



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Tesis  
Doctoral**

**Generación de constructos artificiales de  
fibrina-agarosa para la reparación  
microquirúrgica de lesiones tendinosas**

**David González Quevedo**  
Programa de Doctorado en Biomedicina  
Granada, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: González Quevedo, David  
ISBN: 978-84-1306-662-2  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63961>





# UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina  
Departamento de Histología

**GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS ARTIFICIALES DE  
FIBRINA-AGAROSA PARA LA REPARACIÓN  
MICROQUIRÚRGICA DE LESIONES TENDINOSAS**

**TESIS DOCTORAL**

**David González Quevedo  
Programa de Doctorado en Biomedicina  
Granada, 2020**

D. David González Quevedo

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y en la Unidad de Experimentación Animal del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Este proyecto de tesis doctoral fue financiado por los Proyectos de Investigación FIS PI17/0393 del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio Español de Economía y Competitividad) y por la Ayuda a Proyectos de Inicio a la Investigación de 2017 de la Fundación de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT).

Los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos científicos originales:

*David González Quevedo, Iván Martínez Medina, Antonio Campos, Fernando Campos, Víctor Carriel.*

**Título:** Tissue Engineering strategies for the treatment of tendon injuries: a systematic review and meta-analysis of animal models.

**Revista (Año, Volumen):** Bone & Joint Research (2018, 7).

**Factor de Impacto:** 3.652

**Área (Percentil, Cuartil):** Cirugía Ortopédica (9/76, Q1)

*David González Quevedo, Miriam Díaz Ramos, Jesús Chato Astrain, David Sánchez Porras, Iskandar Tamimi, Antonio Campos, Fernando Campos, Víctor Carriel.*

**Título:** Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose based hydrogel in a rat Achilles tendon injury model.

**Revista (Año, Volumen):** Bone & Joint Journal (2020, 8)

**Factor de Impacto:** 4.301

**Área (Percentil, Cuartil):** Cirugía Ortopédica (6/76, Q1)

**A mi familia, amigos y maestros**



## **Agradecimientos**

Realizar una tesis doctoral es una tarea difícil pero estimulante para un médico que realiza actividad asistencial y que quiere mantener la pasión por la investigación. Sin embargo, es un trabajo complejo que requiere de la colaboración de muchos profesionales y es necesario y justo agradecer esta labor.

Tengo que agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, los doctores Víctor Sebastián Carriel Araya y Fernando Campos Sánchez, su paciencia y dedicación para guiarme en todo este proceso que iniciamos hace algunos años. Me han demostrado un compromiso con el trabajo digno de admirar.

En segundo lugar, no puedo dejar de mencionar a mi querido tutor de tesis, maestro y confidente el doctor Antonio Campos que, literalmente, me abrió las puertas de su casa y de su departamento de Histología para poder realizar este trabajo con todo su equipo. Desde aquellas estimulantes primeras clases en la facultad, se ha ido tejiendo una relación muy especial entre nosotros y yo me enorgullezco de poder mostrar esta amistad.

En tercer lugar, como he mencionado, a todo el departamento de Histología de la Universidad de Granada por enseñar a un traumatólogo el difícil arte de preparar y analizar muestras para su estudio histológico y poner a mi disposición todos sus enormes medios tanto humanos como materiales.

En cuarto lugar, a la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Gracias a su convocatoria de ayudas específicas a proyectos de inicio a la investigación este proyecto ha logrado llegar a buen término tanto científico como económico. La investigación básica y clínica debe ser facilitada y espoleada por las sociedades científicas y nuestra sociedad traumatológica es un perfecto ejemplo a seguir.

En quinto lugar, a mis compañeros del Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Regional Universitario por su apoyo y generosidad a la hora de adaptar mi actividad asistencial para poder dedicarme con más atención a la parte experimental del proyecto.

Y, por último, a mi familia, en especial a mis padres y mi hermano, que siempre han sido una guía para mí y un ejemplo de dedicación. Su amor ha sido la energía necesaria para esta tesis doctoral.

## Índice



I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
1. Estado del arte.....	5
<b>1.1. Anatomía del tendón.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. <i>Anatomía del tendón de Aquiles.....</i>	8
<b>1.2. Histología del tendón.....</b>	<b>9</b>
1.2.1. <i>Matriz extracelular.....</i>	11
1.2.1.1. Colágeno.....	11
1.2.1.2. Proteoglicanos.....	11
1.2.1.3. Glicoproteínas y otras moléculas de la matriz extracelular.....	13
1.2.1.4. Componentes inorgánicos.....	14
1.2.2. <i>Células.....</i>	15
<b>1.3. Biomecánica del tendón.....</b>	<b>17</b>
1.3.1. <i>Evaluación biomecánica.....</i>	18
1.3.2. <i>Viscoelasticidad.....</i>	20
1.3.3. <i>Influencia de factores biológicos en el comportamiento biomecánico..</i>	22
1.3.4. <i>Biomecánica del tendón de Aquiles.....</i>	23
<b>1.4. Biología de la regeneración tendinosa.....</b>	<b>24</b>
1.4.1. <i>Fase inflamatoria.....</i>	25
1.4.2. <i>Fase proliferativa.....</i>	25
1.4.3. <i>Fase de remodelación.....</i>	25
1.4.4. <i>Mecanismo intrínseco y extrínseco de la regeneración tendinosa.....</i>	26
1.4.5. <i>Reciclaje del colágeno.....</i>	27
1.4.6. <i>Regulación génica de la regeneración tendinosa.....</i>	28
1.4.7. <i>Mecanismos moleculares de la regeneración tendinosa.....</i>	29
1.4.8. <i>Metaloproteinasas.....</i>	31
1.4.9. <i>Citoquinas.....</i>	32
1.4.10. <i>Regulación mecánica.....</i>	34
<b>1.5. Patología del tendón.....</b>	<b>35</b>
1.5.1. <i>Tendinopatías.....</i>	35
1.5.1.1. Causas de la tendinopatía.....	36
1.5.1.2. Tratamiento de la tendinopatía.....	38
1.5.2. <i>Ruptura tendinosa.....</i>	40
1.5.2.1. Causas de la ruptura tendinosa.....	40
1.5.2.2. Tratamiento de la ruptura tendinosa.....	41
1.5.2.3. Técnicas de sutura en la reparación tendinosa.....	42
1.5.3. <i>Patología tumoral.....</i>	45
1.5.3.1. Fibroma de la vaina tendinosa.....	45
1.5.3.2. Tumor tenosinovial de células gigantes.....	46
1.5.3.3. Sarcoma de células claras.....	46
1.5.3.4. Sarcoma sinovial.....	47

<b>1.6. Ingeniería Tisular del tendón</b> .....	48
1.6.1. <i>Biomateriales de origen natural</i> .....	49
1.6.2. <i>Biomateriales de origen sintético</i> .....	50
1.6.3. <i>Biomateriales nanosintéticos</i> .....	51
1.6.4. <i>Fuentes celulares en Ingeniería Tisular</i> .....	52
1.6.5. <i>Factores de crecimiento y señalización</i> .....	52
<b>1.7. Hidrogeles en Ingeniería Tisular</b> .....	53
<b>1.8. Fibrina y agarosa en Ingeniería Tisular</b> .....	55
1.8.1. <i>Aplicaciones biomédicas</i> .....	56
<b>1.9. Modelos animales en investigación tendinosa</b> .....	57
<b>2. Hipótesis y justificación</b> .....	59
<b>3. Objetivos</b> .....	61
3.1. <b>Objetivo general</b> .....	62
3.2. <b>Objetivos específicos</b> .....	62
<b>4. Metodología</b> .....	63
<b>4.1. Generación de los biomateriales</b> .....	64
4.1.1. <i>Hidrogel de fibrina-agarosa</i> .....	64
4.1.2. <i>MatriDerm®</i> .....	66
<b>4.2. Caracterización <i>ex vivo</i></b> .....	66
4.2.1. <i>Evaluación biomecánica bajo esfuerzo de tracción</i> .....	66
4.2.2. <i>Evaluación de la biocompatibilidad</i> .....	68
<b>4.3. Evaluación <i>in vivo</i></b> .....	69
4.3.1. <i>Animales de experimentación</i> .....	69
4.3.2. <i>Procedimiento quirúrgico y grupos experimentales</i> .....	70
4.3.3. <i>Evaluación funcional</i> .....	72
4.3.4. <i>Análisis macroscópicos y microscópicos</i> .....	72
4.3.4.1. <i>Análisis histológico cuantitativo</i> .....	73
<b>4.4. Análisis estadístico</b> .....	75
<b>5. Resultados</b> .....	76
<b>5.1. Propiedades de los biomateriales <i>ex vivo</i></b> .....	77
5.1.1. <i>Propiedades biomecánicas bajo esfuerzos de tracción</i> .....	77
5.1.2. <i>Biocompatibilidad <i>ex vivo</i></i> .....	78
<b>5.2. Evaluación <i>in vivo</i></b> .....	82
5.2.1. <i>Resultados funcionales</i> .....	82
5.2.2. <i>Resultados macroscópicos</i> .....	82
5.2.3. <i>Resultados histológicos</i> .....	84
5.2.3.1. <i>Resultados histoquímicos e inmunohistoquímicos</i> .....	86
5.2.3.2. <i>Resultados histológicos cuantitativos</i> .....	88
<b>6. Discusión</b> .....	92
<b>7. Conclusiones</b> .....	100
<b>8. Bibliografía</b> .....	104

## I. Resumen

Los tendones son el enlace funcional entre la parte dinámica y la parte estática del aparato locomotor transfiriendo la contracción muscular al sistema óseo y, por tanto, permitir el movimiento y mantener la postura. Se trata de un tejido conectivo único y mecanosensitivo con unas propiedades mecánicas específicas que le permiten responder y adaptarse a la carga transmitida por los músculos. La lesión de un tendón, tanto aguda como crónica, es seguida de un proceso natural de reparación tisular. No obstante, es un proceso menos eficiente que en otros tejidos y órganos del sistema músculo-esquelético. En el caso del tendón, nunca se logra la regeneración completa después de una lesión alterándose las propiedades estructurales y mecánicas. En este sentido, a través de la Ingeniería Tisular se ha desarrollado distintos biomateriales y sustitutos para mejorar los resultados clínicos. Sin embargo, esta disciplina no ha logrado la restauración total de las propiedades estructurales, funcionales y mecánicas del tendón nativo.

En la presente Tesis Doctoral, con el objetivo de mejorar los resultados clínicos y la eficiencia de una reparación quirúrgica tras una lesión tendinosa, se propone el desarrollo y la evaluación de dos biomateriales, el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa (HNFA) y el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa tratado químicamente con genipin (HNFA-GP). Aunque estos hidrogeles han sido estudiados en otros tejidos con resultados prometedores, es la primera vez que se investiga la eficacia terapéutica de estos biomateriales en la reparación quirúrgica y el proceso de regeneración tendinosa.

Tras la generación de los hidrogeles fueron sometidos a una evaluación de sus propiedades biomecánicas y de biocompatibilidad *ex vivo*. La biomecánica fue determinada mediante pruebas de tracción. Para los estudios de biocompatibilidad, se han generado cultivos primarios de fibroblastos derivados del tendón, los cuales fueron cultivados en la superficie de los biomateriales y, posteriormente, sometidos a los ensayos de *Live/Dead*<sup>®</sup>, WST-1 y cuantificación de ADN liberado. Por último, la eficacia



terapéutica de los biomateriales fue evaluada en un modelo de daño/reparación en el tendón de Aquiles de ratas Wistar adultas. Tras el sacrificio de los animales se procedió con el estudio clínico, macroscópico e histológico de los tendones reparados. Tanto en los estudios *ex vivo* como en los *in vivo* se incluyeron controles técnicos y clínicos respectivamente.

