de la reparación, siendo perjudicial para el proceso reparativo final (Zheng *et al* 2005), aumentándose además considerablemente la tasa de re-roturas (Derwin *et al* 2006).

Este estudio pretende incorporar dentro del marco de la Ingeniería de Tejidos, una nueva estrategia de injerto, para abrir el abanico del uso de ECM biológicas para reparar los desgarros del manguito rotador humano, y sumar así las alternativas ante el uso de membranas alogénicas como Allopatch® y GraftJacket®, que parece tener buenos resultados. La membrana OrthADAPT® (Pegasus Biologics, Irvine CA), que se emplea en este estudio, es un xenoinjerto, una membrana decelularizada derivada de pericardio equino. El uso de pericardio equino supone una serie de ventajas, entre las que destacan que es un tejido “limpio” de forma natural, la estructura colágena está altamente organizada y es similar a la organización colágena humana, es un tejido resistente, y lleva utilizándose alrededor de veinte años en usos médicos. Ya se ha comentado anteriormente que entre las limitaciones del empleo de xenoinjertos como

ECM está en la incompleta eliminación de las células del donante y los propios restos celulares endógenos, que pueden provocar en el huésped reacciones inflamatorias desencadenándose respuestas inmunes que pueden derivar en rechazo. Sin embargo todos los bioimplantes OrthADAPT® están decelularizados de tal forma que se eliminan todos los restos celulares. Esta decelularización efectiva asegura la seguridad y la biocompatibilidad del bioimplante. OrthADAPT® es por tanto un “scaffold”, una membrana de colágeno de tipo I (colágeno mayoritario del tendón sano) altamente organizada, autorizada para uso humano, que se emplea en implantaciones quirúrgicas para reforzar, reparar o reconstruir tejidos. Es una membrana flexible, esterilizada haciéndola resistente a la degradación enzimática, biocompatible y segura. (Lake *et al* 2009) resaltaron las propiedades del OrthAdapt® para su uso para reparar el manguito rotador gracias a que conserva un modulo de respuesta lineal del mismo orden de magnitud que un tendón supraespinoso humano, además la respuesta no lineal es algo superior al tendón nativo, y también es una membrana anisotrópica como los tendones. También otros autores como (Barber *et al* 2009) al comparar las propiedades biomecánicas de distintos ECMs comerciales, comprobaron que OrthAdapt® tenía un modulo tensil mayor que otros materiales, incluidos Allopatch® o GraftJacket®, aunque la capacidad de retención de la sutura fuese menor. Por otro lado Allopatch® o GraftJacket® es verdad que son más resistentes a la rotura, soportan más ciclos de carga, pero son más rígidos que OrthAdapt®, por lo que la flexibilidad de OrthAdapt® puede mimetizar y crear un ambiente parecido al tendón funcional en el lugar de inserción. Los resultados histológicos de presente estudio muestran como inicialmente se produce una respuesta inflamatoria tras reparar con OrthAdapt®, medido a través del parámetro vascularidad, y como disminuye drásticamente durante el estudio, mostrando

así su seguridad con esta baja respuesta inflamatoria en el huésped, que no se traducirá en rechazo inmune.

Una vez que se estableció el modelo animal de lesión crónica por rotura completa del tendón SE, se procedió en el estudio a su reparación usando tres estrategias diferentes: reparación con sutura imitando al método quirúrgico convencional más común, reparación con membrana de colágeno tipo I OrthAdapt®, y reparación con membrana de colágeno de tipo I OrthAdapt® con MSCs alogénicas, para realizar una aproximación de mejora en el tratamiento de estas lesiones.

La Ingeniería de tejidos está emergiendo mediante la combinación de “scaffolds” y células, que pueden aplicarse sin estimular o estimuladas (Bagnaninchi *et al* 2007). Este estudio ha encontrado en las MSCs un punto de apoyo innovador para dar un paso más hacia la reparación de las lesiones crónicas del manguito rotador, ya que las MSCs pueden aplicarse directamente en el sitio de la lesión o pueden ser incluidas en una matriz, como es el caso de este estudio, que funciona como “scaffold”, mientras el tejido se repara (Sharma *et al* 2006). Pero se necesita una matriz especial, un “scaffold” cuya estructura básica sea igual que la del tendón, como es el caso de la membrana OrthAdapt®, y que además su estructura decelularizada permita la siembra de células sobre ellas (Omae *et al* 2009). Además en estudios antiguos, ya se postulaba la mejoría de combinar implantes de colágeno con MSCs, para mejorar las propiedades biomecánicas de tendones dañados, comprobándose al reparar un pequeño defecto en el tendón de Aquiles de conejo, mediante el uso de sutura con un gel que contiene MSC autólogas, que la carga que soportaba después el tendón era superior al control reparado solo con sutura y además la reparación con células mostraba una mejor alineación de las fibras colágenas (Young *et al* 1998). También bajo el conocimiento del uso de MSCs en estudios de osteointegración, ha motivado su empleo en este estudio, ya que confirman

que MSC derivadas de membrana sinovial aceleran la remodelación de la interfase tendón-hueso histológicamente, manifestada gracias a la observación de más cantidad de fibras de colágeno y formación de fibras oblicuas que se insertan en el hueso, fibras de “Sharpey”, ya a las dos semanas de reparación (Soon *et al* 2007; Ju *et al* 2008), por lo que el uso de MSCs favore la osteointegración del injerto o “scaffold” que se utilice.

Como se muestra en la tabla 5 la capacidad de las MSCs para mejorar las características biomecánicas del tendón reparado en comparación con las otras dos estrategias reparadoras resulta alentadora. Mientras que los animales tratados con sutura mostraron una pérdida de la función biomecánica con el tiempo, en la reparación con OrthAdapat® y MSCs la carga máxima soportada por la unidad musculotendinosa y la rigidez eran estadísticamente significativas a tres meses, en comparación con la reparación con membrana OrthAdapat® sola o el grupo de reparación con sutura. Esto significa que los animales tratados con MSCs y la membrana OrthAdapat® tienen en el tendón supraespinoso reparado una fuerza mayor en términos de resistencia a rotura, lo cual coincide con estudios previos donde hubo un incremento significativo de las propiedades biomecánicas después de reparar con un implante de gel de colágeno con MSCs derivadas de médula ósea, en defectos hechos en el tendón patelar de conejos (Awad *et al* 2003) comparando con la reparación natural a las 12 y 26 semanas. Otros autores (Young *et al* 1998) comprobaron al reparar defectos en el tendón de Aquiles, como MSCs de médula ósea, que las MSCs proporcionaron una mayor carga estructural y propiedades mecánicas. De forma similar (Awad *et al* 1999) observaron lo mismo cuando introdujeron MSCs en una mezcla de colágeno que se implantó en defectos creados en el tendón patelar. También (Juncosa-Melvin *et al* 2006) comprobaron en roturas completas hechas en el tendón patelar de conejo, como a las 12 semanas de haber implantado un gel-esponja con MSCs, parámetros biomecánicos como la carga

máxima y la rigidez, mejoraron significativamente, pero seguían siendo ligeramente inferiores en comparación con un tendón sano. Los experimentos de (Butler *et al* 2008) aportaron algo más, ya que, al reparar el tendón patelar de conejo, comprobaron que enriqueciendo el gel con una esponja de colágeno tipo I y ajustando la dosis de MSCs, había una aportación en la mejoría de las propiedades biomecánicas en cuanto a carga máxima y rigidez. Sin embargo otros autores (Chong *et al* 2007) al reparar tendones de Aquiles en conejo con MSCs derivadas de médula ósea usando como vehículo fibrina, observaron mejoría biomecánica a las 3 semanas después de la implantación, pero no apreciaron mejoría en intervalos más largos, concluyendo por tanto, que la mejoría en la reparación tendinosa con terapia celular intratendinosa, está restringida solo a los estadios iniciales de la curación. En el presente estudio, al comparar el grupo de reparación solo con sutura con respecto al grupo tratado con MSC, podemos apreciar que la caída en la carga máxima y en la rigidez del tendón reparado solo con sutura imitaría aún más los posibles casos de re-roturas clínicas, y como el tratamiento con MSCs refuerza la estructura reparada, la unidad musculotendinosa, sobre todo manifestado en contraposición a (Chong *et al* 2007) más allá de tres semanas, en concreto, tres meses.

Histológicamente se observó que esta mejoría biomecánica en el grupo de reparación con MSCs, no vino acompañada de un alineamiento en las fibras de colágeno, cuyo patrón continuaba siendo irregular, además de mantenerse alto el índice de celularidad con predominio de células redondeadas, aunque parte de ellas formaban ya hileras en el tercer mes de reparación. Autores como (Juncosa-Melvin *et al* 2006) observaron que tras la reparación celular de desgarros completos del tendón patelar con MSCs, el alineamiento celular mejoró y era comparable con un tendón sano. Por otro lado (Chong *et al* 2007) que restringían la mejoría histológica también a las etapas

iniciales tras el uso de MSC en defectos creados en el tendón de Aquiles de conejo, se oponen al presente estudio, el cual inicialmente tras el uso de la membrana o la membrana con MSCs, se observa que existe una menor organización histológica que en las etapas tardías.

(Nourissat *et al* 2010) usando un modelo de rata para la reparación del tendón de Aquiles con eliminación completa de la entesis, compararon la terapia con MSCs con otras terapias celulares. Los test biomecánicos, que midieron la re-rotura de la unión hueso-tendón reparada, ofrecieron una mejoría en términos de carga máxima en los casos de reparación celular frente a la cirugía clásica. Y además solo la reparación con MSCs mostraron una nueva entesis más organizada que los otros casos, donde se aprecian condrocitos dispuestos en hileras o columnas. Esto se asemeja bastante a los resultados de este estudio, donde la reparación con MSC ofreció una entesis más organizada que las otras estrategias, a pesar que la reparación solo con membrana ofrecía a nivel tendinoso, una mejor organización colágena y celular. (Okamoto *et al* 2010) al reparar con BMC (células totales de medula ósea) que requieren un tiempo de cultivo menor, y compararlo con MSCs, que requieren tiempos de cultivo más prolongados, pero que forman parte de la fracción de BMC, observaron que el grupo celular en general, mostraba mejoría biomecánica e histológica frente a la reparación sin células. Y dentro del grupo celular, el grupo BMC ofreció una mejoría biomecánica en términos de carga máxima, comparable a un tendón normal, y una mejor calidad histológica, ya que a pesar de que inicialmente aparecía con más intensidad, colágeno tipo III, a los 28 días, aparecía con mayor intensidad en la tinción colágeno tipo I. En este estudio en el grupo de sutura y el grupo de reparación con membrana sola, hubo un incremento en la intensidad de la tinción del colágeno tipo III con respecto al grupo reparado con membrana y MSCs, que mostraron una intensidad menor, pero sin

embargo, la intensidad de la tinción del colágeno tipo I fue mayor que en las otras dos estrategias reparadoras, al tercer mes de reparación. La prevalencia de colágeno tipo III sobre el colágeno tipo I puede hacer más débil la estructura del tendón y aumentar por tanto, el riesgo de re-rotura (Maffulli *et al* 2002; Satomi *et al* 2008). Otros autores apuestan también por la terapia celular dentro de la ingeniería de tejidos como (Loeffler *et al* 2013), que al utilizar células de la interfase hueso-tendón del manguito rotador de rata, implantadas en una esponja de colágeno, para reparar defectos en él mismo, comprobaron que a tres meses hubo una mejoría en la organización colágena, a pesar de que inicialmente, a un mes, se tuviera un cuadro de celularidad, vascularidad, inflamación incrementado, como ocurre en este estudio.