Los resultados de esta Tesis Doctoral, en la que se determinan las propiedades estructurales y biológicas *ex vivo* y la eficacia terapéutica *in vivo* de los hidrogeles generados, permiten afirmar que: 1) tanto el NFAH como el NFAH-GP demuestran una excelente estabilidad mecánica y biocompatibilidad *ex vivo*; 2) que ambos hidrogeles muestran una mejor organización tisular en los análisis histológicos realizados en el modelo animal; 3) que ambos hidrogeles demuestran biocompatibilidad *in vivo* sin mostrar signos de necrosis ni otras respuestas histológicas adversas; 4) que ambos hidrogeles pueden ser biomateriales válidos para un uso potencial en la reparación de lesiones tendinosas.

En conclusión, los estudios *ex vivo* desarrollados en esta tesis doctoral demuestran una mejora considerable de las propiedades biomecánicas de los NFAH tras el tratamiento químico con genipin conservando un alto grado de biocompatibilidad. El uso de estos biomateriales, tanto los HNFA como los HNFA-GP, en la reparación de una lesión del tendón de Aquiles en roedores ha demostrado que estos biomateriales disminuyen las complicaciones clínicas, no han presentado ningún efecto adverso y han mejorado considerablemente el proceso de regeneración tendinosa y organización tisular en el período de tiempo estudiado. Finalmente, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que el uso de estos biomateriales, especialmente el HNFA-GP podría ser de gran utilidad en la reparación de lesiones tendinosas en la práctica clínica y, por tanto, esta Tesis Doctoral aporta los estudios preclínicos necesarios para la traslación clínica de estos medicamentos de terapias avanzadas.

## II. Introducción

Los tendones son órganos funcionales, biomecánicamente estables, que conectan de forma eficiente el músculo con el hueso permitiendo el movimiento y manteniendo la postura (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017b). Histológicamente, estos órganos están compuestos principalmente de una matriz extracelular rica en colágeno, una menor proporción de moléculas no fibrilares de la matriz extracelular y células. Las fibras de colágeno, especialmente de colágeno tipo I, están altamente organizadas y se disponen de una manera jerárquica, lo cual depende de la composición de los elementos no fibrilares de dicha matriz. Esta matriz extracelular, con características únicas en el organismo, es producida y mantenida por unas células especializadas, denominadas tenocitos, que residen entre las fibras de colágeno o en la periferia, y que son consideradas específicas del tendón (Thorpe & Screen, 2016).

La estructura y la función del tendón se afectan con frecuencia por la presencia de tendinopatías y lesiones traumáticas (Dakin et al., 2017). El tendón de Aquiles es el tendón con mayores dimensiones y biomecánicamente más fuerte del cuerpo humano. Sin embargo, es uno de los que se rompen con más frecuencia en nuestra especie, lo que está relacionado con la actividad física de dicho tendón. El tendón de Aquiles está sujeto a una carga continua que generalmente conduce al desarrollo de cambios degenerativos que predisponen a su ruptura (Cooper, 2015; Nicola Maffulli & Wong, 2003). Por otro lado, el creciente interés en actividades deportivas recreacionales (como por ejemplo el atletismo, el fútbol o el baloncesto) han conducido a incrementar la incidencia de lesiones en el tendón de Aquiles en pacientes de diferentes grupos de edad (Lantto, Heikkinen, Flinkkilä, Ohtonen, & Leppilahti, 2015; Lemme, Li, DeFroda, Kleiner, & Owens, 2018). Por lo tanto, los estudios concluyen que el nivel de actividad es un factor de riesgo importante para la ruptura tendinosa (Noback et al., 2017).

Hoy en día no existe un consenso para el tratamiento óptimo de las rupturas tendinosas (Holm, Kjaer, & Eliasson, 2015). Estudios recientes sugieren que el tratamiento conservador ofrece resultados satisfactorios con un menor número de complicaciones en las partes blandas (Kadakia, Dekker, & Ho, 2017). Sin embargo, en pacientes jóvenes o físicamente demandantes, es preferible realizar una reparación quirúrgica abierta o percutánea del tendón dañado (Movin, Ryberg, McBride, & Maffulli, 2005).

La etiología y el complejo proceso de regeneración tisular de las lesiones del tendón no es del todo conocida. Se ha demostrado que los tendones reparados nunca logran adquirir las características morfofuncionales de su estado previo a la lesión (Thevendran, Sarraf, Patel, Sadri, & Rosenfeld, 2013). A este respecto, el desarrollo y uso de estrategias basadas en la Ingeniería Tisular podrían incrementar la eficacia de los tratamientos de este tipo de lesiones y convertirse en una alternativa eficaz de tratamiento para pacientes afectados de lesiones estructurales del tendón (Hogan et al., 2011). El grupo de investigación en Ingeniería Tisular de la Universidad de Granada ha desarrollado un hidrogel de fibrina-agarosa, el cual ha sido utilizado en diversas aplicaciones biomédicas con resultados *ex vivo* e *in vivo* muy prometedores (Alaminos et al., 2006; Carriel, Scionti, et al., 2017; García-Martínez et al., 2016). Además, estudios más recientes de este grupo han demostrado que las propiedades estructurales y biomecánicas de este biomaterial se pueden modular de manera controlada a través del uso de agentes químicos o técnicas de crosslinking y la técnica de nanoestructuración (o compresión plástica) suponiendo una mejora considerable con potencial traslación clínica a la reparación de lesiones tendinosas (F. Campos et al., 2016, 2018).

# **1. Estado del arte**

El tendón es un órgano ampliamente distribuido en el organismo, encontrándose en prácticamente la totalidad del sistema músculo-esquelético. A continuación, en la presente Tesis Doctoral, se presentarán las relaciones anatómicas, histológicas y clínicas necesarias para comprender el impacto clínico de las lesiones tendinosas, así como los procesos biológicos involucrados en su regeneración. Posteriormente, se discutirán los conceptos y avances actuales en el campo de la ingeniería tisular aplicada a la reparación de las lesiones del tendón.

### **1.1. Anatomía del tendón**

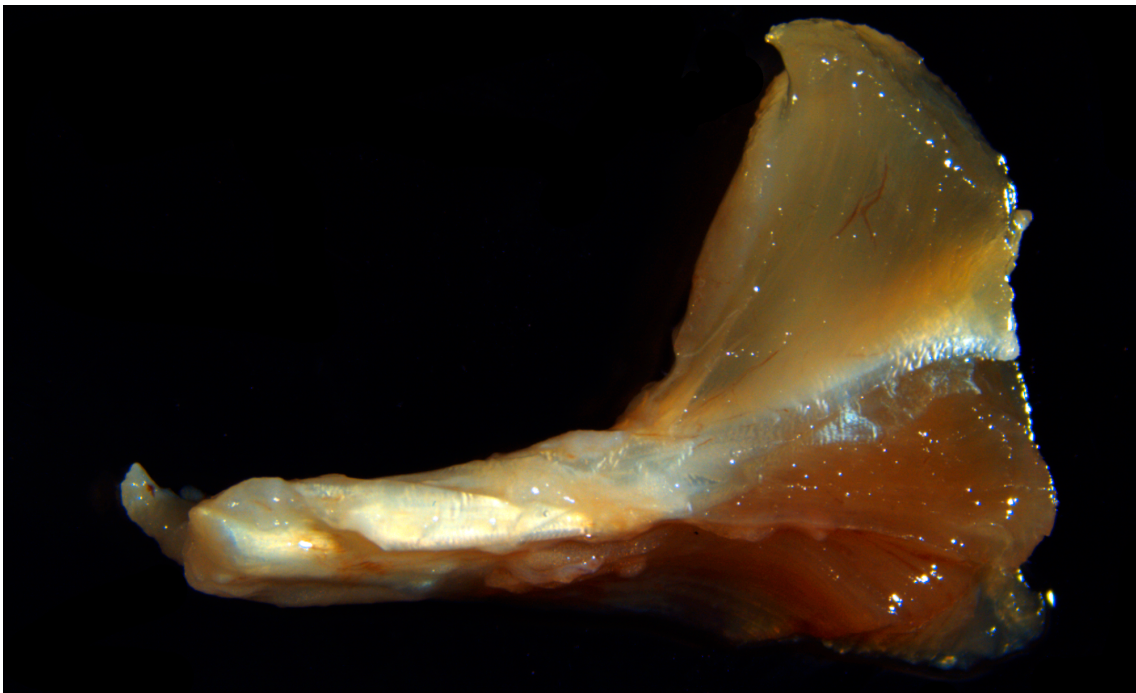
El tendón forma parte de la denominada unidad musculotendinosa y su función principal es transmitir fuerzas desde el músculo al hueso produciendo el movimiento. Los tendones son biomecánicamente más fuertes que el músculo, siendo capaces de someterse a grandes fuerzas de tensión y soportar hasta 17 veces el peso del cuerpo humano. Además, los tendones actúan absorbiendo el impacto, acumulando energía y ayudando a mantener la postura gracias a sus propiedades propioceptivas (O'Brien, 2005a).

Los tendones varían tanto en sus dimensiones como en su forma y ubicación. El tamaño del tendón tiene relación con el músculo al cual se encuentra asociado, y existen tendones de varios centímetros de longitud y diámetro, como es el caso del tendón de Aquiles. Morfológicamente estos órganos pueden ser aplanados o redondeados, simples o compuestos. En lo que respecta su ubicación, los tendones se pueden encontrar tanto en el origen como en la inserción de un determinado músculo, incluso, formar intersecciones tendinosas en el espesor del músculo (Figura 1) (O'Brien, 2005a).

Asimismo, algunos tendones pueden ser intracapsulares como, por ejemplo, el tendón de la porción larga del bíceps braquial o el tendón poplíteo. La membrana sinovial de la articulación envuelve al tendón dentro de la articulación y se extiende más allá de la misma a una distancia que es variable (O'Brien, 2005a).

Los tendones están cubiertos por vainas fibrosas, o retináculos, cuando discurren encima de prominencias o correderas óseas, para prevenir el fenómeno denominado “cuerda de arco” cuando el músculo se contrae. La mayoría de retináculos son principalmente fibrosos, pero también pueden ser cartilagosos como el retináculo peroneo inferior. Cuando los tendones se extienden a través de túneles osteofibrosos o pasan debajo de los retináculos, quedan sujetos por prolongaciones de la fascia y se envuelven por la membrana sinovial (Benjamin, Qin, & Ralphs, 1995).

Los pliegues sinoviales en las vainas osteofibrosas de las falanges de las manos y del pie se denominan *vincula longa* y *vincula brevia*. Estos pliegues contienen los vasos sanguíneos que irrigan los tendones flexores dentro de las vainas. La *vincula longa* es más delgada y se encuentra proximalmente, mientras que la *vincula brevia* es más corta y se encuentra distalmente cerca de la inserción ósea. El revestimiento de las vainas es predominantemente celular y vascular, secretando líquido sinovial y siendo especialmente reactivas a procesos inflamatorios (O’Brien, 2005a).



**Figura 1:** Apariencia macroscópica del tendón de Aquiles fijado en formalina y posteriormente explantado de una rata Wistar adulta (imagen original de la presente Tesis Doctoral).

### **1.1.1. Anatomía del tendón de Aquiles**

El tendón de Aquiles es el modelo experimental utilizado en la presente Tesis Doctoral y, por tanto, sus propiedades anatómicas e histológicas son de gran relevancia para el presente proyecto.

El tendón de Aquiles es el tendón más grande y más grueso de nuestro organismo. Tiene una longitud aproximada de 150 mm, un espesor de 5-7 mm y una anchura de 20 mm (O'Brien, 2005b). Se trata del tendón conjunto de los músculos gastrocnemio y sóleo, cuya contribución relativa de cada músculo varía entre individuos. Estos músculos y el tendón de Aquiles se encuentran en el compartimento posterior y superficial de la pierna siendo los principales flexores plantares del tobillo (Rouvière & Delmas, 1999).

El músculo gastrocnemio es un músculo de morfología fusiforme, y cuyo origen tiene una cabeza medial que surge en la superficie poplítea del fémur, posterior a la línea medial supracondílea y el tubérculo aductor del cóndilo medial. Asimismo, posee una cabeza lateral que se origina en la zona posterolateral del cóndilo lateral del fémur. Ambas cabezas cruzan la zona posterior de la articulación de la rodilla. Este músculo es el más superficial de la parte posterior de la pierna y es el que proporciona el aspecto característico de ésta (Rouvière & Delmas, 1999).

El músculo sóleo es un músculo más profundo al gastrocnemio. Es un músculo plano y ancho que debe su nombre a su parecido con el pez lenguado (en latín, solea solea). Este músculo se origina en la línea oblicua y el tercio medio del borde medial de la tibia, en el arco fibroso entre la tibia y el peroné y en la superficie posterior de la cabeza del peroné. Este músculo se puede palpar a ambos lados del gastrocnemio cuando el sujeto se pone de puntillas. Junto a este músculo forma el denominado músculo tríceps sural gracias a la acción conjunta del tendón de Aquiles (O'Brien, 2005b; Rouvière & Delmas, 1999).

El músculo plantar es un músculo delgado y pequeño, vestigial, que se origina en la superficie poplítea del fémur, cuyo tendón discurre entre el gastrocnemio y el sóleo insertándose en el aspecto medial del calcáneo. Está ausente en el 8% de los individuos y a menudo se utiliza como injerto (O'Brien, 2005b; Rouvière & Delmas, 1999).

Las fibras del tendón de Aquiles no son estrictamente verticales y poseen un grado variable de rotación tras la unión miotendinosa. Este tendón se inserta en el hueso calcáneo mediante una entesis que ayuda a la disipación del estrés del tendón a nivel de su inserción (Doral et al., 2010).

Los tendones, al igual que el resto de los tejidos y órganos poseen un sistema de irrigación sanguínea e inervación. La mayoría del aporte sanguíneo al tendón de Aquiles se produce a través de una red de pequeños vasos a través del paratenon. La mayoría del paratenon es irrigado por la arteria tibial posterior. La arteria peronea irriga una pequeña sección central del tendón (O'Brien, 2005b; Rouvière & Delmas, 1999).

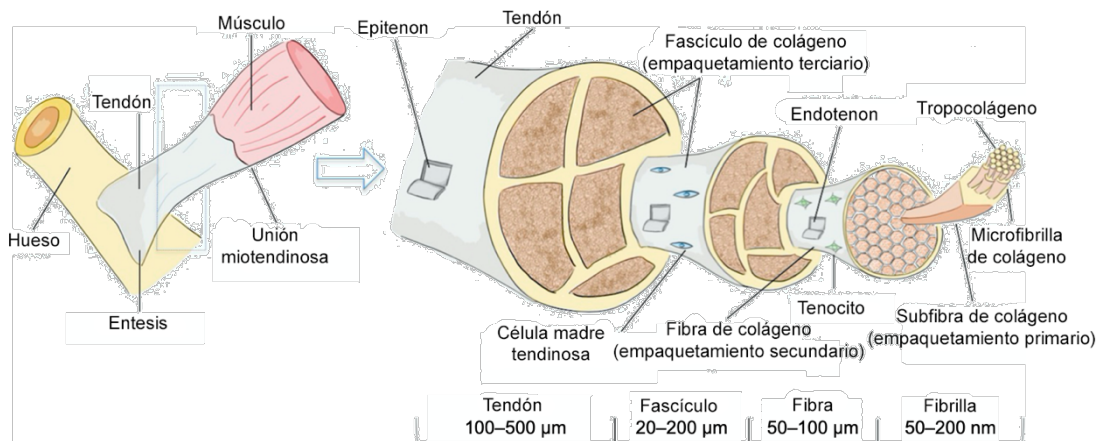
La inervación a los músculos del compartimento posterior de la pierna se produce predominantemente a través del nervio tibial, con contribuciones del nervio sural al tendón de Aquiles. El nervio tibial se encarga de la inervación motora de los músculos sóleo y gastrocnemio y también de la inervación sensitiva de la parte posterior de la pierna. El nervio sural es un sensitivo, y cruza la parte posterior del tendón de Aquiles (de medial a lateral) a una distancia variable entre individuos. Esta ubicación anatómica hace a este nervio especialmente sensible a lesiones iatrogénicas durante la cirugía (Dederer & Tennant, 2019).

## **1.2. Histología del tendón**

Los tendones son estructuras con una histología relativamente simple, caracterizada por un alto grado de organización jerárquica. En un tendón, predomina la matriz extracelular frente al componente celular, siendo las moléculas de colágeno tipo I su elemento principal. Las fibras de colágeno se caracterizan por tener en su composición los aminoácidos hidroxiprolina, hidroxilisina y glicina. Estos aminoácidos se



organizan en una triple hélice dando lugar a la formación de las moléculas de tropocolágeno. Cinco estructuras de tropocolágeno constituyen una microfibrilla que se conectan unas a otras mediante enlaces covalentes formando fibrillas que se agrupan entre sí en forma de fibras de colágeno (Figura 2) (Junqueira & Carneiro, 2015; Sherman, Yang, & Meyers, 2015). Las fibras constituyen el conocido nivel de empaquetamiento primario y se agrupan formando la siguiente estructura jerárquica, el fascículo o nivel de empaquetamiento secundario (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017b). Estos dos niveles se separan entre sí mediante el endotenon, que son capas ricas en células entre la matriz extracelular y que facilita el deslizamiento entre las fibras y fascículos. Finalmente, los fascículos se unen rodeados de un epitenon y constituyendo el tendón. Además, algunos tendones poseen un paratenon, que es una vaina que rodea al tendón en su totalidad y que está bien diferenciada de las vainas tendinosas donde asientan la patología denominada tenosinovitis (Buschmann et al., 2013). Por este motivo, el paratenon es conocido como la falsa vaina tendinosa pero juega un papel fundamental para prevenir las adherencias tendinosas (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017b).



**Figura 2:** Esquema de la estructura del tendón (adaptado de Lipman, Wang, Ting, Soo, & Zheng, 2018).

### **1.2.1. Matriz extracelular**

La matriz extracelular del tendón está compuesta principalmente por las fibras de colágeno. Alrededor de estas fibras de colágeno se dispone la sustancia fundamental (compuesta por proteoglicanos, glicoproteínas y otras pequeñas moléculas) junto a los componentes inorgánicos (Kannus, 2000).

#### **1.2.1.1. Colágeno**

Las fibras colágenas son las moléculas más abundantes del organismo, y existen más de 28 tipos descritos (Sherman et al., 2015). El principal tipo de colágeno presente en el organismo y en el tendón es del tipo I, que en este último representa aproximadamente el 90% del contenido total de colágeno. Sin embargo, existen otros tipos de colágeno a nivel tendinoso. El colágeno del tipo III comprende hasta el 10% del contenido de colágeno del tendón normal y se cree que es esencial para la fibrillogénesis y organización tisular de las fibras de colágeno tipo I. El colágeno tipo V se localiza predominantemente en el núcleo de las fibrillas de colágeno tipo I y se cree que actúan como guía para la fibrillogénesis del mismo. El colágeno tipo VI, tiene una distribución pericelular característica. Otras variedades de las fibras colágenas participan en la estabilización y organización de las moléculas de la matriz extracelular y, especialmente, de la red compuesta por colágenos fibrilares (I, III, IV) de mayor tamaño y de gran importancia en la biomecánica del tendón; siendo estos colágenos los de tipo XII y XIV (Thorpe, Birch, Clegg, & Screen, 2015).

#### **1.2.1.2. Proteoglicanos**

Son moléculas con un núcleo proteico, o cadena polipeptídica, a la cual se unen una cantidad variable de cadenas de disacáridos. Estas cadenas de disacáridos son denominados glicosaminoglicanos, de los cuales existen cinco variedades: ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato (F. Zhang, Zhang, & Linhardt, 2009).

La clasificación de los proteoglicanos es muy compleja, y un gran número de moléculas constituye las diferentes familias de proteoglicanos conocidas. En los tendones, la mayoría de los proteoglicanos pertenecen a la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRPs) que incluye moléculas como decorina, biglycan, fibromodulina y lumican (Iozzo & Schaefer, 2015). Además, en el tendón existen proteoglicanos de mayor tamaño. Por ejemplo, el agregano, un proteoglicano característico del tejido cartilaginoso, el cual tiende a expresarse predominantemente en regiones del tendón sometidas a fuerzas de compresión (Godoy-Guzmán, Nuñez, Orihuela, Campos, & Carriel, 2018). Otro ejemplo es el versicano que se localiza en la matriz interfascicular con una distribución pericelular. Además, éste último también interactúa con las fibras elásticas contribuyendo a las propiedades estructurales de esta matriz.

Si bien existe un gran número de proteoglicanos a nivel de tendón, la decorina es la molécula más abundante constituyendo alrededor del 80% del contenido de estas moléculas en el tendón. La decorina es un proteoglicano en forma de herradura que se enlaza de forma no covalente a una región específica de la fibrilla de colágeno. Una única cadena lateral de condroitín sulfato o dermatan se ancla a la decorina de forma que la cadena de glicosaminoglicanos se alinea de forma perpendicular o paralela al eje largo de la fibrilla de colágeno (Thorpe et al., 2015). Estas cadenas laterales pueden interactuar con otras cadenas laterales de moléculas de colágeno adyacentes formando un puente interfibrilar. El biglicano también contiene estas cadenas laterales y se une a la fibrilla de colágeno en un lugar similar. El lumicano y la fibromodulina poseen cadenas laterales de queratán sulfato, compartiendo sitios de unión en la fibrilla de colágeno, distintos del sitio de unión de la decorina y biglicano.

Se piensa que los SLRPs (y en particular la decorina), al participar en el proceso de fibrillogénesis y organización tridimensional de la matriz de colágeno, contribuyen a las propiedades mecánicas del tendón, transfiriendo la fuerza entre fibrillas de colágeno adyacentes. Mientras que cada enlace molecular entre las cadenas laterales de decorina adyacentes es débil, cuando se combinan pueden alcanzar una magnitud significativa

para transferir fuerzas entre las fibrillas. Por otro lado, la decorina tiene un papel alineando y estabilizando las fibrillas de colágeno durante su formación además de inhibiendo su fusión lateral y regulando el diámetro de las fibrillas (Thorpe et al., 2015).

Por último, la lubricina es un proteoglicano de gran tamaño, que posee características similares a las mucinas y es esencial en el normal funcionamiento del cartílago articular (Mills, 2019). Se ha demostrado que este proteoglicano se expresa de manera preferente en la superficie del tendón y en zonas sometidas a fuerzas de compresión. Su papel es lubricar a los tendones cuando sus superficies necesitan deslizarse unas sobre otras (Thorpe et al., 2015).

### **1.2.1.3. Glicoproteínas y otras moléculas de la matriz extracelular**

Las glicoproteínas están compuestas por proteínas globulares a las cuales se unen de forma covalente desde un monosacárido a una cadena de polisacáridos (Junqueira & Carneiro, 2015). La glicoproteína más abundante del tendón es la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (*cartilage oligomeric matrix protein, COMP*) que es una proteína grande pentamérica formada por cinco subunidades dispuestas alrededor de un cilindro central. Su función en el tendón es desconocida pero la mutación en los genes que codifican para la COMP se asocia con pseudocondroplasia, una enfermedad caracterizada por laxitud articular y otras anomalías musculoesqueléticas (Maddox, Mokashi, Keene, & Bächinger, 2000).