Con respecto al patrón vascular, en el grupo de reparación con MSCs, fue bastante homogéneo durante todo el tiempo de tratamiento, mostrando valores similares al tratamiento con sutura, es decir, un patrón hipervascular irregular con vasos que tienen preferentemente paredes delgadas. Inicialmente, al mes de reparación, en el grupo reparado solo con membrana, encontramos una neovascularización de carácter inflamatorio caracterizada por vasos con paredes gruesas, que a lo largo del tiempo fue remitiendo hasta casi desaparecer. Sin embargo el patrón hipervascular de vasos de paredes finas que aparece en la reparación con MSCs, disminuyó más discretamente con el tiempo de tratamiento, persistiendo aún en el tercer mes de reparación. En el proceso natural de regeneración tendinosa existe una fase inicial inflamatoria con proliferación celular y fenómenos de angiogénesis creando un tejido fibrovascular necesario para la que tenga lugar la reparación (James *et al* 2008), tal y como observamos sobre todo en los casos de reparación con MSCs y membrana sola. A continuación aparece una fase proliferativa de haces de colágeno, y después una fase de remodelación donde la celularidad comienza a descender y aparece una organización

fibrilar mejor (Sharma *et al* 2006; James *et al* 2008), cosa que sucede sobre todo en el caso de reparación con membrana sola, pero que no se traduce en mejor calidad biomecánica como en el caso de la reparación con MSCs. Posiblemente el empleo de MSCs en la reparación tendinosa produce efectos indirectos como efectos anabólicos tróficos, efectos a través de actividad paracrina y autocrina, efectos antiinflamatorios, quimioatracción de células madre adicionales de los tejidos adyacentes al tendón, y un significativo efecto antiapoptótico (Aggarwal *et al* 2005; Caplan *et al* 2006; Meirelles *et al* 2009). Y posiblemente estos algunos de estos efectos estén ocurriendo aún al tercer mes de reparación, que ya se traducen en una mayor fuerza tensil, pero que todavía requiere una mayor organización fibrilar y menor vascularidad, propias de una fase de remodelación. Es más la neovascularización en un injerto, es considerada como una fase necesaria hacia la recuperación (Kasperczyk *et al* 1993), y autore como (Xu *et al* 2012) al implantar un xenoinjerto en un modelo de primate para reparar el manguito rotador, observaron un aumento de la vascularidad todavía a los tres meses de reparación, y una disminución a los seis meses, indicando que ha entrado en una fase de remodelación donde la organización fibrilar mejoró. Estos resultados se corresponden con los de este estudio en el tercer mes de reparación con MSCs, indicando que todavía no se ha entrado de lleno en la fase de remodelación necesaria para la reparación, pero que el ambiente que ofrecen las células implantadas mejora ya en el tercer mes las propiedades biomecánicas del tejido reparado. Por tanto, el empleo o no de MSCs, utilizando un mismo injerto (membrana OrthAdapt®) ofrece diferencias biomecánicas e histológicas en el tejido reparado, indicando que la adicción de MSCs condiciona el ambiente reparativo. Dentro de los efectos indirectos que producen las MSCs, aunque todavía no están completamente esclarecidos los mecanismos por los cuales las MSCs conducen a la curación del tendón dañado y reparado, si es conocido la capacidad que

tienen de liberar factores de crecimiento (Caplan 2005), y producir efectos antiinflamatorios (Barry *et al* 2005) en el sitio del daño, lo cual puede ayudar a crear un mejor ambiente de curación y posteriormente llevar a la regeneración del tejido dañado (Schnabel *et al* 2009).

(Gulotta *et al* 2009) publicaron un modelo de manguito rotador desarrollado en ratas jóvenes donde al mes de la reparación en el sitio de inserción, no encontraron diferencias en cuanto a la estructura, composición, o fuerza del tendón reparado en los animales inyectados con MSCs en un vehículo de fibrina, en comparación con los controles donde solo se inyectó vehículo, aunque si encontraron presencia y actividad metabólica de las MSCs en el lugar de la reparación. Concluyen señalando que en el sitio de reparación, puede haber una pérdida celular o de las señales moleculares necesarias para inducir la diferenciación de las células implantadas, por lo que apuestan hacia la adición necesaria de factores de crecimiento y diferenciación para hacer que este sistema de reparación funcione. Sin embargo este estudio no muestra un análisis en puntos temporales más tardíos a la reparación, lo cual puede ser de vital importancia para que comience el proceso de remodelación, ya que si nos fijamos solo en los puntos iniciales de este estudio, observaríamos algo parecido, es decir, la adición de MSCs en este tipo de lesiones, no mejoraría la estructura histológica ni las propiedades biomecánicas del tejido reparado. Por otro lado (Nourissat *et al* 2010) empleando también animales jóvenes en un modelo de reparación del tendón de Aquiles como ya se ha comentado anteriormente, observaron una mejoría de las propiedades biomecánicas y morfológicas a los 45 días después de la reparación mediante la inyección de MSCs en un vehículo de fibrinogeno bovino en el lugar del daño antes de suturar, comparados con otros sistemas celulares y con la cirugía solo con sutura. además en el estudio de Gulotta *et al*, concentraban las MSCs en el sitio de reparación,

pero disminuían con el tiempo. Nourissat *et al*, afirman que estas células pueden inducir la producción de una nueva entesis sin necesidad de diferenciación, pero sí por la liberación de factores paracrinos que hagan reclutar células del huésped que restaure la entesis. Por tanto, es evidente que el factor tiempo es de suma importancia, incluso mucho más al considerar el modelo animal de este estudio, que es una rata de edad avanzada, donde las capacidades de curación y recuperación pueden transcurrir más lentamente. Además las MSCs empleadas son de ratas de la misma edad, por lo que su fuerza curativa también están disminuidas posiblemente como consecuencia del envejecimiento. En los estudios de Gulotta *et al*, y Nourissat *et al*, las reparaciones se realizaron en la misma cirugía donde se creó el defecto, y en el presente estudio, las reparaciones comenzaron a partir de un mes después de que se creara el defecto, y la curación bajo estas condiciones, parecida a una lesión crónica, es peor que las condiciones en las lesiones agudas, aunque las razones no están claras. Lo que sí se sabe es que en las tendinopatías crónicas muestran degeneración coincidente con infiltración de vasos, proliferación celular y baja tasa de reparación (Astrom *et al* 1995), y en las tendinopatías agudas, no es tan evidente la vascularización o la proliferación celular, aunque el tejido también se asocia a degeneración (Kannus *et al* 1991).

Los estudios a tiempos cortos (2,4 y 6 semanas) de (Kim *et al* 2012), a diferencia de los estudios de Gulotta *et al*, en la reparación de un defecto agudo creado en el manguito rotador de conejo, usando MSCs en un “scaffold” de colágeno de tipo I, comprobaron en primer lugar que las MSCs sobrevivían en el “scaffold” y además éstas, propiciaban la generación de más colágeno de tipo I en la reparación. En el estudio presente también mejora la producción de colágeno de tipo I, propio del animal, observado gracias al uso de anticuerpos monoclonales específicos solo de rata, tras la implantación de MSCs en un “scaffold” de colágeno de tipo I equino.

Uno de los objetivos de este estudio era aportar dentro de la Terapia Regenerativa del tendón supraespinoso, un nuevo injerto, que fuera seguro para el uso humano y además mejorarlo con el empleo de MSCs alogénicas expandidas *in vitro*. No se quiso añadir ninguna manipulación sustancial más para mejorar el sistema, pensando en el salto de la investigación básica a la medicina traslacional humana que suponga una extrapolación más fácil y segura. Pero todavía pueden añadirse mejoras que aunque compliquen el sistema, pueden proporcionar buenos resultados y de cara al futuro, puedan aplicarse al sistema de reparación con MSCs. Por ejemplo el uso de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) o el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) se han usado para promover la curación del tendón o favorecer la proliferación de células del tendón (Murphy *et al* 1997; Dahlgren *et al* 2002; Costa *et al* 2006; Mishra y Pavelko 2006; Ide *et al* 2009; Hee *et al* 2011; Shah *et al* 2013). Otros autores como (Pauly *et al* 2011) investigaron también con las proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 7 (BMP-2 y BMP-7) analizando su influencia en la actividad celular del tenocito (tenocitos aislados de manguito rotador humano) y en la expresión y producción de matriz, comprobando que la BMP-7 aporta incremento significativo de la producción de colágeno tipo I. (Seeherman *et al* 2008) evaluaron la capacidad de curación de la proteína morfogenética del hueso humana recombinante (rhBMP-12) en un modelo de reparación del manguito rotador de oveja, administrada en un vehículo de colágeno (esponja de colágeno), comprobando que la rhBMP-12 aceleraba la curación del tendón dañado. (Berasi *et al* 2011) analizaron las diferentes actividades de las BMPs, concluyendo que la BMP-2 es osteogénica, la BMP-12 y BMP-13 son tenocíticas, e inducen la expresión de genes diferentes, la BMP-2 los relacionados con los marcadores

de osteoblastos y la BMP-12 y 13, con los genes específicos de tendón. Siguiendo esta línea otros autores como (Lee *et al* 2011) analizaron la diferenciación tenocítica de las MSCs de médula ósea de rata tratadas con BMP-12 *in vitro*, comprobando que se obtenía un fenotipo parecido al tenocito y que permanecía al implantarse dichas células en una esponja de colágeno, en un modelo *in vivo* con un defecto creado en el tendón calcáneo. Es decir de por sí, las MSCs ejercen su acción, y con este estudio se comprueba que se puede mejorar su acción, a través de la BMP-12, proporcionando un fenotipo cercano al tenocito. Sin embargo (Gulotta *et al* 2011) al implantar MSCs transducidas con el gen de la BMP-13 mediante un adenivirus, para sobreexpresar BMP-13, no observaron mejoría en términos biomecánicos, en la reparación en un modelo agudo de lesión del manguito rotador de rata. Sin embargo este mismo grupo de investigación (Gulotta *et al* 2011) al transducir en un modelo de lesión aguda hecho en rata, MSCs con scleraxis (Scx), observaron una mejoría en las propiedades biomecánicas del tendón supraespinoso reparado, caracterizado sobre todo por una presencia mayor de fibrocartilago que otorgaba según estos autores más fuerzas tensil.

En resumen, este estudio ha desarrollado un modelo adecuado de lesión crónica del tendón supraespinoso con características similares a la clínica humana, y ha puesto de manifiesto que el tratamiento con MSCs es seguro y no hay formación de tejido óseo ectópico. Además los resultados sugieren que el uso terapéutico de MSCs alogénicas en membranas de colágeno tipo I para la reparación del manguito rotador parece ser un tratamiento prometedor pero a largo plazo, que todavía debería estudiarse en profundidad. Entre las cuestiones más relevantes de este estudio destacan, la pobre organización de las fibras de colágeno al tercer mes de reparación con MSCs, por tanto ampliar el estudio a tiempos más largos, cuestiones sobre la dosis óptima de MSCs,

diferentes tipos de material utilizado como matriz, y la edad del donante, que se necesita abordar en futuros estudios. Este conocimiento propiciará futuros avances que mejoraran la regeneración del tendón supraespinoso dañado en el manguito rotador.