La tenascina C es una glicoproteína de la matriz extracelular que aumenta su expresión en tejido inmaduro o patológico. Su función en el tendón no se ha establecido, pero se encuentra expresada en altas concentraciones en aquellos lugares donde el tendón experimenta el mayor estrés mecánico por lo que se ha planteado la hipótesis de que la tenascina C podría proporcionar elasticidad tisular (Jarvinen, 2003).

La elastina es una proteína con una concentración que oscila entre el 1 y 10% del peso seco del tendón. Su papel y localización en el tendón son inciertos, pero constituyen las fibras elásticas, las cuales son altamente resistentes a la fatiga y tienen la capacidad para el almacenamiento de la energía. Estas fibras están formadas por un núcleo central de la proteína elastina que se rodea por una envoltura de polímeros y otras proteínas asociadas, que se conocen como microfibrillas, como por ejemplo la fibrilina (Thorpe & Screen, 2016).

#### **1.2.1.4. Componentes inorgánicos**

Los componentes inorgánicos constituyen menos del 0.2% del peso seco del tendón, en el cual se han detectado una amplia variedad de estos elementos (Kannus, 2000).

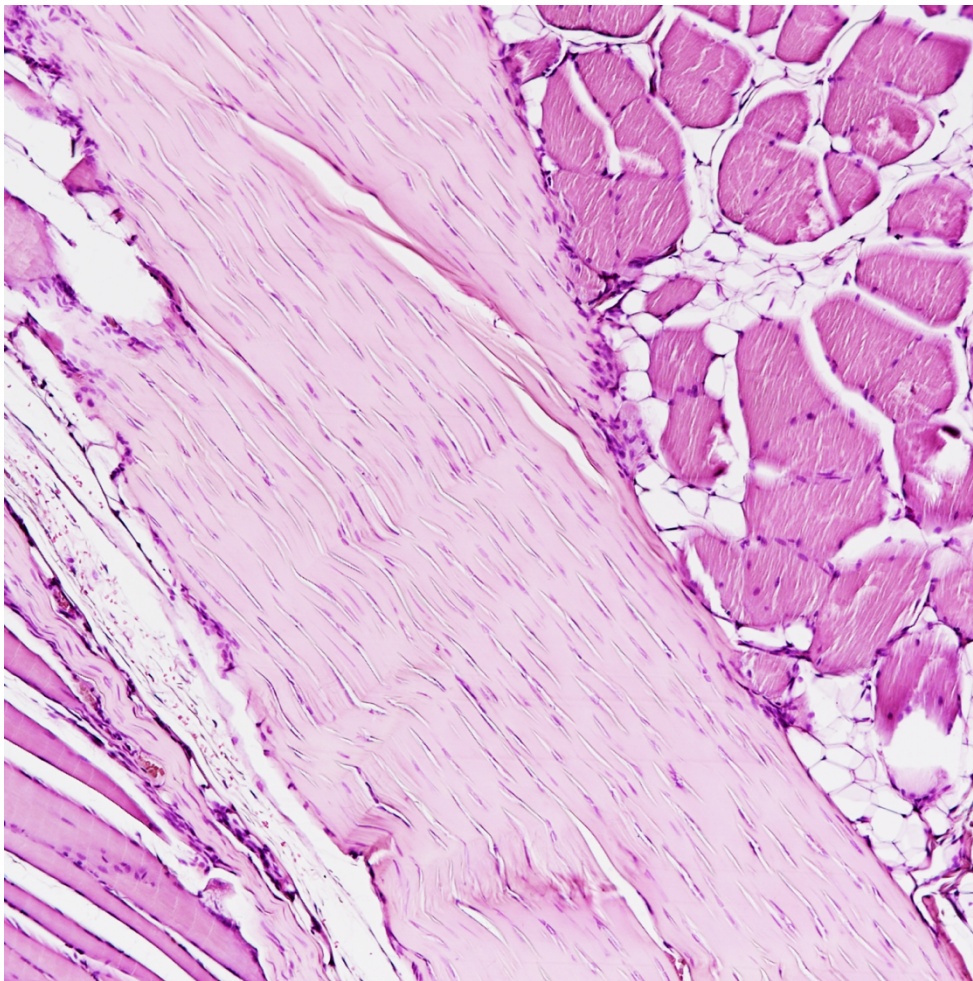
El calcio es el componente que se encuentra a más altas concentraciones, del orden del 0.001-0.01% del contenido seco del área tensional del tendón normal y entre el 0.05-0.1% a nivel de la inserción tendinosa. En condiciones patológicas, como una tendinopatía calcificante, se puede detectar un aumento de entre 10 a 20 veces del contenido de calcio (Lászlo Józsa, Lehto, Kvist, Bálint, & Reffy, 1989).

Se han detectado otros componentes inorgánicos como el magnesio, manganeso, cadmio, cobalto, cobre, zinc, níquel, litio, plomo, flúor, fósforo y silicio. Estos elementos se encuentran en una concentración de 0.02 a 120 partes por millón en el tejido tendinoso (Kannus, 2000).

De manera general, los componentes inorgánicos están implicados íntimamente en el crecimiento, desarrollo y metabolismo normal de las estructuras musculoesqueléticas. Por ejemplo, el cobre tiene un papel importante en el crosslinking del colágeno, el manganeso se requiere para las reacciones enzimáticas durante la síntesis de las moléculas del tejido conectivo y el calcio tiene un papel principal en el desarrollo de la unión osteotendinosa (Kannus, 2000).

### 1.2.2. Células

La matriz extracelular es producida y mantenida por las células del tendón o tenocitos. Estas células son consideradas fibroblastos especializados y están presentes en una baja densidad celular (Figura 3). Las células en el tendón se disponen entre las fibras de colágeno (intrafasciculares) o agrupadas entre los fascículos de colágeno (interfasciculares). Los tenocitos intrafasciculares son células alargadas con núcleos extensos y una red compleja de procesos citoplasmáticos que se extienden a través de la matriz extracelular para conectar células adyacentes, mientras que los tenocitos interfasciculares tienen una forma más redondeada. Esta heterogeneidad y distinción en el fenotipo celular aún no han sido dilucidadas (Thorpe et al., 2015; Thorpe & Screen, 2016).



**Figura 3:** Corte histológico de un tendón de rata teñido con la técnica de hematoxilina y eosina. Se pueden observar las células intrafasciculares (de aspecto alargado) y las células interfasciculares (de morfología redondeada). Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

Por otro lado, existen células periféricas en el tendón, de naturaleza vascular, que se encargan de aportar sangre a las células tendinosas. Comparado con los músculos, los tendones tienen un menor aporte sanguíneo que es debido a su mayor actividad metabólica comparada con los tendones. Por esta razón, un tendón explantado es de un color “blanco nacarado” macroscópicamente, mientras que los músculos tienen color rojizo característico (Junqueira & Carneiro, 2015).

Por último, se ha descrito la presencia en el tejido tendinoso de células sinoviales a nivel de la vaina del tendón y células de revestimiento sinovial. Existen dos tipos celulares principales. Las células A que producen ácido hialurónico actuando como lubricante y son responsables de la fagocitosis. Las células B sintetizan proteínas y son capaces de realizar fagocitosis (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017b).

Además, en los últimos años se ha demostrado la presencia de una población de células con capacidad potencial de diferenciación en el tendón humano (de Mos et al., 2007). Estas células madre tendinosas (*tendon stem cells*, TSC) se encuentran en la matriz extracelular del tendón y se ha demostrado que tanto el biglicano como la fibromodulina son fundamentales a la hora de formar los correspondientes nichos celulares para esta variedad de células madre mesenquimales adultas (Bi et al., 2007). Las células madre del tendón comparten las características generales de otras células adultas multipotentes: forman colonias, son capaces de renovarse a sí mismas y se pueden diferenciar en múltiples tipos celulares y, además, son mecanosensibles. Se ha demostrado que un estiramiento leve de hasta el 4% puede inducir su diferenciación en tenocitos. Sin embargo, un estiramiento del 8% induce su diferenciación a condrocitos, osteocitos o adipocitos (J. Zhang & Wang, 2009). No obstante, las células madre tendinosas son capaces de expresar más ARNm relacionado con la diferenciación tenogénica que otras células madre mesenquimales en las mismas condiciones

experimentales, siendo característica la expresión de los genes que codifican para tenomodulina, Scx, colágeno tipo I, decorina y biglycano por parte de estas células (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017b).

### **1.3. Biomecánica del tendón**

La organización fibrilar y organizada del colágeno en el tendón da lugar a un material de propiedades altamente anisotrópicas. La anisotropía se define como una característica de la materia en que sus propiedades físicas dependen de la dirección de la fuerza aplicada. Es una característica muy importante en el tendón, asegurando su rigidez en su eje longitudinal y asegurando soportar la carga axial, permitiendo transferir la fuerza muscular hacia el hueso a través de la longitud del tendón (Williams, Elder, Bouvard, & Horstemeyer, 2008).

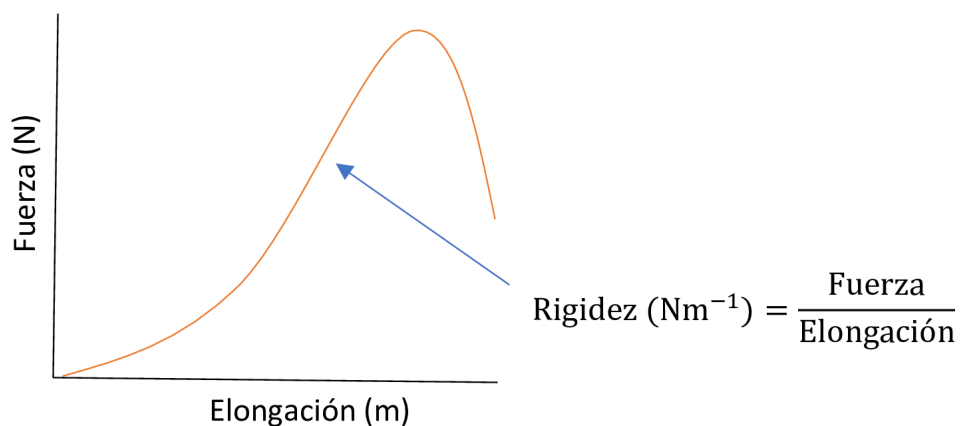
Por otro lado, el colágeno está rodeado de una matriz extracelular rica en proteoglicanos en cada nivel de su estructura jerárquica, que convierte al tendón en un material “compuesto” a distintos niveles. Esto permite combinar las propiedades de cada uno de sus componentes y asegurar una resistencia al daño, ya que la alteración de un área del tendón no se propaga fácilmente a través del tejido (Williams et al., 2008).

Una buena analogía de las propiedades biomecánicas del tendón es una cuerda: mientras que es capaz de soportar una fuerza de tracción longitudinal es incapaz de mantener una fuerza de compresión y se doblaría. Además, es difícil de asegurar mantener una fuerza de tracción en sentido transversal. De hecho, si se mantiene la fuerza de tracción en sentido transversal, se producirá una reorganización de la matriz extracelular para adaptarse a este cambio de dirección (Beach, Gittings, & Soslowky, 2017; Thorpe et al., 2015).