# **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de lesión crónica del tendón supraespinoso desarrollado en rata, es adecuado para el estudio de estas lesiones, porque mimetiza en su gran parte, las características clínicas de los desgarros totales del tendón supraespinoso humano, que sobre todo ocurren en el anciano de forma crónica.
2. El examen macroscópico de las piezas escapulo-humerales del modelo de lesión crónica, mostraron una unidad musculotendinosa rígida, donde el tendón supraespinoso se encontraba retraído, dejando un hueco en el lugar de la lesión, en la inserción hueso-tendón, incluso a tres meses, no observándose regeneración espontánea del tendón SE.
3. El examen histológico del modelo de lesión crónica, mostró en los restos tendinosos, un predominio de células con núcleo ovoide en un tejido con fibras colágenas desorganizadas e hipervascular.
4. El análisis biomecánico del modelo de lesión crónica mostró una menor resistencia al fallo y una menor rigidez, conforme avanza el tiempo del estudio.
5. Frente a la cirugía convencional mediante el uso de sutura con túnel transóseo, la reparación con la membrana OrthADAPT®, a pesar del aumento de vascularidad inicial, ofreció en el tercer mes de reparación, un tejido más organizado fibrilarmente, aunque la proporción de colágeno de tipo I no aumentó, frente al colágeno de tipo III.
6. La reparación con la membrana OrthADAPT®, no se tradujo en una mejoría biomecánica, en términos de carga máxima y rigidez, con respecto a la reparación convencional.
7. La introducción de MSCs alogénicas en la membrana de colágeno tipo I OrthADAPT® para la reparación de la lesión crónica en el modelo de rata,

produjo un tejido con mejores características biomecánicas en términos de carga máxima y rigidez del tendón supraespinoso, frente a la cirugía convencional y la reparación solo con membrana, a tres meses de tratamiento.

8. La introducción de MSCs alogénicas en la membrana de colágeno tipo I OrthADAPT® para la reparación de la lesión crónica en el modelo de rata mostró histológicamente, a tres meses de reparación, que todavía existía una desorganización fibrilar, pero con un índice de colágeno de tipo I superior al resto de reparaciones. Además la presencia de vasos pequeños y una elevada celularidad seguía presente discretamente en el tercer mes de reparación, posiblemente indicativo, que todavía está ocurriendo en el sitio de reparación del proceso de remodelado.
9. La entesis, la transición hueso-tendón mostraba tras la reparación con MSCs, una capa de fibrocartílago más parecida a un tendón sano.
10. Este estudio defiende que las MSCs podrían estar aumentando este proceso de remodelación, permitiendo un depósito mayor de colágeno tipo I y mejorando el cuadro inflamatorio, aumentando por tanto, la calidad reparativa.

## **SUMMARY**

### **INTRODUCTION**

The rotator cuff is formed by a group of muscles and tendons that stabilize the glenohumeral joint and enable the normal movement of the shoulder. Rotator cuff tears of the shoulder are a common cause of pain, disability and shoulder osteoarthritis. Common surgical procedures, although adequate in the short term, are often unsatisfactory in the long term presenting a high incidence of failure.

Clinical failure in degenerative lesions has been linked to preoperative factors such as age, reduced acromio-humeral distance, tear size, chronically inferior tissue quality, tendon retraction or surgical factors such as large repair tension. All of these factors have a marked effect on biological healing and remodeling, which eventually influence the clinical outcome.

Therefore, there is a need for new approaches that improve the healing process through mechanical re-enforcement and also result in enhanced natural healing, especially at the insertion site. In this context, different therapies in the field of tendon regeneration such as the local injection of MSCs and growth factors or tissue engineering through the use of bioactive biological membranes have been tested in different animal models. These approaches have been reported to improve tendon repair, although the complete regeneration of the tendon has never been achieved.

The principal purpose of this study was to assess the efficacy of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in the healing process of rotator cuff using a rat model. In the current study, we developed and validated a massive chronic rotator cuff tear rat model for exploring different strategies of repair. We compared three different strategies: a surgical procedure that consists of a modified Masson-Allen stitch using a suture, a surgical procedure using a commercially biocomposite scaffold consisting of type I

collagen available for humans and a surgical procedure using the type I collagen scaffold in combination with allogeneic MSCs.

## **MATERIALS AND METHODS**

A total of 120 Sprague-Dawley rats (9 months old) were included in this study. Thirty rats were used to reproduce an animal model of chronic rotator cuff tears and another ninety were used to explore different therapeutic repair approaches (30 per group) in the developed model. The selection of the rat as a model was based on observed anatomical similarities between rat and human shoulder joints. MSCs were obtained from the femoral channel of age-matched rats (9 months old) prior to the study.

A chronic rotator cuff tear injury model was developed by unilaterally detaching the supraspinatus (SE) tendon of Sprague-Dawley rats (9 months old). At one month post-injury, the tears were repaired by:

- a) Classical surgery using a suture (n=10).
- b) Type I collagen membranes (OrthADAPT® membrane) (n=10).
- c) Type I collagen membranes (OrthADAPT® membrane) +  $1 \times 10^6$  allogeneic MSCs (n=10).

Lesion restoration was evaluated at one, two and three months post-injury by biomechanical (Instron 5866), histological (collagen fiber orientation, vascularity and cellular elements) and immunohistochemical (collagen type I and III ) criteria.

The Mann-Whitney U non-parametric test was used for statistical comparisons. P values less than 0.05 were considered significant.

## **RESULTS**

### **Establishment of the chronic rotator tear animal model.**

Biomechanically testing of the SE injured tendon showed the load to failure (N) and stiffness (N/mm) decreased progressively at each time point from one to three months, whereas deformation did not change with time. Macroscopic examinations of the specimens at the time of dissection at one two and three months revealed a retracted musculotendinous unit and scar tissue adhesions to the surrounding tissue. Initially, at one month the vasculature in the injured group compared to healthy tendon was increased and disorganized. These differences were decreased at three months, although the injured tendons never reached normal levels. In regard to collagen fiber organization, we observed an abnormal fiber pattern. The cell density was progressively higher with time post-detachment. Additionally, we observed a gap consistently formed over time between the end of the tendon and the bone insertion site in all animals. The presence of a gap that did not fill with disorganized fibrotic scar tissue indicates that the injured animal model has many features that are similar to a human chronic lesion.

### **Different repair strategies of the SE injured tendon**

Biomechanical testing revealed:

- 1) The tendon load to failure decreased over time in the suture group, whereas was significantly improved by MSC group ( $p=0.0238$ ).
- 2) The tendon load to failure was significantly improved at three months in the MSC compared to membrane group ( $p=0.0357$ ).
- 3) The tendon stiffness in the suture group significantly decreased over time ( $p=0.0498$ ) whereas was significantly higher in MSC group at three months ( $p=0.0498$ ) compared to the suture group.
- 4) The tendon deformation was similar in all groups.

Histological analysis shown, animals treated with suture had cellular fibrous tissue with a disorganized fiber pattern that was maintained over time. In regard to the cellularity, cells with thin nuclei (similar to the morphology of comparable resident tendon fibers) and rounded nuclei (normally seen in cells actively synthesizing an extracellular matrix) were present during the three months. The vascularity was high and remained unchanged over time. In contrast, rats treated with the collagen membrane, initially showed a dramatic increase in all of the studied histological parameters that was followed by a progressive decrease over time. At three months, the degree of vascularity and cellular elements had nearly reached normal values. In addition, the cells present were mainly thin nucleated cells. However, an abnormal pattern of collagen fiber organization, characterized by a lower expression of type I collagen relative to type III collagen, was still evident at three months.

With respect to animals treated with the collagen membrane and MSCs, the initial changes in the studied histological parameters were less dramatic in comparison to animals treated exclusively with the membrane. Collagen fiber orientation and cellularity values did not decrease over time, as seen in the membrane treatment group but actually increased.

The enthesis, bone-cartilage junction, show a fibrocartilage zone more like the native tendon.

## **DISCUSSION**

In spite of the great advances in surgical procedures for the treatment of rotator cuff tears, the occurrence of re-rupture is still unacceptable in large and massive injuries. Although the cause of this poor healing rate is not well known, chronic degenerative lesions are most often associated with the elderly, and the elevated tension

to which the suture is subjected makes the prognosis for healing decidedly more complicated.

In summary, this study demonstrated that tendon treatment with MSCs significantly improved the tendon's biomechanical properties and resulted in an augmented remodeled appearance compared to the other two methods at three months. It is quite possible that the healing process of the healthy state of the tendon is slowed, which could be explained by the repair animal model used in this study.

Although the exact mechanism for the positive influence of MSCs on tendon healing remains uncertain, it is well known that MSCs have the capacity to differentiate into tenocytes and also possess the capability to release growth factors and exhibit anti-inflammatory effects at the site of injury, which could help provide a better healing environment and eventually lead to the regeneration of damaged tissue.

Overall, this study demonstrate that MSC treatment is safe and does not result in ectopic bone formation. Our findings also suggest that the therapeutic use of allogeneic MSCs in type I collagen membranes for the repair of rotator cuff tears seems to be the most promising treatment in the long term. Nevertheless, due to the poor organization of the collagen fibers, questions concerning an optimum MSCs dose, the effective time period, different types of matrix material, and donator age, remain unanswered and will need to be addressed in future studies. This knowledge will hopefully lead to further advances that will improve the regeneration of the injured SE tendon in the rotator cuff.

## FINANCIACIÓN Y APORTACIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo ha sido realizado gracias al proyecto de Investigación financiado por el Instituto Carlos III (FIS) EC07/90208. Existe una línea de trabajo conjunta entre el COT (Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología) y la UGC-REU (Unidad de Gestión Clínica de Reumatología) centrada en el estudio de enfermedades musculoesqueléticas, cuya finalidad está orientada al enfoque traslacional y la terapia regenerativa, donde este estudio forma parte de una visión más amplia, que englobaría también las lesiones agudas del tendón supraespinoso.

La producción científica de este estudio se ha reflejado en los siguientes eventos:

### **Comunicaciones científicas en congresos nacionales:**

- Pilar Tornero-Esteban, José Ramón Lamas, Cruz Rodríguez-Bobada, **José Antonio Hoyas**, Esther Villafuertes, Fernando Marco, Benjamín Fernández-Gutiérrez. Desarrollo de un modelo experimental en rata de síndrome del manguito de los rotadores por rotura del tendón supraespinoso del hombro. XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad de Reumatología Española (SER).Tarragona. 19-21 Mayo 2010.
- Pilar Tornero-Esteban, José Ramón Lamas, Cruz Rodríguez-Bobada, **José Antonio Hoyas**, Esther Villafuertes, Fernando Marco, Benjamín Fernández-Gutiérrez. Modelo experimental de lesión-reparación del manguito rotador en rata. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad de Reumatología Española (SER). Málaga. 10-13 Mayo 2011.
- Pilar Tornero-Esteban, José Ramón Lamas, Cruz Rodríguez-Bobada, **José Antonio Hoyas**, Esther Villafuertes, Fernando Marco, Benjamín Fernández-Gutiérrez. Tratamiento de las lesiones del tendón supraespinoso en un modelo murino mediante el uso de células madre mesenquimales. XV Congreso de la

Sociedad de Reumatología de la Comunidad de Madrid (SORCOM). Madrid.  
15-16 Diciembre de 2011.