### 1.3.1. Evaluación biomecánica

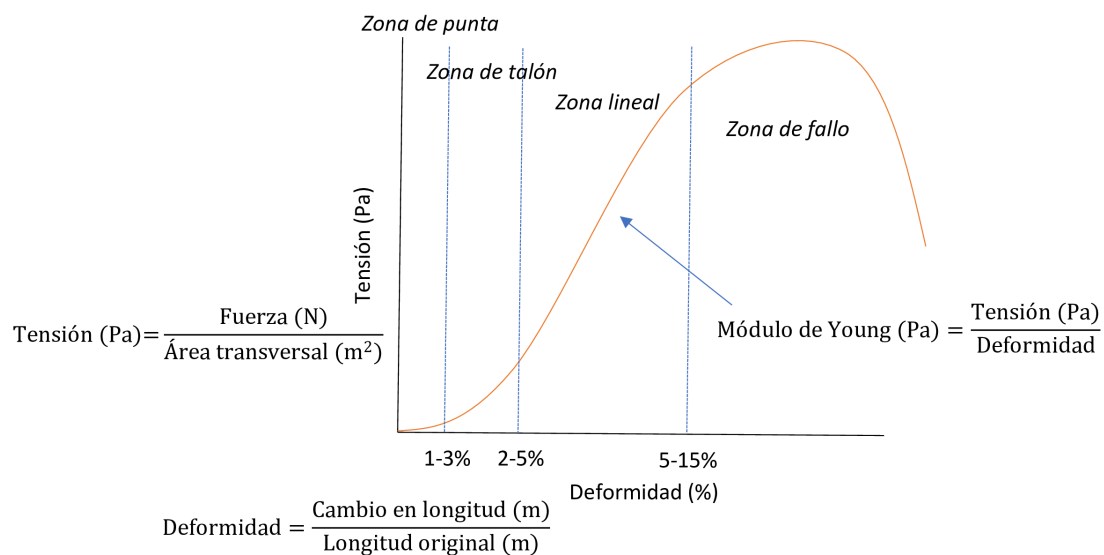
Los primeros estudios sobre la biomecánica del tendón fueron realizados *in vitro* debido a su razonable sencillez: someter una muestra de tendón aislada a una fuerza hasta provocar su fallo para investigar su respuesta mecánica. Este test de tensión uniaxial se realiza a velocidad constante y los cambios de longitud como la fuerza aplicada se miden y se registran en una curva de fuerza-extensión que describe la respuesta mecánica a la fatiga (Figura 4) (Thorpe et al., 2015).



**Figura 4:** Esquema del cálculo de la rigidez de un material (adaptado de Thorpe et al., 2015).

La pendiente de esta curva describe la rigidez del material, una pendiente más pronunciada significa que se necesita más fuerza para elongar el tendón y, por tanto, describe un tendón más rígido (Figura 4). Este tipo de curva de tensión-deformidad se aplica de forma genérica a materiales homogéneos utilizados en Ingeniería como el titanio. De forma que la fuerza de rotura y la deformidad deben ser idénticos independientemente del tamaño de la muestra (Thorpe et al., 2015). Sin embargo, no es tan simple de aplicar a un tejido como el tendón, donde la cantidad de fuerza que puede soportar como la cantidad de elongación depende del tipo y dimensiones del tendón.

De este modo, la curva de tensión-deformidad esquemática del tendón representa la respuesta mecánica no lineal típica del tendón, en donde se pueden diferenciar cuatro regiones diferentes: la zona de punta, la zona de talón, la zona lineal y la zona de fallo (Figura 5). El comportamiento inicial de baja rigidez del tendón en la zona de punta se debe al reordenamiento y realineación del colágeno hasta que se alienan completamente en dirección a la carga. A continuación, en la zona de talón, donde la rigidez comienza a aumentar. En esta etapa se produce un reordenamiento del colágeno a nivel molecular y una realineación a nivel fibrilar. Si la tensión continua, conduce a la zona de mayor rigidez de la curva donde la carga es soportada directamente por las unidades de colágeno del tendón (Woo, 1982). Existe mucha controversia acerca de cómo se comporta el tendón en la región lineal. Parece ser que, como cualquier material compuesto, se produce una combinación de extensión y deslizamiento de las unidades de colágeno y de la matriz extracelular a cada nivel jerárquico del tendón. Una mayor aplicación de tensión provocaría su fallo. Usualmente ocurre con una pérdida gradual de la fuerza debido a que las fibras de colágeno se desanclan en el espesor del tendón.



**Figura 5:** Esquema de la curva tensión-deformidad del tejido tendinoso (adaptado de Thorpe et al., 2015).

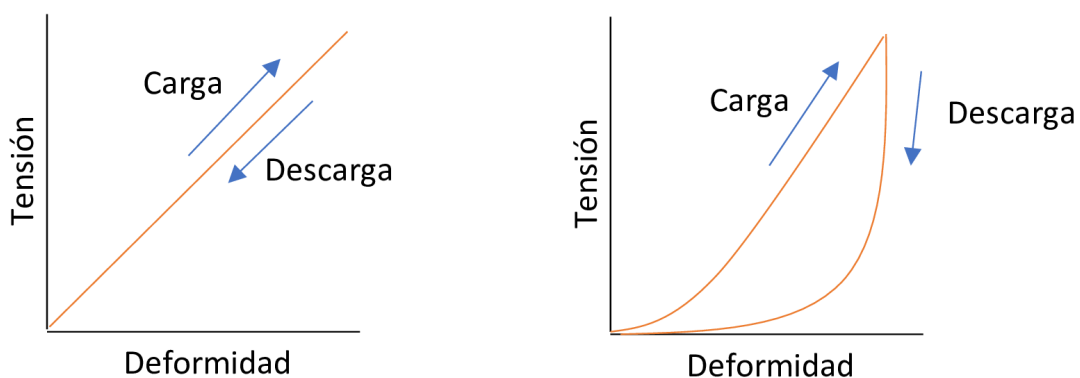
El concepto de calcular un valor único de módulo de Young es muy difícil debido al hecho de que la pendiente de esta curva tensión-deformidad cambia continuamente, de forma que existen claras diferencias entre distintos tendones, que se relacionan con la función que se requiere de cada uno de ellos (Screen, Berk, Kadler, Ramirez, & Young, 2015).

Los estudios biomecánicos más recientes se han centrado en estudiar el comportamiento *in vivo* del tendón. Hay que tener en cuenta de que cada metodología realizada está sujeta a diferentes limitaciones que se deben considerar (Thorpe et al., 2015).

### 1.3.2. Viscoelasticidad

El tendón es un material viscoelástico, combinando propiedades de materiales elásticos y viscosos, por lo que la realización de test cuasi-estáticos aislados no reflejan fehacientemente el comportamiento mecánico del tendón (Thorpe et al., 2015).

Un material viscoelástico es aquel en el que la respuesta a la carga mecánica incorpora la variable del tiempo. Cuando se somete a tensión un material elástico y después se retira la fuerza, sigue una curva de carga-descarga idéntica con una relación entre la fuerza y la deformidad constante. En contraste, el material viscoelástico incorpora la variable del tiempo a su respuesta, de forma que la curva de descarga no se superpone con la curva de carga, de forma que el material no recupera su tamaño inicial de manera inmediata tras retirar la fuerza aplicada (Figura 6) (Thorpe et al., 2015).

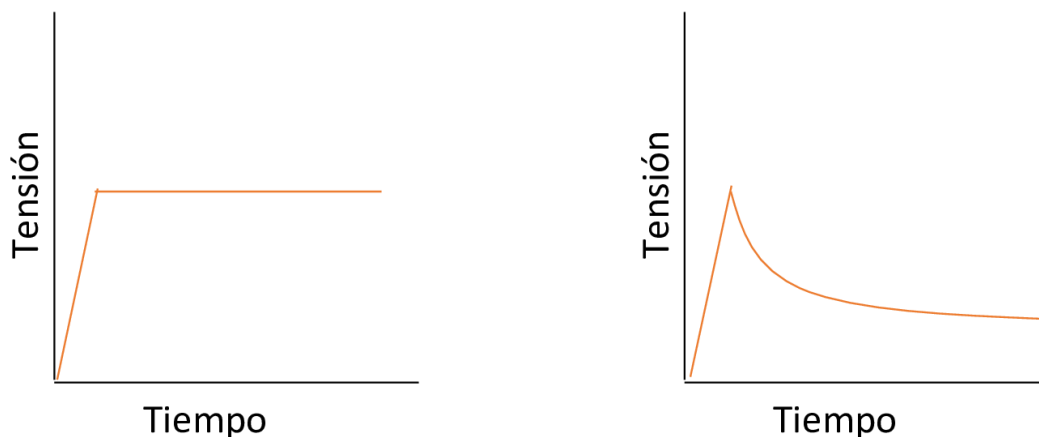


**Figura 6:** Esquema biomecánico de carga-descarga (adaptado de Thorpe et al., 2015).

Un material elástico muestra una recuperación inmediata de la carga y una curva idéntica de carga y descarga mientras que un material viscoelástico no vuelve a sus dimensiones originales de inmediata.

Este tipo de comportamiento se denomina histéresis y el área entre ambas curvas representa la cantidad de energía perdida durante el ciclo de carga. En realidad, ningún material es completamente elástico, pero en los materiales viscoelásticos la presencia de histéresis es destacada y, por tanto, la pérdida de energía es clara. La histéresis es debida al movimiento del agua a través del tejido y al reordenamiento de las fibras a distintos niveles (Thorpe, Birch, Clegg, & Screen, 2013).

Otro mecanismo que se ha investigado en tejidos viscoelásticos se realiza con test biomecánicos que aplican una fuerza a una muestra con un valor constante para ver cómo responde a lo largo del tiempo. Un material elástico no muestra cambios en la tensión a lo largo del tiempo mientras que un material viscoelástico se reorganiza de manera continua para reducir la tensión hasta alcanzar un equilibrio. Las medidas de la tasa de relajación y equilibrio caracterizan el grado de viscoelasticidad (Figura 7) (Thorpe et al., 2015).



**Figura 7:** Esquema biomecánico de tensión-relajación (adaptado de (Thorpe et al., 2015).

Cuando en un material elástico se mantiene una tensión seleccionada, ésta permanece constante hasta que se elimina la tensión. Por el contrario, en un material viscoelástico la reorganización molecular del mismo contribuye a una caída constante en la tensión con el tiempo (Thorpe et al., 2015).

Aun así, es muy difícil representar gráficamente de forma fehaciente el comportamiento del tendón *in vivo* durante la carga donde, por ejemplo, el músculo es capaz de controlar la carga aplicada al tendón. Sin embargo, este tipo de test se han utilizado con el objetivo de investigar cómo la carga afecta a la estructura tendinosa y la respuesta celular (Thorpe & Screen, 2016).

### **1.3.3. Influencia de los factores biológicos en el comportamiento biomecánico**

Algunos factores biológicos, tanto modificables como no modificables, afectan de forma significativa a las propiedades mecánicas del tendón.

Los factores no modificables incluyen la edad, el género o la localización anatómica. Se ha demostrado que la edad avanzada es un factor de riesgo bien establecido de lesión tendinosa. Se ha descrito una disminución de las propiedades mecánicas con la edad, aunque los mecanismos que explican este fenómeno aún no se han establecido (Birch, Peffers, & Clegg, 2016). Además, el género parece ser otro factor de riesgo para la susceptibilidad a la lesión tendinosa. Esto es debido a que los estrógenos participan en la regulación de la composición del colágeno y reducen su capacidad de respuesta mecánica junto a un aumento de la laxitud articular, lo que predispone a un mayor riesgo de lesión tendinosa (Hansen & Kjaer, 2016). La localización anatómica del tendón en el cuerpo es otro factor no modificable que afecta a las propiedades mecánicas del tendón. Esto es debido a que, de manera similar a lo que se ha demostrado *ex vivo*, las diferencias en los ciclos de carga, en la temperatura local y las dimensiones en diferentes regiones anatómicas del cuerpo, afectan a las propiedades mecánicas del tendón (Maganaris, 2002).