**Comunicaciones científicas en congresos internacionales:**

- Pilar Tornero-Esteban, Esther Villafuertes, **José Antonio Hoyas**, Fernando Marco, Benjamín Fernández-Gutiérrez. Development of a rat model of shoulder arthropathy secondary to chronic rotator cuff tears. 2009 world congress on osteoarthritis (OARSI). Montreal (Canadá). 10-13 Septiembre de 2009.
- Pilar Tornero-Esteban, Cruz Rodriguez-Bobada, **José Antonio Hoyas**, Esther Villafuertes, Fernando Marco, Benjamín Fernández-Gutiérrez. Long-term efficacy of Mesenchymal Stem Cells implantation in combination with type I collagen membrane: a rat experimental model of rotator cuff tears. 2012 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). Barcelona (España). 26-29 Abril de 2012.

También existe una aportación científica en una **revista indexada** que está en proceso de revisión:

Ref. No.: BIOMAT-S-14-00307

Pilar Tornero-Esteban; Esther Villafuertes; Jose Antonio Hoyas; Cruz Rodriguez-Bobada; Yamila Lopez-Gordillo; Francisco J Rojo; Gustavo V Guinea; Anna Paleczny; Yaiza Lopez-Morales; Fernando Marco; Benjamin Fernandez-Gutierrez. Efficacy of supraspinatus tendon repair using Mesenchymal Stem Cells in combination with a type I collagen membrane. Biomaterials.



# **7. BIBLIOGRAFÍA**



Adams JE, Zobitz ME, Reach JS Jr, An KN, Steinmann SP. Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model. *Arthroscopy*. 2006 Jul;22(7):700-9.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-22.

Ahmad CS, Stewart AM, Izquierdo R, Bigliani LU. Tendon-bone interface motion in transosseous suture and suture anchor rotator cuff repair techniques. *Am J Sports Med*. 2005;33(11):1667-71.

Almekinders LC, Temple JD. Etiology, diagnosis, and treatment of tendonitis: an analysis of the literature. *Med Sci Sports Exerc*. 1998 Aug;30(8):1183-90.

Almekinders LC, Vellema JH, Weinhold PS. Strain patterns in the patellar tendon and the implications for patellar tendinopathy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2002 Jan;10(1):2-5.

Anakwenze OA, Baldwin K, Milby AH, Warrender W, Shulman B, Abboud JA. Arthroscopic repair of large rotator cuff tears using the double-row technique: an analysis of surgeon experience on efficiency and outcomes. *J Shoulder Elbow Surg*. 2013 Jan;22(1):26-31.

Anderson K, Boothby M, Aschenbrener D, van Holsbeeck M. Outcome and structural integrity after arthroscopic rotator cuff repair using 2 rows of fixation: minimum 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2006;34 (12):1899-905.

Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology*. 2004;41(3-4):469-76.

Aoki M, Miyamoto S, Okamura K, Yamashita T, Ikada Y, Matsuda S. Tensile properties and biological response of poly(L-lactic acid) felt graft: an experimental trial for rotator-cuff reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004 Nov 15;71(2):252-9.

Aoki M, Oguma H, Fukushima S, Ishii S, Ohtani S, Murakami G. Fibrous connection to bone after immediate repair of the canine infraspinatus: the most effective bony surface for tendon attachment. *J Shoulder Elbow Surg*. 2001 Mar-Apr;10(2):123-8.

- Apreleva M, Ozbaydar M, Fitzgibbons PG, Warner JJ. Rotator cuff tears: the effect of the reconstruction method on three-dimensional repair site area. *Arthroscopy*. 2002;18(5):519-26.
- Arteaga A, García C, González A, Ocaña C, Larraceta C, Rodríguez Vigil C. Valoración clínica de la enfermedad del manguito rotador. *Rehabilitación (Madr)* 1998; 32:171-80.
- Aström M, Rausing A. Chronic Achilles tendinopathy. A survey of surgical and histopathologic findings. *Clin Orthop* 1995;316:151–64.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90.
- Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 1998;76:253–65.
- Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL: Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003, 21(3):420-431.
- Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, *et al.* Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999;5:267-77.
- Badhe SP, Lawrence TM, Smith FD, Lunn PG. An assessment of porcine dermal xenograft as an augmentation graft in the treatment of extensive rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg*. 2008 Jan-Feb;17(1 Suppl):35S-39S.
- Bagnaninchi PO, Yang Y, El Haj AJ, Maffulli N. Tissue engineering for tendon repair. *Br J Sports Med*. 2007 Aug;41(8):e10; discussion e10.
- Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* 1998;106:1–56.
- Baker CL, Liu SH. Comparison of open and arthroscopically assisted rotator cuff repairs. *Am J Sports Med*. 1995 Jan-Feb;23(1):99-104.

Bank RA, TeKoppele JM, Oostingh G, Hazleman BL, Riley GP. Lysylhydroxylation and non-reducible cross-linking of human supraspinatus tendon collagen: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:35–41.

Bank RA, Verzijl N, Lafeber FP, TeKoppele JM. Putative role of lysyl hydroxylation and pyridinoline cross-linking during adolescence in the occurrence of osteoarthritis at old age. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:127–34.

Barber FA, Aziz-Jacobo J. Biomechanical testing of commercially available soft-tissue augmentation materials. *Arthroscopy*. 2009 Nov;25(11):1233-9.

Barber FA, Herbert MA, Coons DA. Tendon augmentation grafts: biomechanical failure loads and failure patterns. *Arthroscopy*. 2006 May;22(5):534-8.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan;30(1):42-8.

Bartolozzi A, Andreychik D, Ahmad S. Determinants of outcome in the treatment of rotator cuff disease. *Clin Orthop Relat Res* 1994: 90-97.

Barton E.R, Gimbel J.A, Williams G.R, and Soslowsky L.J. Rat supraspinatus muscle atrophy after tendon detachment. *J Orthop Res* 23, 259, 2005.

Baums MH, Buchhorn GH, Spahn G, Poppendieck B, Schultz W, Klinger HM. Biomechanical characteristics of single-row repair in comparison to double-row repair with consideration of the suture configuration and suture material. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008 Nov;16(11):1052-60.

Behrens SB, Bruce B, Zonno AJ, Paller D, Green A. Initial fixation strength of transosseous-equivalent suture bridge rotator cuff repair is comparable with transosseous repair. *Am J Sports Med*. 2012;40(1):133-40.

Benjamin M, Qin S, Ralphs JR. Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys. *J Anat* 1995;187:625–33.

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, berthio JM, Gourmelon P, Aiqueperse J. Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 2004; 103, 3313-3319

Ben-Yishay A, Zuckerman JD, Gallagher M, Cuomo F. Pain inhibition of shoulder strength in patients with impingement syndrome. *Orthopedics*. 1994 Aug;17(8):685-8.

Berenson MC, Blevins FT, Plaas AHK, Vogel KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. *J Orthop Res* 1996;14:518–25.

Bey MJ, Kline SK, Baker AR, McCarron JA, Iannotti JP, Derwin KA. Estimation of dynamic, in vivo soft-tissue deformation: experimental technique and application in a canine model of tendon injury and repair. *J Orthop Res*. 2011 Jun;29(6):822-7.

Bicknell RT, Harwood C, Ferreira L, *et al*. Cyclic loading of rotator cuff repairs: an in vitro biomechanical comparison of bioabsorbable tacks with transosseous sutures. *Arthroscopy*. 2005;21(7):875-80.

Bigliani LU, Levine WN. Subacromial impingement syndrome. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79A:1854-68.

Bigliani LU, Ticker JB, Flatow EL, Soslowky LJ, Mow VC. The relationship of acromial architecture to rotator cuff disease. *Clin Sports Med*. 1991 Oct;10(4):823-38.

Bigliani LU. The morphology of the acromion and its relationship to rotator cuff tears. *Orthop Trans* 1986; 10: 206.

Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE. Macroscopic ‘degeneration’ of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J* 1998;30:534–9.

Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 1990;95:649–57.

Bishop J, Klepps S, Lo IK, Bird J, Gladstone JN, Flatow EL. Cuff integrity after arthroscopic versus open rotator cuff repair: a prospective study. *J Shoulder Elbow Surg* 2006; 15: 290-299.

Bjornsson HC, Norlin R, Johansson K, Adolfsson LE. The influence of age, delay of repair, and tendon involvement in acute rotator cuff tears: structural and clinical outcomes after repair of 42 shoulders. *Acta Orthop* 2011; 82: 187-192.

- Boileau P, Brassart N, Watkinson DJ, Carles M, Hatzidakis AM, Krishnan SG. Arthroscopic repair of full-thickness tears of the supraspinatus: does the tendon really heal?. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Jun;87(6):1229-40.
- Bokor DJ, Hawkins RJ, Huckell GH, Angelo RL, Schickendantz MS. Results of nonoperative management of full-thickness tears of the rotator cuff. *Clin Orthop* 1993;294:103-8.
- Bond JL, Dopirak RM, Higgins J, Burns J, Snyder SJ. Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a GraftJacket allograft: technique and preliminary results. *Arthroscopy.* 2008;24:403–409.
- Boomsma RA, eenen L. Mesenchymal Stem Cells Secrete Multiple Cytokines That Promote Angiogenesis and Have Contrasting Effects on Chemotaxis and Apoptosis. *PLoS ONE* 2012 ; 7(4): e35685.
- Bray RC, Rangayyan RM, Frank CB. Normal and healing ligament vascularity: a quantitative histological assessment in the adult rabbit medial collateral ligament. *J Anat.* 1996 Feb;188 ( Pt 1):87-95.
- Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types: Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* 1992;282:250–72.
- Burkhart SS, Esch JC, Jolson RS. The rotator crescent and rotator cable: an anatomic description of the shoulder's "suspension bridge". *Arthroscopy* 1993; 9: 611-616.
- Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Shearn JT, Gooch C, Awad H. Functional tissue engineering for tendon repair. A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res.* 2008 Jan; 26(1):1-9.
- Campbell MA, Winter AD, Ilic MZ, Handley CJ. Catabolism and loss of proteoglycans from cultures of bovine collateral ligament. *Arch Biochem Biophys* 1996;328:64–72.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 1;98(5):1076-84
- Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9:641-650.
- Carlstedt CA. Mechanical and chemical factors in tendon healing. *Acta Orthop Scand* 1987;58(Suppl. 224):7–75.

Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L, Jr., De Paula AM, Pacheco MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 659-665.

Cawston TE. Proteinases and inhibitors. *Br Med Bull* 1995;51: 385–401.

Chang CH, Chen CH, Su CY, Liu HT, Yu CM. Rotator cuff repair with periosteum for enhancing tendon-bone healing: a biomechanical and histological study in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Dec;17(12):1447-53.

Chard MD, Cawston TE, Riley GP, Gresham A, Hazleman BL. Rotator cuff degeneration and lateral epicondylitis: a comparative histological study. *Ann Rheum Dis* 1994;53:30–4.

Chen CH, Chang CH, Wang KC, Su CI, Liu HT, Yu CM, Wong CB, Wang IC, Whu SW, Liu HW. Enhancement of rotator cuff tendon-bone healing with injectable periosteum progenitor cells-BMP-2 hydrogel in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011 Sep;19(9):1597-607.

Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M. Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices.* 2009 Jan;6(1):61-73.

Chen JM, Willers C, Xu J, Wang A, Zheng MH. Autologous tenocyte therapy using porcine-derived bioscaffolds for massive rotator cuff defect in rabbits. *Tissue Eng.* 2007 Jul;13(7):1479-91.

Chhabra A, Goradia VK, Francke EI, *et al.* In vitro analysis of rotator cuff repairs: a comparison of arthroscopically inserted tacks or anchors with open transosseous repairs. *Arthroscopy.* 2005;21(3):323-7.

Cho NS, Yi JW, Lee BG, Rhee YG. Retear patterns after arthroscopic rotator cuff repair: single-row versus suture bridge technique. *Am J Sports Med* 2010; 38: 664-671.

Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:74-81.

Codman EA, Akerson IB. The pathology associated with rupture of the supraspinatus tendon. *Ann Surg* 1931; 94: 348-359.

Codman EA. Complete rupture of the supraspinatus tendon. Operative treatment with report of two successful cases. *Boston Med Surg J.* 1911; 164:708-10.

Codman EA. *The shoulder.* 2nd ed. Thomas Todd, Boston 1934.

Cofield RH, Parvizi J, Hoffmeyer PJ, Lanzer WL, Ilstrup DM, Rowland CM. Surgical repair of chronic rotator cuff tears. A prospective long-term study. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A: 71-77.

Cole B.J, Gomoll A.H, Yanke A, Pylawka T, Lewis P, MacGillivray J.D, and Williams J.M. Biocompatibility of a polymer patch for rotator cuff repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15, 632, 2007.

Coleman SH, Fealy S, Ehteshami JR, MacGillivray JD, Altchek DW, Warren RF, Turner AS. Chronic rotator cuff injury and repair model in sheep. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Dec;85-A(12):2391-402.

Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(4): 1196-202.

Connor PM, Banks DM, Tyson AB, Coumas JS, D'Alessandro DF. Magnetic resonance imaging of the asymptomatic shoulder of overhead athletes: a 5-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 2003;31(5):724-7.

Coons DA, Alan Barber F. Tendon graft substitutes-rotator cuff patches. *Sports Med Arthrosc.* 2006 Sep;14(3):185-90.

Costa MA, Wu C, Pham BV, Chong AK, Pham HM, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue Eng.* 2006 Jul;12(7):1937-43.

Crovace A, Lacitignola L, Francioso E, Rossi G. Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2008; 21: 329-336.

Cummins CA, Appleyard RC, Strickland S, Haen PS, Chen S, Murrell GA. Rotator cuff repair: an ex vivo analysis of suture anchor repair techniques on initial load to failure. *Arthroscopy.* 2005 Oct;21(10):1236-41.

Dahlgren LA, van der Meulen MC, Bertram JE, Starrak GS, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res* 2002;20:910-9.

Davidson JF, Burkhart SS, Richards DP, Campbell SE. Use of preoperative magnetic resonance imaging to predict rotator cuff tear pattern and method of repair. *Arthroscopy*. 2005;21(12):1428.

Davidson PA, Rivenburgh DW. Rotator cuff repair tension as a determinant of functional outcome. *J Shoulder Elbow Surg*. 2000;9(6):502-6.

DeGroot J, Verzijl N, Jacobs KM *et al*. Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:720-6.

Dejardin LM, Arnoczky SP, Clarke RB. Use of small intestinal submucosal implants for regeneration of large fascial defects: an experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res*. 1999 Aug;46(2):203-11.

Dejardin LM, Arnoczky SP, Ewers BJ, Haut RC, Clarke RB. Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa. Histologic and mechanical evaluation in dogs. *Am J Sports Med*. 2001 Mar-Apr;29(2):175-84.

Demirhan M, Atalar AC, Kilicoglu O. Primary fixation strength of rotator cuff repair techniques: a comparative study. *Arthroscopy*. 2003;19(6):572-6.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73-82.

Derwin KA, Baker AR, Iannotti JP, McCarron JA. Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Feb;16(1):21-30.

Derwin KA, Baker AR, Spragg RK, Leigh DR, Iannotti JP. Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair. Biomechanical, biochemical, and cellular properties. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Dec;88(12):2665-72.

Derwin KA, Codsí MJ, Milks RA, Baker AR, McCarron JA, Iannotti JP. Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 May;91(5):1159-71.

- Deutsch A, Kroll DG, Hasapes J, Staewen RS, Pham C, Tait C. Repair integrity and clinical outcome after arthroscopic rotator cuff repair using single-row anchor fixation: a prospective study of single-tendon and two-tendon tears. *J Shoulder Elbow Surg.* 2008 Nov-Dec;17(6):845-52.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3838-43.
- Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C: Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2009, 5:392-399.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8:315-317.
- Dourte LM, Perry SM, Getz CL, Soslowsky LJ. Tendon properties remain altered in a chronic rat rotator cuff model. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Jun;468(6):1485-92.
- Duance VC, Restall DJ, Beard H, Bourne FJ, Bailey AJ. The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1977;79:248–52.
- Dugas JR, Campbell DA, Warren RF, *et al.* Anatomy and dimensions of rotator cuff insertions. *J Shoulder Elbow Surg* 2002; 11: 498-503.
- Duralde XA, Greene RT. Mini-open rotator cuff repair via an anterosuperior approach. *J Shoulder Elbow Surg.* 2008 Sep-Oct;17(5):715-21.
- Ellman H, Hanker G, Bayer M. Repair of the rotator cuff. End-result study of factors influencing reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 1986; 68:1136-44.
- Ellman H. Eds *Arthroscopic shoulder surgery and related disorders.* Philadelphia: Lea Febriger 1993; 98-119.
- Ellman H. Surgical treatment of rotator cuff ruptures. Watson M. eds *Surgical disorders of the shoulder* 1991; 283-28.

Epstein RE, Schweitzer ME, Friedman BG, *et al.* Hooked acromion: prevalence on MR images of painful shoulders. *Radiology* 1993; 187: 479.

Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res* 2002;20:1352-7.

Evans JH, Barbenel JC. Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J* 1975;7:1-8.

Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem* 1984;53:717-48.

Fabis J, Danilewicz M, Omulecka A. Rabbit supraspinatus tendon detachment: effects of size and time after tenotomy on morphometric changes in the muscle. *Acta Orthop Scand.* 2001 Jun;72(3):282-6.

Fallon J, Blevins FT, Vogel K, *et al.* Functional morphology of the supraspinatus tendon. *J Orthop Res* 2002; 20 (5): 920.

Fan L, Sarkar K, Franks DJ, Uthoff HK. Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcif Tissue Int* 1997;61:223-9.

Fealy S, Rodeo SA, MacGillivray JD, Nixon AJ, Adler RS, Warren RF. Biomechanical evaluation of the relation between number of suture anchors and strength of the bone-tendon interface in a goat rotator cuff model. *Arthroscopy.* 2006 Jun;22(6):595-602.

Fedorczyk JM. Tendinopathies of the elbow wrist and hand: histopathology and clinical considerations. *J Hand Ther.* 2012 Apr-Jun;25(2):191-200.

Franceschi F, Longo UG, Ruzzini L, Marinozzi A, Maffulli N, Denaro V. Simultaneous arthroscopic implantation of autologous chondrocytes and high tibial osteotomy for tibial chondral defects in the varus knee. *Knee.* 2008 Aug;15(4):309-13.

Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, SacheA, Bouchet S, Thierry D. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006; 24, 1020-1029.

Fridenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblasts precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4, 267-274.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, and Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263-272.

Frieman BG, Albert TJ, Fenlin JM Jr. Rotator cuff disease: a review of diagnosis, pathophysiology, and current trends in treatment. *Arch Phys Med Rehabil*. 1994 May;75(5):604-9.

Fukuda H, Hamada K, Yamanaka K. Pathology and pathogenesis of bursal-side rotator cuff tears viewed from en bloc histologic sections. *Clin Orthop Relat Res*. 1990 May;(254):75-80.

Fukuta S, Oyama M, Kvalkovich K, Fu FH, Niyibizi C. Identification of types 11, IX and X collagens at the insertion site of the bovine Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998;17: 65-73.

Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Yamane S, Masuko T, Minami A, Harada K, Tamura H, Tokura S, Nishimura S. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Sep 1;74(3):338-46.

Funakoshi T, Majima T, Suenaga N, Iwasaki N, Yamane S, Minami A. Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular matrix. *J Shoulder Elbow Surg*. 2006 Jan-Feb;15(1):112-8.

Galatz L.M, Rothermich S.Y, Zaegel M, Silva M.J, Havlioglu N, and Thomopoulos S. Delayed repair of tendon to bone injuries leads to decreased biomechanical properties and bone loss. *J Orthop Res* 23, 1441, 2005.

Galatz LM, Ball CM, Teefey SA, Middleton WD, Yamaguchi K. The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86(2):219-24.

Galatz LM, Griggs S, Cameron BD, Iannotti JP. Prospective longitudinal analysis of postoperative shoulder function : a ten-year follow-up study of full-thickness rotator cuff tears. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A: 1052-1056.

Galatz LM, Sandell LJ, Rothermich SY, Das R, Mastny A, Havlioglu N, Silva MJ, Thomopoulos S. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res*. 2006;24:541–550.

Galatz, L.M, Charlton, N, Das, R, Kim, H.M, Havlioglu, N, and Thomopoulos, S. Complete removal of load is detrimental to rotator cuff healing 18, 669, 2009.

Garstman GM. Full thickness rotator cuff tears. In: Gartsman editor. Shoulder arthroscopy. 2 ed. Philadelphia: Saunders 2009; 241-278).

Gazielly DF, Gleyze P, Montagnon C. Functional and anatomical results after rotator cuff repair. Clin Orthop Relat Res. 1994;(304):43-53.

Gazielly DF, Gleyze P, Montagnon C. Functional and anatomical results after rotator cuff repair. Clin Orthop Relat Res. 1994 Jul;(304):43-53.

Gerber C, Fuchs B, Hodler J. The results of repair of massive tears of the rotator cuff. J Bone Joint Surg Am. 2000;82:505–515.

Gerber C, Meyer DC, Schneeberger AG, Hoppeler H, von Rechenberg B. Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep. J Bone Joint Surg Am. 2004 Sep;86-A(9):1973-82.

Gerber C, Schneeberger AG, Beck M, Schlegel U. Mechanical strength of repairs of the rotator cuff. J Bone Joint Surg Br. 1994 May;76(3):371-80.

Gerber C, Schneeberger AG, Perren SM, Nyffeler RW. Experimental rotator cuff repair. A preliminary study. J Bone Joint Surg Am. 1999 Sep;81(9):1281-90.

Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. J Surg Res. 2009;152:135–139.

Gimbel J.A, Mehta S, Van Kleunen J.P, Williams G.R, and Soslowsky L.J. The tension required at repair to reappose the supraspinatus tendon to bone rapidly increases after injury. Clin Orthop Relat Res 426, 258, 2004.

Gimbel J.A, Van Kleunen J.P, Mehta S, Perry S.M, Williams G.R, and Soslowsky L.J. Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. J Biomech 37, 739, 2004.

Gimbel JA, Van Kleunen JP, Lake SP, Williams GR, Soslowsky LJ. The role of repair tension on tendon to bone healing in an animal model of chronic rotator cuff tears. J Biomech 2007; 40: 561-568.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821-7.

Goutallier D, Postel JM, Gleyze P, Leguilloux P, Van Driessche S. Influence of cuff muscle fatty degeneration on anatomic and functional outcomes after simple suture of full-thickness tears. *J Shoulder Elbow Surg*. 2003 Nov-Dec;12(6):550-4.

Groh, ME, Maitra, B, Szekely, E, y Koc, ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005; 33(8): 928-34.

Gulotta LV, Kovacevic D, Ehteshami JR, Dagher E, Packer JD, Rodeo SA: Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med* 2009, 37(11):2126-2133.

Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Deng XH, Rodeo SA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuffhealing in a rat model. *Am J Sports Med*. 2011 Jun;39(6):1282-9.

Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, Ehteshami JR, Rodeo SA. Adenoviral-mediated gene transfer of human bone morphogenetic protein-13 does not improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med*. 2011 Jan;39(1):180-7.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;6:861–70.

Haygood TM, Langlotz CP, Kneeland JB, *et al*. Categorization of acromial shape: interobserver variability with MR imaging and conventional radiography. *AJR* 1994; 162: 1337.

Hee CK, Dines JS, Dines DM, Roden CM, Wisner-Lynch LA, Turner AS, McGilvray KC, Lyons AS, Puttlitz CM, Santoni BG. Augmentation of a rotator cuff suture repair using rhPDGF-BB and a type I bovine collagen matrix in an ovine model. *Am J Sports Med*. 2011 Aug;39(8):1630-9.

Hersche O, Gerber C. Passive tension in the supraspinatus musculotendinous unit after long-standing rupture of its tendon: a preliminary report. *J Shoulder Elbow Surg* 1998; 7: 393-396.

Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88A(6):1238-44.

Iannotti JP, Codsi MJ, Kwon YW, Derwin K, Ciccone J, Brems JJ. Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Jun;88(6):1238-44.

Iannotti JP, Deutsch A, Green A, Rudicel S, Christensen J, Marraffino S, Rodeo S. Time to failure after rotator cuff repair: a prospective imaging study. *J Bone Joint Surg Am.* 2013 Jun 5;95(11):965-71.

Iannotti JP. Full-thickness rotator cuff tears: factors affecting surgical outcome. *J Am Acad Orthop Surg.* 1994;2:87-95.

Iannotti JP. Rotator cuff disorders: Evaluation and treatment. Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons Monograph Series,1991.

Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, and Mizuta H. Reconstruction of large rotator-cuff tears with acellular dermal matrix grafts in rats. *J Shoulder Elbow Surg* 18, 288, 2009.

Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Mizuta H. Reconstruction of large rotator-cuff tears with acellular dermal matrix grafts in rats. *J Shoulder Elbow Surg.* 2009;18:288–295.

Ide J, Kikukawa K, Hirose J, Iyama K, Sakamoto H, Mizuta H. The effects of fibroblast growth factor-2 on rotator cuff reconstruction with acellular dermal matrix grafts. *Arthroscopy.* 2009 Jun;25(6):608-16.

Inoue N, Ikeda K, Aro HT, Frassica FJ, Sim FH, Chao EY. Biologic tendon fixation to metallic implant augmented with autogenous cancellous bone graft and bone marrow in a canine model. *J Orthop Res.* 2002 Sep;20(5):957-66.

Ippolito E, Natali PG, Postacchini F, Accini L, de Martino C. Morphological, immunological and biochemical study of rabbit Achilles tendon at various ages. *J Bone Joint Surg* 1980;62A:583–98.

Ireland D, Harrall RL, Holloway G, Hackney R, Hazleman BL, Riley GP. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biol* 2001;20:159–69.

- Jackson DW. Chronic rotator cuff impingement in the throwing athlete. *Am J Sports Med.* 1976 Nov-Dec;4(6):231-40.
- James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 2008;33:102-12.
- Jarvinen M, Józsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Kvist M, Leadbetter W. Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand J Med Sci Sports* 1997;7:86–95.
- Jerosch J, Muller T, Castro WH. The incidence of rotator cuff rupture. An anatomic study. *Acta Orthop Belg.* 1991;57(2):124-9.
- Jorgensen C, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, y Noel D. Multipotent mesenchymal stromal cells in articular diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(2): 269-84.
- Józsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)* 1991;142: 306–12.
- Józsa L, Kannus P. Structure and metabolism of normal tendons. In: Józsa L, Kannus P, eds. *Human tendons: anatomy physiology and pathology*. Champaign: Human Kinetics, 1997:46–95. 306–12.
- Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I. Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res.* 2008 Jun;332(3):469-78.
- Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, *et al.* The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:369-79.
- Kannus P, Jozsa L: Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am* 1991, 73:1507-1525.
- Kasperczyk WJ, Bosch U, Oestern HJ, Tscherne H: Staging of patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament reconstruction. A biomechanical and histological study in a sheep model. *Clin Orthop* 1993, 286:271-282.
- Kastelic J, Galeski A, Baer E. The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 1978;6:11–23.

Kaushal GP, Shah SV. The new kids on the block: ADAMTSSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J Clin Invest* 2000;105:1335–7.

Keener JD, Wei AS, Kim HM, Paxton ES, Teefey SA, Galatz LM, Yamaguchi K. Revision arthroscopic rotator cuff repair: repair integrity and clinical outcome. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Mar;92(3):590-8.

Khan, KM, Cook, JL, Bonar, F, Harcourt, P, Astrom, M.: Histopathology of common tendinopathies: update and implications for clinical management. *Sports Med* 27, 393, 1999.

Kim YS, Lee HJ, Ok JH, Park JS, Kim DW. Survivorship of implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute rotator cuff tear. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012.

Kimura A, Aoki M, Fukushima S, Ishii S, Yamakoshi K. Reconstruction of a defect of the rotator cuff with polytetrafluoroethylene felt graft. Recovery of tensile strength and histocompatibility in an animal model. *J Bone Joint Surg Br.* 2003 Mar;85(2):282-7.

Klinge H.M, Steckel H, Spahn G, Buchhorn G.H, and Baums M.H. Biomechanical comparison of double-loaded suture anchors using arthroscopic Mason-Allen stitches versus traditional transosseous suture technique and modified Mason-Allen stitches for rotator cuff repair. *Clin Biomech* 2007, 22, 106.

Klinger H.M, Buchhorn G.H, Heidrich G, Kahl E, and Baums M.H. Biomechanical evaluation of rotator cuff repairs in a sheep model: suture anchors using arthroscopic Mason-Allen stitches compared with transosseous sutures using traditional modified Mason-Allen stitches. *Clin Biomech* 2008, 23, 291.

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.

Knäuper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996;271:1544–50.

Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998;22:181–7.

Koh KH, Ahn JH, Kim SM, Yoo JC. Treatment of biceps tendon lesions in the setting of rotator cuff tears: prospective cohort study of tenotomy versus tenodesis. *Am J Sports Med* 2010; 38: 1584-1590.

Koike Y, Trudel G, Curran D, Uthoff HK. Delay of supraspinatus repair by up to 12 weeks does not impair enthesis formation: a quantitative histologic study in rabbits. *J Orthop Res.* 2006 Feb;24(2):202-10.

Koike Y, Trudel G, Uthoff HK. Formation of a new enthesis after attachment of the supraspinatus tendon: A quantitative histologic study in rabbits. *J Orthop Res.* 2005 Nov;23(6):1433-4.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.

Kowalsky MS, Keener JD. Revision arthroscopic rotator cuff repair: repair integrity and clinical outcome: surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2011 Mar;93 Suppl 1:62-74.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F: Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, 24:386-398.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101(9): 3722-9.

Kumagdi J, Sarkar K, Uthoff HK, Okawara Y, Ooshima A. Immunohistochemical distribution of type I, II, and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion. *J Anat* 1994;185:279-84.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997; 97, 561-570.

Lake SP, Miller KS, Elliott DM, Soslowsky LJ. Effect of fiber distribution and realignment on the nonlinear and inhomogeneous mechanical properties of human supraspinatus tendon under longitudinal tensile loading. *J Orthop Res.* 2009.

Langberg H, Skovgaard D, Petersen LJ, Bulow J, Kjaer M. Type I collagen synthesis and degradation in peritendinous tissue after exercise determined by microdialysis in humans. *J Physiol* 1999; 521:299–306.

Lapiere CM, Nusgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res* 1977;5:21–9.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003; 57(1): 11-20.

Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. *Clin Sports Med* 1992;11:533–78

Lee BG, Cho NS, Rhee YG. Modified Mason-Allen suture bridge technique: a new suture bridge technique with improved tissue holding by the modified Mason-Allen stitch. *Clin Orthop Surg*. 2012 Sep;4(3):242-5.

Lee JJ, Yoo YS, Hwang JT, Kim DY, Jeon SJ, Hwang SM, Jang JS. Efficacy of direct arthroscopy-guided suprascapular nerve block after arthroscopic rotator cuff repair: a prospective randomized study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Mar 1.

Lee JY, Zhou Z, Taub PJ, Ramcharan M, Li Y, Akinbiyi T, Maharam ER, Leong DJ, Laudier DM, Ruike T, Torina PJ, Zaidi M, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL, Sun HB. BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS One*. 2011 Mar 11;6(3):e17531.

Lee JY, Zhou Z, Taub PJ, Ramcharan M, Li Y, Akinbiyi T, Maharam ER, Leong DJ, Laudier DM, Ruike T, Torina PJ, Zaidi M, Majeska RJ, Schaffler MB, Flatow EL, Sun HB. BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS One*. 2011 Mar 11;6(3):e17531.

Lehman C, Cuomo F, Kummer FJ, Zuckerman JD. The incidence of full thickness rotator cuff tears in a large cadaveric population. *Bull Hosp Jt Dis*. 1995;54:30-1.

Leroux JL, Thomas E, Bonnel F, Blotman F. Diagnostic value of clinical tests for shoulder impingement syndrome. *Rev Rhum Engl Ed*. 1995 Jun;62(6):423-8.

- Liberson F. Os acromiale: a contested anomaly. *J Bone Joint Surg* 1937; 19 B: 683.
- Lin EC, Mall NA, Dhawan A, Sherman SL, McGill KC, Provencher MT, Nicholson GP, Cole BJ, Solomon DJ, Verma NN, Romeo AA. Arthroscopic primary rotator cuff repairs in patients aged younger than 45 years. *Arthroscopy*. 2013 May;29(5):811-7.
- Lin J.L, Carreira D, Ponnappan R, Volz B, and Cole B.J. Use of bipolar radiofrequency energy in delayed repair of acute supraspinatus tears in rats. *J Shoulder Elbow Surg* 16, 640, 2007.
- Ling SC, Chen CF, Wan RX. A study of the vascular supply of the supraspinatus tendon. *Surg Radiol Anat* 1990; 12: 161.
- Linsenmayer TF, Fitch JM, Birk DE. Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens: Controlling elements in corneal morphogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1990;580:143–60.
- Liu SH. Arthroscopically-assisted rotator-cuff repair. *J Bone Joint Surg Br*. 1994 Jul;76(4):592-5.
- Lo IK, Burkhart SS. Double-row arthroscopic rotator cuff repair: re-establishing the footprint of the rotator cuff. *Arthroscopy*. 2003 Nov;19(9):1035-42.
- Loeffler BJ, Scannell BP, Peindl RD, Connor P, Davis DE, Hoelscher GL, Norton HJ, Hanley EN Jr, Gruber HE. Cell-based tissue engineering augments tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model. *J Orthop Res*. 2013 Mar;31(3):407-12.
- Longo UG, Lamberti A, Rizzello G, Maffulli N, Denaro V. Synthetic augmentation in massive rotator cuff tears. *Med Sport Sci*. 2012;57:168-77.
- Lovric V, Ledger M, Goldberg J, Harper W, Bertollo N, Pelletier MH, Oliver RA, Yu Y, Walsh WR. The effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in a transosseous-equivalent sheep rotator cuff model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013 Feb;21(2):466-75.
- Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakarlis A. The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009a; 129: 1577- 1582.