En contraste con los factores biológicos no modificables, los factores modificables ofrecen la potencial posibilidad de ser optimizados en el tratamiento de la patología tendinosa. Un ejemplo de factores modificables son las comorbilidades y el nivel de actividad. Comorbilidades como la diabetes, la hipercolesterolemia, el tabaquismo o la enfermedad renal han demostrado afectar de forma negativa a la mecánica del tendón (Beason et al., 2013; Connizzo, Bhatt, Liechty, & Soslowky, 2014). El ejercicio físico influye profundamente a la mecánica del tendón. De hecho, el incremento de la actividad física aumenta los valores del el módulo de Young comparado con controles emparejados por edad (Freedman, Sarver, Buckley, Voleti, & Soslowky, 2014). Además, el retorno temprano a la actividad tras una lesión tendinosa aguda ha demostrado mejorar las propiedades mecánicas del tendón (Beach et al., 2017).

#### **1.3.4. Biomecánica del tendón de Aquiles**

El tendón de Aquiles es el tendón más fuerte de todo el cuerpo humano ya que se encarga de transmitir la fuerza generada por los potentes músculos flexores plantares del tobillo. Además del tobillo actúa sobre la articulación de la rodilla y de la articulación subtalar de forma que tiene una función en lograr un movimiento y estabilidad óptimos (Dawe & Davis, 2011).

El tendón de Aquiles alcanza cargas de 2.6 kN durante la marcha, de 3.8 kN saltando con una sola pierna, de 2.2 kN saltando en cuclillas y de 1.9 kN durante el salto a contramovimiento. Corriendo, el tendón de Aquiles experimenta cargas mayores a 9 kN, equivalentes a unas 12 veces el peso corporal. En los estudios realizados *ex vivo* este tendón mostró una media de 1-2 GPa de módulo de Young, 100 MPa de esfuerzo a la rotura y de 4-10% de deformación a la rotura (Fukashiro, Komi, Järvinen, & Miyashita, 1995).

La función del tendón de Aquiles *in vivo* se ha medido por técnicas de ultrasonografía de alta resolución y 3D, resonancia magnética nuclear, dinamometría y elastografía (Winnicki, Ochała-Kłós, Rutowicz, Pękala, & Tomaszewski, 2020). Estas técnicas han permitido cuantificar el comportamiento del tendón de Aquiles durante

varias actividades. Mientras el individuo corre, el tendón de Aquiles puede soportar cargas de hasta 110 MPa. Recordemos que la media del esfuerzo a la rotura es de 100 MPa, lo que explicaría por qué el tendón de Aquiles puede romperse en un movimiento único. Estos estudios han demostrado la elasticidad efectiva del tendón de Aquiles siendo capaz de recuperar alrededor del 16% de la energía durante el salto y del 6% durante la marcha (Lichtwark, 2005). Aun así, se necesitan estudios biomecánicos más preciosos, para establecer los valores de referencia para el tendón humano.

Por otro lado, se ha demostrado que los distintos patrones de pisada influyen en distintos parámetros del tendón de Aquiles como la capacidad de carga o la fuerza producida. Por ejemplo, una pisada predominante en el antepié tiene un mayor pico de velocidad de transmisión de ultrasonidos durante la marcha comparado con un patrón de pisada en el retropié sugiriendo una diferencia en el módulo elástico específico del tendón de Aquiles entre estos dos patrones de la pisada. Un mayor módulo elástico del tendón tiene una teórica ventaja en aquellas actividades que necesiten una rápida adaptación protegiéndolo de una posible ruptura, aunque aún son necesarios más estudios para precisar la etiología de esta adaptación tendinosa (Winnicki et al., 2020).

#### **1.4. Biología de la regeneración tendinosa**

En contraste con otros tejidos del sistema musculoesquelético, la curación de un tendón requiere normalmente de mucho tiempo debido a las características inherentes de este tejido conectivo. Esto se atribuye principalmente a la falta de un soporte vascular adecuado junto a la presencia de células de bajo metabolismo, a las cuales se añade su pobre potencial regenerativo (Elliot & Giesen, 2013).

Tras una lesión aguda, la curación tendinosa ocurre en tres etapas o fases solapadas que se distinguen por las distintas células y eventos bioquímicos presentes: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017a).

### **1.4.1. Fase inflamatoria**

En la fase inflamatoria inicial, los eritrocitos y las células inflamatorias, particularmente los neutrófilos, llegan al lugar de la lesión. En las primeras 24 horas, las células predominantes son los monocitos y macrófagos, las cuales se encargan de la fagocitosis del material necrótico. Durante este periodo se liberan factores quimiotácticos y vasoactivos que incrementan la permeabilidad vascular, se inicia la angiogénesis, se estimula la proliferación de los tenocitos y el reclutamiento de un mayor número de células inflamatorias. Los tenocitos migran gradualmente al lugar de la lesión, iniciándose la síntesis de colágeno del tipo III (N. Maffulli, Longo, Sharma, & Denaro, 2010).

### **1.4.2. Fase proliferativa**

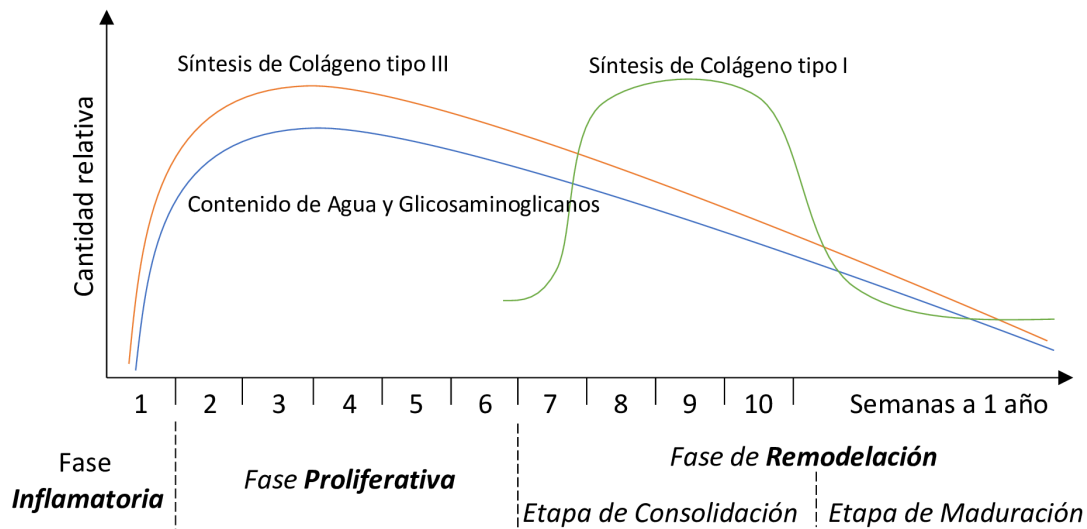
Tras unos días comienza la fase proliferativa, donde destaca el reclutamiento y proliferación rápida de fibroblastos. La síntesis de colágeno tipo III y la concentración de ADN alcanzan su punto más alto en esta fase. Se organiza un tejido de reparación desorganizado, rico en células y, al final de esta fase, este tejido contiene abundante agua y glicosaminoglicanos (Hogan et al., 2011).

### **1.4.3. Fase de remodelación**

Tras 6 semanas aproximadamente, comienza la fase de remodelación. Durante esta fase, se reorganiza el tejido de reparación disminuyendo la celularidad y la síntesis de colágeno y componentes de la matriz extracelular. Esta fase se puede dividir en una etapa de consolidación y una etapa de maduración. La etapa de consolidación comienza alrededor de las 6 semanas y continúa hasta las 10 semanas. En este periodo, el tejido de reparación cambia de celular a fibroso. El metabolismo de los tenocitos permanece alto en este periodo y, junto al colágeno, se alinean en dirección a la fuerza. Una mayor proporción de colágeno tipo I se sintetiza en esta fase. Tras 10 semanas, tiene lugar la etapa de maduración, donde el tejido de reparación se transforma a tejido de cicatrización con el paso del tiempo. Durante la última mitad de esta fase, el



metabolismo de los tenocitos y la vascularización disminuye. A medida que avanza esta fase, el crosslinking del colágeno incrementa las propiedades biomecánicas del tejido. Sin embargo, nunca se adquieren las características propias del tendón nativo o sano (Figura 8) (Hogan et al., 2011; N. Maffulli et al., 2010).



**Figura 8:** Esquema de las fases del proceso de reparación biológica del tendón (adaptado de (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017a).

#### 1.4.4. Mecanismo intrínseco y extrínseco de la regeneración tendinosa

La regeneración tisular del tendón está soportada por un mecanismo intrínseco y uno extrínseco. Por un lado, en el mecanismo intrínseco, las células encargadas de llevar a cabo la regeneración tisular proceden del propio tejido, y son los tenoblastos y tenocitos. En el estado lesional, estas células migran desde el endotenon y epitenon hasta el lugar de la lesión para promover la regeneración tisular (Sharma & Maffulli, 2006). Por otro lado, en el mecanismo extrínseco, las células inflamatorias y fibroblastos procedentes de un lugar distinto al tendón, como la vaina tendinosa, migran hasta el lugar de la lesión para cumplir su función (Sharma & Maffulli, 2006). En la regeneración de un tendón lesionado contribuyen ambos mecanismos, y existe discrepancia en

relación al predominio de un mecanismo u otro, o si un mecanismo aislado puede conducir a la reparación tendinosa. Generalmente, el mecanismo intrínseco se asocia con un mejor resultado biomecánico mientras que la curación extrínseca provoca la formación de adherencias a los tejidos circundantes, y se trata más bien de un proceso cicatricial (Buschmann & Meier Bürgisser, 2017a).

#### **1.4.5. Reciclaje del colágeno**

A diferencia de las clásicas fases del proceso de reparación biológica del tendón mediante la digestión y síntesis de novo del colágeno, recientes investigaciones han sugerido la existencia de un proceso de reciclaje del colágeno en el mecanismo de regeneración intrínseca del tendón (Ingraham, Weber, & Childs, 2011).

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión llevados a cabo en secciones transversales de tendones de Aquiles de ratas a los 10 días después de ser seccionados y suturados mostraron diámetros menores de las fibras de colágeno en el tendón reparado respecto al sano (Ehrlich, Lambert, Siggers, Myers, & Hauck, 2005). Estos resultados sugieren que podría existir un proceso de reciclaje de las fibras de colágeno para aumentar la resistencia a la tracción temprana mediante la reconexión de las fibras de colágeno entre ambos cabos del lugar de la reparación gracias a segmentos y unidades moleculares básicas de colágeno liberados en los extremos dañados.

Este proceso de reciclaje del colágeno en la reparación tendinosa es necesario desde el punto de vista celular, siendo una vía más rápida que la síntesis de *novo*. No obstante, podría causar una debilidad temporal del tendón a medida que se proporciona y remodela colágeno en las áreas adyacentes al proceso de reparación biológica. Además, esto podría explicar la ruptura postoperatoria que se puede observar en los tendones flexores de la mano contigua al lugar de la reparación tras la cirugía (Müller, Todorov, Heisterbach, Martin, & Majewski, 2015).

#### 1.4.6. Regulación génica de la regeneración tendinosa

Los genes implicados en el desarrollo y maduración de las células tendinosas son muy importantes. El factor de transcripción Scleraxis se expresa específicamente en las poblaciones celulares precursoras de los tenocitos y regula la expresión génica para la síntesis de moléculas de la matriz extracelular por los fibroblastos del tendón. Por otro lado, los genes que codifican para Tenomodulina se expresan en la proliferación tardía y diferenciación de los tenocitos. Por tanto, la expresión génica de Scleraxis y Tenomodulina son considerados indicadores del proceso de formación de tejido tendinoso (Shukunami, Takimoto, Oro, & Hiraki, 2006).