Ma CB, Comerford L, Wilson J, Puttlitz CM. Biomechanical evaluation of arthroscopic rotator cuff repairs: double-row compared with singlerow fixation. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(2):403-10.

MacGillivray JD, Fealy S, Terry MA, Koh JL, Nixon AJ, Warren RF. Biomechanical evaluation of a rotator cuff defect model augmented with a bioresorbable scaffold in goats. *J Shoulder Elbow Surg.* 2006 Sep-Oct;15(5):639-44.

Maffulli N, Moller HD, Evans CH. Tendon healing: can it be optimised? *Br J Sports Med* 2002;36:315-6.

Maffulli N, Longo UG, Berton A, Loppini M, Denaro V. Biological factors in the pathogenesis of rotator cuff tears. *Sports Med Arthrosc.* 2011 Sep;19(3):194-201.

Maffulli N, Longo UG, Denaro V. Novel approaches for the management of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Nov 3;92(15):2604-13.

Maffulli N, Spiezia F, Longo UG, Denaro V. Less-invasive reconstruction of chronic achilles tendon ruptures using a peroneus brevis tendon transfer. *Am J Sports Med.* 2010 Nov;38(11):2304-12.

Mancuso CA, Altchek DW, Craig EV, Jones EC, Robbins L, Warren RF, *et al.* Patient's expectations of shoulder surgery. *J Shoulder Elbow Surg.* 2002;11:541-9.

Martin, I, Muraglia, A, Campanile, G, Cancedda, R, and Quarto, R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138:4456-4462.

Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 1992;14:455-63.

Matsen FA III, Lippit SB. *Shoulder Surgery: Principles and Procedures.* Philadelphia: WB Saunders 2004, p 282.

Matsen FA, Febringer EV, Lippit SB, Wirth MA and Rockwood CA. Rotator cuff. In: Rockwood, Matsen, Wirth and Lippit editors. *The Shoulder.* 4 ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier 2009; 771-889.

Matsumoto F, Uthoff HK, Trudel G, Loehr JF. Delayed tendon reattachment does not reverse atrophy and fat accumulation of the supraspinatus-an experimental study in rabbits. *J Orthop Res.* 2002 Mar;20(2):357-63.

- Matthews TJ, Hand GC, Rees JL, Athanasou NA, Carr AJ. Pathology of the torn rotator cuff tendon. Reduction in potential for repair as tear size increases. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 Apr;88(4):489-95.
- McAdams TR, Knudsen KR, Yalamanchi N, Chang J, Goodman SB. Deltoid flap combined with fascia lata autograft for rotator cuff defects: a histologic study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007 Sep;15(9):1144-9.
- McCluskey GM 3rd, Gaunt BW. Mini-open rotator cuff repair. *J Surg Orthop Adv.* 2006 Fall;15(3):145-53.
- Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419-27.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4619-21.
- Mellado JM, Calmet J, Olona M, Ballabriga J, Camins A, Arencibia M, *et al.* MR assessment of the repaired rotator cuff: prevalence, size, location and clinical relevance of tendon rerupture. *Eur Radiol.* 2006;16(10): 2186-96.
- Mellado JM, Calmet J, Olona M, Esteve C, Camins A, Pérez del Palomar L, *et al.* Surgically repaired massive rotator cuff tears: MRI of tendon integrity, muscle fatty degeneration, and muscle atrophy correlated with intraoperative and clinical findings. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;184(5): 1456-63.
- Metcalf MH, Savoie FH, and Kellum B. Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2002 vol. 12, no. 3, pp. 204–208.
- Meyer DC, Hoppeler H, von Rechenberg B, Gerber C. A pathomechanical concept explains muscle loss and fatty muscular changes following surgical tendon release. *J Orthop Res.* 2004 Sep;22(5):1004-7.
- Meyer DC, Lajtai G, von Rechenberg B, Pfirrmann CW, Gerber C. Tendon retracts more than muscle in experimental chronic tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 Nov;88(11):1533-8.

- Milgrom C, Schaffler M, Gilbert S, van Holsbeeck M. Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77B(2):296-8.
- Miller EJ, Gay S. Collagen: an overview. *Methods Enzymol* 1982;82:3–32.
- Miniaci A, Mascia AT, Salonen DC, Becker EJ. Magnetic resonance imaging evaluation of the rotator cuff tendons in the asymptomatic shoulder. *Am J Sports Med.* 1995;23(2):142-5.
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774-8.
- Moffat KL, Sun WH, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, *et al.* (2008) Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7947–7952.
- Moore DR, Cain EL, Schwartz ML, Clancy WG Jr. Allograft reconstruction for massive, irreparable rotator cuff tears. *Am J Sports Med.* 2006; 34(3):392-6.
- Moore MJ, De Beaux A. A quantitative ultrastructural study of rat tendon from birth to maturity. *J Anat* 1987;153:163–9.
- Muraglia, A, Cancedda, R, and Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 7):1161-1166.
- Murphy DJ, Nixon AJ. Biochemical and site-specific effects of insulin-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons. *Am J Vet Res* 1997;58:103-9.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.
- Nakagaki K, Tomita Y, Sakurai G, Oshiro O, Tamai S, Ozaki J. Anatomical study on the atrophy of supraspinatus muscle belly with cuff tear. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1994 Jul;68(7):516-21. Japanese.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, y Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(4): 2080-7.

- Neer CS 2nd. Anterior acromioplasty for the chronic impingement syndrome. in the shoulder. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am.* 1972; 54A:41-50.
- Neer CS 2nd, Craig EV, Fukuda H. Cuff-tear arthropathy. *J Bone Joint Surg Am.* 1983 Dec;65(9):1232-44.
- Nelson CO, Sileo MJ, Grossman MG, Serra-Hsu F. Single-row modified mason-allen versus double-row arthroscopic rotator cuff repair: a biomechanical and surface area comparison. *Arthroscopy.* 2008 Aug;24(8):941-8.
- Nicholson GP, Breur GJ, Van Sickle D, Yao JQ, Kim J, Blanchard CR. Evaluation of a cross-linked acellular porcine dermal patch for rotator cuff repair augmentation in an ovine model. *J Shoulder Elbow Surg.* 2007 Sep-Oct;16(5 Suppl):S184-90.
- Nixon AJ, Watts AE, Schnabel LV. Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012 Feb;21(2):278-94.
- Nourissat G, Diop A, Maurel N, Salvat C, Dumont S, Pigenet A, Gosset M, Houard X, Berenbaum F. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model. *PLoS One.* 2010 Aug 18;5(8):e12248.
- Ochiai N, Matsui T, Miyaji N, Merklin RJ, Hunter JM. Vascular anatomy of flexor tendons. I. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheath. *J Hand Surg Am* 1979; 4:321–30.
- Ogilvie-Harris DJ, Demaziere A. Arthroscopic debridement versus open repair for rotator cuff tears. A prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Br.* 1993B:75:416-20.
- Oguma H, Murakami G, Takahashi-Iwanaga H, Aoki M, Ishii S. Early anchoring collagen fibers at the bone-tendon interface are conducted by woven bone formation: light microscope and scanning electron microscope observation using a canine model. *J Orthop Res.* 2001 Sep;19(5):873-80.
- Okamoto N, Kushida T, Oe K, Umeda M, Ikehara S, Iida H. Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell transplantation therapy. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:2776-84.
- Olivé R. Patología en medicina del deporte. Ed.Menarini Area Científica;2000:56-58.

Omae H, Zhao C, Sun YL, An KN, Amadio PC. Multilayer tendon slices seeded with bone marrow stromal cells: a novel composite for tendon engineering. *J Orthop Res.* 2009 Jul;27(7):937-42.

Onay U, Akpınar S, Akgün RC, Balçık C, Tuncay IC. Comparison of repair techniques in small and medium-sized rotator cuff tears in cadaveric sheep shoulders. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2013;47(3):179-83.

Ouyang HW, Goh JC, Mo XM, Teoh SH, Lee EH. The efficacy of bone marrow stromal cell-seeded knitted PLGA fiber scaffold for Achilles tendon repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;961:126-9.

Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Eng.* 2003 Jun;9(3):431-9.

Ozaki J, Fujimoto S, Makagawa Y, *et al.* Tears of the rotator cuff of the shoulder associated with pathological changes in the acromion: a study in cadavera. *J Bone Joint Surg* 1988; 70: 1224.

Ozbaydar M, Elhassan B, Esenyel C, Atalar A, Bozdog E, Sunbuloglu E, Kopuz N, Demirhan M. A comparison of single-versus double-row suture anchor techniques in a simulated repair of the rotator cuff: an experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Oct;90(10):1386-91.

Park MC, Cadet ER, Levine WN, Bigliani LU, Ahmad CS. Tendon-to-bone pressure distributions at a repaired rotator cuff footprint using transosseous suture and suture anchor fixation techniques. *Am J Sports Med.* 2005;33(8):1154-9.

Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: The basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:1297–310.

Paulos LE, Kody MH. Arthroscopically enhanced "miniapproach" to rotator cuff repair. *Am J Sports Med.* 1994 Jan-Feb;22(1):19-25.

Perry S.M, Getz C.L, and Soslowsky L.J. After rotator cuff tears, the remaining (intact) tendons are mechanically altered. *J Shoulder Elbow Surg* 18, 52, 2009.

Perry S.M, Getz C.L, and Soslowsky L.J. Alterations in function after rotator cuff tears in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 18, 296, 2009.

- Perry, S.M, Gupta, R.R, Kleunen, J.V, Ramsey, M.L, Soslowsky, L.J, and Glaser, D.L. Use of small intestine submucosa in a rat model of acute and chronic rotator cuff tear. *J Shoulder Elbow Surg* 15, 179, 2007.
- Perthes G. Uber Operationen bei habitueller schulterluxation. *Deutsch Z Chir.* 1906;85:199-227.
- Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman Ma, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284, 143-147.
- Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A: IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008, 38:1745-1755.
- Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J* 2000;350:181–8.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y: Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008, 2:141-150.
- Riley GP, Cox M, Harrall RL, Clements S, Hazleman BL. Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs in vitro. *J Hand Surg Br* 2001;26:224–8.
- Riley GP, Curry V, DeGroot J *et al.* Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 2002;21:185–95.
- Riley GP, Harrall RL, Cawston TE, Hazleman BL, Mackie EJ. Tenascin-C and human tendon degeneration. *Am J Pathol* 1996; 149:933–43.
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: Changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:359–66.
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:367–76.

Robinson PM, Wilson J, Dalal S, Parker RA, Norburn P, Roy BR. Rotator cuff repair in patients over 70 years of age: early outcomes and risk factors associated with re-tear. *Bone Joint J.* 2013 Feb;95-B(2):199-205.

Rockwood CA Jr. Nonoperative management of rotator cuff tears in older patients. Charleston, SC: Annual meeting of the American Orthopaedic Association; 2003.

Rodeo SA, Potter HG, Kawamura S, Turner AS, Kim HJ, Atkinson BL. Biologic augmentation of rotator cuff tendon-healing with use of a mixture of osteoinductive growth factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Nov;89(11):2485-97.

Romeo AA, Hang DW, Bach BR Jr, Shott S. Repair of full thickness rotator cuff tears. Gender, age, and other factors affecting outcome. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:243-55.

Ronga M, Oliva F, Longo UG, Testa V, Capasso G, Maffulli N. Isolated medial patellofemoral ligament reconstruction for recurrent patellar dislocation. *Am J Sports Med.* 2009 Sep;37(9):1735-42.