Además, la regulación génica para la expresión de la glicoproteína Tenascina-C está implicada en el desarrollo tendinoso tanto a nivel embrionario como a nivel adulto (Aslan, Kimelman-Bleich, Pelled, & Gazit, 2008). Existe un marcador de la diferenciación de las células madre mesenquimales en poblaciones precursoras tendinosas denominado Smad8 (*mothers against decapentaplegic homolog 8*). Se ha demostrado que la manipulación específica de los mecanismos de señalización de Smad8, es capaz de diferenciar células madre mesenquimales en tenocitos (Hoffmann, 2006).

Etapa	Actividad
<i>Scleraxis</i>	Marcador precoz expresado en las poblaciones precursoras del tejido tendinoso.
<i>Tenomodulina</i>	Marcador tardío de la diferenciación y proliferación de los tenocitos.
<i>Tenascina-C</i>	Glicoproteína de la matriz extracelular presente en el tendón diferenciado y embrionario.
<i>Smad8</i>	Molécula de señalización intracelular en las células madre mesenquimales.

**Tabla 1:** Genes específicos del desarrollo tendinoso (adaptado de Hogan et al., 2011).

#### **1.4.7. Mecanismos moleculares de la regeneración tendinosa**

Durante el proceso de curación tendinosa, distintos factores de crecimiento están implicados en la activación y regulación de la respuesta celular. Estos factores o citoquinas se unen a receptores específicos que se encuentran en la superficie celular activando secuencias de señalización dentro de la célula. Esto inicia una cascada de secuencias metabólicas que conducen a la transcripción de genes reguladores específicos. La liberación de estos factores se estimula mediante células que se encuentran en el lugar de la lesión y, durante la fase de remodelación, por la carga mecánica del tendón lesionado (Tabla 2) (James, Kesturu, Balian, & Chhabra, 2008).

El Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (*Transforming Growth Factor*, TGF- $\beta$ ) es sintetizado por la mayoría de las células que están implicadas en los mecanismos de regeneración tisular. Sus tres isoformas dan lugar a distintas respuestas de regulación de la función celular. Durante la fase inflamatoria inicial tras la lesión, aumenta la expresión de TGF- $\beta$  promoviendo la migración y proliferación celular, así como la síntesis de los colágenos del tipo I y tipo III (Kashiwagi et al., 2004). Una de las isoformas de este factor de crecimiento, TGF- $\beta$ 1, es responsable de la formación del tejido de granulación inicial que es esencial para establecer la continuidad tisular en el lugar de la lesión y, por tanto, favorecer la regeneración tisular (Klein, Yalamanchi, Pham, Longaker, & Chan, 2002).

Durante el proceso de reparación inicial, citoquinas como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*Insulin-like growth factor*, IGF-1) estimulan la migración y proliferación de fibroblastos y células inflamatorias al lugar de la lesión. El IGF-1 puede ser almacenado en la matriz extracelular del tendón normal como proteína precursora inactiva y, cuando se produce la lesión, distintas metaloproteinasas pueden liberarlo para ejercer su función biológica (Kurtz, Loebig, Anderson, DeMeo, & Campbell, 1999). Durante las fases tardías de la regeneración, el IGF-1 ejerce un rol crucial al estimular la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (Abrahamsson & Lohmander, 1996). Distintos estudios *in vitro* han demostrado que estos efectos sobre

el metabolismo de la matriz extracelular son dosis dependientes (Abrahamsson, Lundborg, & Lohmander, 1991).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet derived growth factor*, PDGF) regula la expresión de otros factores de crecimiento, como el IGF-1 durante la fase de reparación inicial. Además, el tratamiento con PDGF en modelos de lesión animal incrementa la proliferación celular y la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular durante la fase de remodelación (X. T. Wang, Liu, & Tang, 2004).

Por otro lado, estudios inmunológicos han demostrado la expresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) en los fibroblastos y células inflamatorias. Este factor de crecimiento es fundamental en el estímulo de los procesos de angiogénesis y proliferación celular (Chang et al., 1998).

El factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) es crucial para la neovascularización, la cual resulta esencial para establecer y mantener la vascularización presente en el endotenon y epitenon (Petersen et al., 2003). También, se ha demostrado que la liberación de proteínas morfogenéticas óseas (*bone morphogenetic protein*, BMP) regula la síntesis de componentes de la matriz extracelular y la expresión de colágeno del tipo I y del tipo III (Forslund, 2002).

### Acontecimientos durante la regeneración tendinosa

Etapa	Actividad	Factor de crecimiento
<i>Inflamatoria</i>	Reclutamiento de fibroblastos y células inflamatorias al lugar de la lesión. Regulación de la migración celular. Expresión de otros factores de crecimiento. Angiogénesis	IGF-1 TGF- $\beta$ PDGF VEGF, bFGF
<i>Proliferativa</i>	Proliferación celular (síntesis ADN) Síntesis de colágeno y componentes de MEC. Promueve la interacción entre células y matriz. Síntesis de Colágeno tipo III.	IGF-1 y PDGF, TGF- $\beta$ , bFGF, BMP-5, -6 y -7 IGF-1 y PDGF, bFGF TGF- $\beta$ , bFGF TGF- $\beta$ , BMP-5, -6 y -7
<i>Remodelación</i>	Remodelación de la matriz extracelular. Interrupción de la proliferación celular. Síntesis de Colágeno tipo I.	IGF-1 TGF- $\beta$ TGF- $\beta$ , BMP-5, -6 y -7

**Tabla 2:** Papel de los distintos factores de crecimiento durante los acontecimientos de la reparación biológica tendinosa (adaptado de James et al., 2008).

#### 1.4.8. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas presentes en la matriz extracelular (*matrix metalloproteinases*, MMPs) es una familia de enzimas implicadas en la degradación y remodelación de los componentes de la matriz extracelular durante el proceso de regeneración tisular tras una lesión tendinosa (Bedi et al., 2010). La función de las MMPs durante los procesos de regeneración tisular es regulada por los denominados inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) (Magra, 2005).

Gracias a los estudios realizados en modelos animales, se ha demostrado una respuesta bifásica de las metaloproteinasas durante la regeneración tendinosa. La expresión temprana de MMP-9 está asociada con la respuesta inflamatoria y el colágeno

dañador en la zona de la lesión. La expresión tardía de MMP-2 y MMP-14 ocurre durante la fase de remodelación tendinosa (Loiselle et al., 2009).

Además, se encuentra en estudio si la incorporación local de MMPs puede inhibir la degradación del colágeno y controlar los cambios histológicos que ocurren tras una reparación tendinosa (Bedi et al., 2010). Aun así, a pesar de que se han identificados varias MMPs y TIMPs, su papel en la reparación tendinosa no está del todo definido, pero parece ser que la relación entre estos componentes parece ser fundamental en la homeostasis del tendón (Tabla 3) (Hogan et al., 2011).

Gen	Función
MMP (-1, -2, -3, -9, -11, -13)	Degradación de la matriz extracelular durante el desarrollo y la reparación tendinosa.
TIMP (-1, -2, -3, -4)	Inhibición reversible de las metaloproteinasas.

**Tabla 3:** Genes implicados en la remodelación de la matriz extracelular (adaptado de Hogan et al., 2011).

### 1.4.9. Citoquinas

Las citoquinas son moléculas que tienen la capacidad de regular la actividad biológica en los diferentes estados de un tejido, como es el caso de la regeneración tisular o la modulación de la respuesta inmunológica (Müller et al., 2015).

Estas moléculas han sido estudiadas en el tendón y, se ha demostrado la expresión de citoquinas inflamatorias, como factor de necrosis tumoral alfa (*tumoral necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) e interleuquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 e IL-10 en los tenocitos humanos sanos y lesionados (Ackermann, Domeij-Arverud, Leclerc, Amoudrouz, & Nader, 2013) Además, algunas de estas citoquinas están implicadas en la propia regulación de los tenocitos. Un ejemplo es la IL-6, la cual promueve un incremento de la proliferación de los tenocitos (Thomopoulos, Parks, Rifkin, & Derwin, 2015). La expresión de las citoquinas se puede ver afectada por estímulos externos o factores

mecánicos como el ejercicio, lo que tiene implicación directa en el proceso de reparación biológica. Por lo tanto, las citoquinas tienen una utilidad potencial como herramientas en el diagnóstico o tratamiento de lesiones tendinosas (Vinhas, Rodrigues, & Gomes, 2018)

Citoquinas	Función en la homeostasis	Función en la inflamación	Patogénesis
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Regulación de la temperatura y sueño. Modulación del metabolismo celular.	Estimulación de la producción de metaloproteinasas. Síntesis de citoquinas proinflamatorias.	Trastornos inflamatorios agudos y crónicos.
<i>TNF<math>\alpha</math></i>		Favorece la degradación de la matriz extracelular. Induce a citoquinas inflamatorias. Supresión de colágeno tipo I. Incremento de la elasticidad.	Participa en la degeneración del tendón.
<i>IL-6</i>	Mantiene la homeostasis metabólica.	Incrementa la síntesis de colágeno. Amplifica la respuesta inflamatoria. Inducción de VEGF e IL-10.	Induce la respuesta de fase aguda.
<i>IL-4</i>	Se asocia a la homeostasis de la matriz extracelular.	Modula y suprime a citoquinas proinflamatorias. Inhibe la secreción de metaloproteinasas. Reduce la fuerza del tendón.	
<i>IL-10</i>		Inhibe la síntesis de citoquinas inflamatorias. Síntesis de colágeno tipo II y agrecano. Induce la proliferación y supervivencia de los tenocitos.	



IL-17A	Promueve la degeneración tisular. Induce la producción de citoquinas y la síntesis de óxido nítrico en los tenocitos.	Respuesta inflamatoria temprana. Media la inflamación y remodelación tisular.
--------	---	---

**Tabla 4:** *Citoquinas implicadas en la homeostasis, inflamación o patogénesis de las lesiones tendinosas (adaptado de Vinhas et al., 2018).*

#### **1.4.10. Regulación mecánica**

El paradigma de que un estrés a nivel celular impulsa la remodelación del tejido es un principio central de la mecanorregulación en el hueso, en el tendón y en otros tejidos. Las células tendinosas disponen de varios mecanismos celulares para detectar un rango de distintos estímulos mecánicos en su matriz. Una célula puede responder rápidamente a la tensión o al cizallamiento adaptándose al cambio en la matriz o remodelando su citoesqueleto. Estos ajustes no solo afectan a los elementos mecanosensibles de la célula sino también afecta a las proteínas de la membrana celular y del núcleo que se encuentran mecánicamente emparejados (N. Wang, Tytell, & Ingber, 2009).

A largo plazo, las células hacen frente a los cambios mecánicos coordinando la estructura y composición de la matriz extracelular hasta que su entorno mecánico alcanza la homeostasis. En un tejido conectivo como el tendón esto se consigue de forma primaria modulando la composición fibrilar y la estructura de las redes de colágeno. En el tejido tendinoso existen cuatro mecanismos por el que las células tendinosas pueden potencialmente transducir fuerzas mecánicas en señales celulares: mediante estiramiento de canales de iones activados, mediante transducción mediada por adhesión local, mediante prolongaciones citoplasmáticas o mediante deformaciones en el núcleo (Lavagnino et al., 2015).