Safran O, Derwin KA, Powell K, Iannotti JP. Changes in rotator cuff muscle volume, fat content, and passive mechanics after chronic detachment in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Dec;87(12):2662-70.

Sakurai G, Ozaki J, Tomita Y, Kondo T, Tamai S. Incomplete tears of the subscapularis tendon associated with tears of the supraspinatus tendon: cadaveric and clinical studies. *J Shoulder Elbow Surg.* 1998;7(5):510-5.

Sano H, Kumagai J, Sawai T. Experimental fascial autografting for the supraspinatus tendon defect: remodeling process of the grafted fascia and the insertion into bone. *J Shoulder Elbow Surg.* 2002 Mar-Apr;11(2):166-73.

Satomi E, Teodoro WR, Parra ER, Fernandes TD, Velosa AP, Capelozzi VL, Yoshinari NH. Changes in histoanatomical distribution of types I, III and V collagen promote adaptive remodeling in posterior tibial tendon rupture. *Clinics (Sao Paulo).* 2008 Feb;63(1):9-14.

Saupe N, Pfirrmann CW, Schmid MR, Jost B, Werner CM, Zanetti M. Association between rotator cuff abnormalities and reduced acromiohumeral distance. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 376-382.

Scadden, DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 2006; 441, 1075-1079.

Scheibel MT, Habermeyer P. A modified Mason-Allen technique for rotator cuff repair using suture anchors. *Arthroscopy*. 2003 Mar;19(3):330-3.

Schibany N, Zehetgruber H, Kainberger F, Wurnig C, Ba-Ssalamah A, Herneth AM, *et al*. Rotator cuff tears in asymptomatic individuals: a clinical and ultrasonographic screening study. *Eur J Radiol*. 2004;51(3):263-8.

Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Motta T, Turner AS. The effects of augmentation with Swine small intestine submucosa on tendon healing under tension: histologic and mechanical evaluations in sheep. *Am J Sports Med*. 2006 Feb;34(2):275-80.

Sclamberg SG, Tibone JE, Itamura JM, Kasraeian S. Six-month magnetic resonance imaging follow-up of large and massive rotator cuff repairs reinforced with porcine small intestinal submucosa. *J Shoulder Elbow Surg*. 2004 Sep-Oct;13(5):538-41.

Seeherman HJ, Archambault JM, Rodeo SA, Turner AS, Zekas L, D'Augusta D, Li XJ, Smith E, Wozney JM. rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Oct;90(10):2206-19.

Severud EL, Ruotolo C, Abbott DD, Nottage WM. All-arthroscopic versus mini-open rotator cuff repair: a long-term retrospective outcome comparison. *Arthroscopy*. 2003;19:234-8.

Shah V, Bendele A, Dines JS, Kestler HK, Hollinger JO, Chahine NO, Hee CK. Dose-response effect of an intra-tendon application of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in a rat Achilles tendinopathy model. *J Orthop Res*. 2013 Mar;31(3):413-20.

Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:181-90.

Shaw LM, Olsen BR. FACIT collagens: Diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 1991;16:191-4.

Sher JS, Uribe JW, Posada A, Murphy BJ, Zlatkin MB. Abnormal findings on magnetic resonance images of asymptomatic shoulders. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77A(1):10-5.

Sileo MJ, Ruotolo CR, Nelson CO, Serra-Hsu F, Panchal AP. A biomechanical comparison of the modified Mason-Allen stitch and massive cuff stitch in vitro. *Arthroscopy*. 2007 Mar;23(3):235-40, 240.e1-2.

Silver IA, Brown PN, Goodship AE *et al.* A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl.* 1983;1:1–24.

Smith MJ, Cook JL, Kuroki K, Jayabalan PS, Cook CR, Pfeiffer FM, Waters NP. Comparison of a novel bone-tendon allograft with a human dermis-derived patch for repair of chronic large rotator cuff tears using a canine model. *Arthroscopy.* 2012 Feb;28(2):169-77.

Snyder SJ, Arnoczky SP, Bond JL, Dopirak R. Histologic evaluation of a biopsy specimen obtained 3 months after rotator cuff augmentation with GraftJacket matrix. *Arthroscopy.* 2009;25: 329–333.

Soler JA, Gidwani S, Curtis MJ. Early complications from the use of porcine dermal collagen implants (Permacol) as bridging constructs in the repair of massive rotator cuff tears. A report of 4 cases. *Acta Orthop Belg.* 2007 Aug;73(4):432-6.

Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 2006; 24, 1254-1264.

Sonnabend DH, Watson EM. Structural factors affecting the outcome of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg.* 2002;11(3):212-8.

Sonnabend DH, Young AA. Comparative anatomy of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Br.* 2009 Dec;91(12):1632-7.

Soon MY, Hassan A, Hui JH, Goh JC, Lee EH. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: a short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration. *Am J Sports Med.* 2007 Jun;35(6):962-71.

Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, Banerji I, Moalli MR. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg.* 1996 Sep-Oct;5(5):383-92.

Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Esmail A, Flanagan CL, Iannotti JP, Williamson JD 3rd, Carpenter JE. Rotator cuff tendinosis in an animal model: role of extrinsic and overuse factors. *Ann Biomed Eng.* 2002 Sep;30(8):1057-63.

Soslowky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg.* 2000 Mar-Apr;9(2):79-84.

St Pierre P, Olson EJ, Elliott JJ, O'Hair KC, McKinney LA, Ryan J. Tendon-healing to cortical bone compared with healing to a cancellous trough. A biomechanical and histological evaluation in goats. *J Bone Joint Surg Am.* 1995 Dec;77(12):1858-66.

Thomopoulos S, Soslowky LJ, Flanagan CL, Tun S, Keefer CC, Mastaw J, Carpenter JE. The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J Shoulder Elbow Surg.* 2002 May-Jun;11(3):239-47.

Thomopoulos, S, Hattersley, G, Rosen, V, Mertens, M, Galatz, L, Williams, G.R, and Soslowky, L.J. The localized expression of extracellular matrix components in healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study. *J Orthop Res* 20, 454, 2002.

Tillander B, Franzen L, Norlin R. Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease. *J Orthop Res* 2002; 20:1358–64.

Toussaint B, Schnaser E, Bosley J, Lefebvre Y, Gobezie R. Early structural and functional outcomes for arthroscopic double-row transosseous-equivalent rotator cuff repair. *Am J Sports Med* 2011; 39: 1217-1225.

Tuoheti Y, Itoi E, Yamamoto N, *et al.* Contact area, contact pressure, and pressure patterns of the tendon-bone interface after rotator cuff repair. *Am J Sports Med.* 2005;33(12):1869- 74.

Tyson LL, Crues JV. Pathogenesis of rotator cuff disorders: magnetic resonance imaging characteristics. *MRI Clin NA* 1993; 1: 37.

Uthoff HK, Matsumoto F, Trudel G, Himori K. Early reattachment does not reverse atrophy and fat accumulation of the supraspinatus--an experimental study in rabbits. *J Orthop Res.* 2003 May;21(3):386-92.

Uri DS. MR imaging of shoulder impingement and rotator cuff disease. *Rad Clin NA* 1997; 35(1): 77-96.

Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Tekoppele JM. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J.* 2000 Sep 1;350 Pt 2:381-7.

Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15;275(50):39027-31.

Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendons under compression. *Int Rev Cytol*. 1989;115:267-93.

Vogel KG, Sandy JD, Pogany G, Robbins JR. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol* 1994;14:171-9.

Von der Mark K. Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res* 1981;9:265–324.

Waggett AD, Ralphs JR, Kwan APL, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol* 1998;16:457–70.

Walton JR, Bowman NK, Khatib Y, Linklater J, Murrell GA. Restore orthobiologic implant: not recommended for augmentation of rotator cuff repairs. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89:786–791.

Walton JR, Murrell GA. A two-year clinical outcomes study of 400 patients, comparing open surgery and arthroscopy for rotator cuff repair. *Bone Joint Res*. 2012 Sep 1;1(9):210-7.

Waltrip RL, Zheng N, Dugas JR, Andrews JR. Rotator cuff repair: a biomechanical comparison of three techniques. *Am J Sports Med*. 2003;31(4):493-7.

Watkins JP, Auer JA, Gay S, Morgan SJ. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am J Vet Res* 1985;46:2091–6.

Watson EM, Sonnabend DH. Outcome of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg*. 2002;11:201-11.

Williams GR Jr, Rockwood CA Jr, Bigliani LU, Iannotti JP, Stanwood W. Rotator cuff tears: why do we repair them? *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86A(12):2764-76.

Williams IF, Heaton A, McCullagh KG. Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res Vet Sci* 1980;28: 302–10.

Williams IF, McCullagh KG, Silver IA. The distribution of types I and III collagen and fibronectin in the healing equine tendon. *Connect Tissue Res* 1984;12:211–22.

Woo SL, Maynard J, Butler DL, Lyon R, Torzilli P, *et al.* (1987) Ligament, tendon, and joint capsule insertions to bone. In *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Woo SL, ed. Savannah GA: American Academy of Orthopaedic Surgeons. pp 126–166.

Xu H, Sandor M, Qi S, Lombardi J, Connor J, McQuillan DJ, Iannotti JP. Implantation of a porcine acellular dermal graft in a primate model of rotator cuff repair. *J Shoulder Elbow Surg*. 2012 May;21(5):580-8.

Yamaguchi K, Tetro AM, Blam O, Evanoff BA, Teefey SA, Middleton WD. Natural history of asymptomatic rotator cuff tears: a longitudinal analysis of asymptomatic tears detected sonographically. *J Shoulder Elbow Surg*. 2001;10:199-203.

Yokota A, Gimbel JA, Williams GR, Soslowsky LJ. Supraspinatus tendon composition remains altered long after tendon detachment. *J Shoulder Elbow Surg*. 2005 Jan-Feb;14(1 Suppl S):72S-78S.

Yoshihara Y, Hamada K, Nakajima T, Fujikawa K, Fukuda H. Biochemical markers in the synovial fluid of glenohumeral joints from patients with rotator cuff tear. *J Orthop Res* 2001;19:573–9.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-13.

Yu J, McGarry MH, Lee YS, Duong LV, Lee TQ. Biomechanical effects of supraspinatus repair on the glenohumeral joint. *J Shoulder Elbow Surg*. 2005;14(1 Suppl S):65S-71S.

Zalavras C.G, Gardocki R, Huang E, Stevanovic M, Hedman T, and Tibone J. Reconstruction of large rotator cuff tendon defects with porcine small intestinal submucosa in an animal model. *J Shoulder Elbow Surg* 15, 224, 2006.

Zhang CG, Zhao DW, Wang WM, Ren MF, Li RX, Yang S, Liu YP. Biomechanical comparison of double-row versus transtendon single-row suture anchor technique for repair of the grade III partial articular-sided rotator cuff tears. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Nov;123(21):3049-54.

Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *J Biomed Mat Res B Appl Biomater.* 2005; 73:61–67.

Ziegler DW, Matsen FA III, and Hanrrington RM. The superior rotator cuff tendon and acromion provide passive superior stability to the shoulder. *J Bone Joint Surg* 1996.

Zumstein MA, Jost B, Hempel J, Hodler J, Gerber C. The clinical and structural long-term results of open repair of massive tears of the rotator cuff. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90:2423–2431.

Zvijac JE, Levy HJ, Lemak LJ. Arthroscopic subacromial decompression in the treatment of full-thickness rotator cuff tears: a 3- to 6-year followup. *Arthroscopy.* 1994;10:518-23.