Los datos escasos acerca del proceso de regulación mecánica de la reparación tisular, deja abiertas muchas cuestiones acerca del papel de las fuerzas externas en los

resultados de una reparación tendinosa. Por un lado, regiones de un tejido dañado o debilitado puede crear un nicho celular que puede estimular mecánicamente a la célula tendinosa de un estado de quiescencia a un fenotipo activo y reparador (Smith et al., 2008). Por otro lado, un daño localizado puede inducir altas concentraciones de estrés y de fuerza que potencialmente sobrecargan los mecanismos anteriormente mencionados y generar una respuesta de remodelación adversa (Maeda et al., 2011).

Parece ser que cuando el tejido tendinoso recibe una carga mecánica por encima de un determinado umbral, se desencadena una respuesta funcional del tejido. Los resultados de análisis histológicos han demostrado que una carga mecánica en un tejido intacto, provoca una síntesis anabólica de la matriz de colágeno y probablemente esto se deba al incremento del estrés mecánico en el tejido (Smith et al., 2008). Además, se ha observado que una carga mecánica aumenta la síntesis de colágeno tanto a nivel fascicular como tendinoso. Aunque esta síntesis de colágeno es generalmente contemplada como un signo positivo de regeneración, cómo se estructura esta formación de colágeno es muy importante: altamente alineado o aleatoriamente distribuido (Spiesz et al., 2015). De forma controvertida, existe evidencia que sugiere que tanto la sobrecarga como la subcarga de un tejido tendinoso pueden desencadenar una red de mecanismos catabólicos de la remodelación de la matriz extracelular (Lavagnino, Arnoczky, Egerbacher, Gardner, & Burns, 2006). En definitiva, la regulación mecánica de la reparación de un tejido es un proceso complejo, donde está implicados numerosos mecanismos celulares y donde las MMP parecen tener un papel fundamental (Snedeker & Foolen, 2017).

## **1.5. Patología del tendón**

### **1.5.1. *Tendinopatía***

El término tendinopatía define la condición clínica de dolor y cambios patológicos en el tendón debido al sobreuso. Los términos “tendinosis” (cambios degenerativos sin inflamación) y “tendinitis” (proceso inflamatorio) deberían ser utilizados sólo tras una confirmación histopatológica (Rees, Maffulli, & Cook, 2009).

Los cambios histopatológicos en la tendinopatía están ampliamente descritos. Macroscópicamente, el tendón normal es de un color blanco brillante y tiene una textura fibroelástica firme. En contraposición, el tendón tendinopático es de un color grisáceo o marrónáceo y su textura es blanda, delgada y frágil (Khan, Cook, Bonar, Harcourt, & Åstrom, 1999). Microscópicamente, las fibras de colágeno se encuentran desorganizadas con un incremento de la matriz extracelular y un aumento del número de células. Con microscopía electrónica de transmisión se ha observado que las fibras de colágeno son de diferente diámetro y orientación, y las células han presentado cambios compatibles con hipoxia, que incluye inclusiones lipídicas, lisosomas alargados y retículos endoplasmáticos degranulados. Es muy inusual encontrar cambios inflamatorios en el tendón tendinopático. Además, se puede observar una infiltración vascular de pequeños vasos sanguíneos junto a un descenso de la inervación. Por otro lado, existe un incremento del número de células, de apariencia más redondeada y con cambios de necrosis o cuerpos apoptóticos (Y. Xu & Murrell, 2008).

#### **1.5.1.1. Causas de la tendinopatía**

La carga repetida de la unidad músculotendinosa se contempla como fundamental para el desarrollo de la patología tendinosa por sobreuso, aunque el mecanismo exacto de producción es aún desconocido.

En la *teoría mecánica* la sobrecarga del tejido tendinoso es decisiva en el proceso patológico. Ésta puede incrementar la debilidad y el fallo eventual del tendón, el cual sería incapaz de responder adecuadamente a la sobrecarga a lo largo del tiempo. La carga repetida o prolongada desencadena alteraciones microscópicas en la matriz extracelular y en el funcionamiento de las células del tendón. Además, es posible que, durante ciclos de carga repetidos, un único ciclo anormal puede producir un estrés suficiente para inducir un daño fibrilar único pero acumulativo sin una historia clínica específica de “lesión” (Ker, 2002). Esta teoría mecánica explica cómo un daño crónico repetitivo puede acumularse a lo largo del tiempo. El aumento de incidencia de tendinopatía en individuos atléticamente activos está en consonancia con esta teoría

(Fredberg & Bolvig, 2002). Esta teoría puede cuestionarse basándose en el hecho de que, en muchos órganos, como los músculos y los huesos, un estrés fisiológico conduce a una respuesta contraria, que es la remodelación y fortalecimiento de dichas estructuras (Rees et al., 2009).

La *teoría vascular* de la tendinopatía sugiere que los tendones generalmente tienen una escasa vascularización y que ciertos tendones, como el tendón supraespinoso, el tendón de Aquiles y el tendón tibial posterior, son especialmente vulnerables a sufrir compromiso vascular en ciertas zonas. Si estos tendones o estas zonas son sometidos una sobrecarga funcional, se podría desencadenar el daño tendinoso. Las entesis fibrocartilaginosas son relativamente avasculares y esto podría contribuir a una respuesta regenerativa pobre (Åstroöm & Westlin, 1994). Sin embargo, esta teoría vascular continúa siendo controvertida ya que recientes estudios han demostrado un aporte vascular uniforme en todo el tendón de Aquiles (Wezenbeek, De Clercq, Mahieu, Willems, & Witvrouw, 2018). Una explicación alternativa es que quizás se produce una hipertermia localizada e inducida por el estrés que puede conducir a un detrimento de la supervivencia celular y de las propiedades de la matriz extracelular más que a un compromiso vascular (Birch, Wilson, & Goodship, 1997).

Existe un creciente interés en la *teoría nerviosa* de la tendinopatía donde existe un desequilibrio entre los neuropéptidos nociceptivos y los anti-nociceptivos. La degranulación de las células cebadas mediada por el sistema nervioso produce un aumento de la sustancia P o del glutamato (Gotoh, Hamada, Yamakawa, Inoue, & Fukuda, 1998). Estos mediadores proinflamatorios se han descrito en la tendinopatía del manguito rotador y del tendón de Aquiles (Alfredson & Lorentzon, 2002). Sin embargo, esta teoría no explica por qué tendones con cambios patológicos no son siempre dolorosos. De hecho, esta cuestión continúa sin respuesta actualmente (Rees et al., 2009).

### 1.5.1.2. Tratamiento de la tendinopatía

La prevención es mejor que el tratamiento: el adecuado entrenamiento y equipamiento reduciría la incidencia de tendinopatía. Sin embargo, cuando ésta ocurre, el punto de partida de su tratamiento debería comenzar por analizar por qué ha ocurrido e identificar los factores que lo han precipitado ya que, sin esto, siempre habrá un riesgo de recurrencia de la lesión (Rees, Wilson, & Wolman, 2006).

El pilar de tratamiento de estas lesiones continúa siendo el tratamiento conservador o no quirúrgico. En la fase aguda de dolor en el tendón, se deben modificar las causas biomecánicas que lo han desencadenado junto a medidas que reduzcan los síntomas, como la crioterapia. La crioterapia disminuye la inflamación en el lugar de la lesión y disminuye el flujo sanguíneo capilar, preservando la oxigenación del tendón y facilitando el retorno venoso (Rivenburgh, 1992).

El *ejercicio excéntrico* ha demostrado disminuir el dolor y puede conducir a normalizar la estructura del tendón. Sin embargo, es necesario un paciente motivado que sea capaz de realizar el programa dos veces al día durante 12 semanas. Sin embargo, no se ha aclarado por qué funciona este tratamiento y qué intensidad, velocidad, carga y frecuencia son los adecuados (Sayana & Maffulli, 2007).

La terapia por *ultrasonidos* y el *láser de baja* intensidad también se han utilizado para tratar el dolor en el tendón. La terapia por *ondas de choque* se ha mostrado especialmente beneficiosa en tendinopatías insercionales y calcificantes (Speed, 2001). Sin embargo, este tipo de terapia debería utilizarse cuando otros tratamientos más comunes hayan fracasado.

En cuanto a la intervención farmacológica, a pesar de la popularidad del uso de *antiinflamatorios no esteroideos* (AINE) existe muy poca evidencia que apoye su uso en esta patología (Forslund, Bylander, & Aspenberg, 2003). De hecho, la acción antiinflamatoria de estos fármacos puede interferir con la regeneración tendinosa y reducir la fuerza tensil del tendón. Por otro lado, el uso de inyecciones de

*corticoesteroides* es muy controvertido. Hay poca evidencia de buena calidad que apoye el uso tan extendido de estos fármacos que puede ser debido al alivio sintomatológico a corto plazo (Bisset et al., 2006). Sin embargo, debe tenerse en cuenta el riesgo de ruptura tendinosa y la falta de eficacia a largo plazo unido a una alta tasa de recurrencias.

A pesar de las ventajas del tratamiento conservador, las tendinopatías a veces son difíciles de tratar a largo plazo y hasta un 30% de las tendinopatías del tendón de Aquiles requerirán cirugía (Paavola, Kannus, Paakkala, Pasanen, & Järvinen, 2000). El momento de indicar el tratamiento quirúrgico debe ser individualizado en cada caso y sólo tras agotar de forma exhaustiva el tratamiento conservador. El objetivo de la cirugía es promover la reparación tendinosa siendo el objetivo biológico modificar la vascularización y estimular a las células viables remanentes para iniciar el proceso de reparación (Benazzo, Zanon, & Maffulli, 2000). Clásicamente, se realizaba la excisión de las adhesiones fibróticas, se retiraban nódulos degenerados y se realizaban múltiples incisiones longitudinales para detectar y retirar lesiones intratendinosas. Recientemente, la realización de múltiples tenotomías longitudinales podría ser exitoso produciendo una neoangiogenesis bien ordenada que mejoraría el aporte nutricional del tendón y lograría un ambiente favorable para la reparación tendinosa (Rees et al., 2009). Desafortunadamente, no existe evidencia actualmente para recomendar un tratamiento quirúrgico ideal frente a otro tipo de cirugía y los resultados clínicos tras la cirugía son impredecibles (Lohrer, David, & Nauck, 2016).

### **1.5.2. Ruptura tendinosa**

La ruptura tendinosa es una lesión aguda en el que los factores extrínsecos predominan, aunque los factores intrínsecos también son importantes (N. Maffulli et al., 2010).

### 1.5.2.1. Causas de la ruptura tendinosa

Se han propuesto dos teorías principales para explicar este tipo de lesión: la teoría degenerativa y la teoría mecánica.

En la *teoría degenerativa* se piensa que existen cambios degenerativos antes de la ruptura. Esta teoría se basa en los estudios histopatológicos, los cuales han confirmado la presencia de cambios degenerativos en muestras procedentes de rupturas tendinosas. La mayoría de estos cambios no tienen explicación etiológica y, es probable que estén relacionados con alteraciones en el flujo sanguíneo (hipoxia) o una alteración del metabolismo (L. Józsa & Kannus, 2007). Otra posible explicación es alternar periodos de ejercicio con periodos de inactividad. Además, se ha demostrado un aumento del colágeno del tipo III en ruptura tendinosas, lo que altera la arquitectura, composición química y biomecánica normal del tendón, explicando su menor resistencia a fuerzas de tensión (Waterston, Maffulli, & Ewen, 1997).

En la *teoría mecánica* se sostiene que, aunque se produzca un estrés fisiológico, el tendón puede ser dañado cuando el microtraumatismo se repite y se acumula superando la capacidad regenerativa del tendón. Un tendón sano podría romperse después de una fuerza muscular violenta, en presencia de ciertos condicionantes fisiológicos y anatómicos que incluyen un sinergismo inadecuado de músculos agonistas-antagonistas o una discrepancia en el cociente de espesor músculo-tendón (Freedman, Gordon, & Soslowsky, 2014). Además, se ha sugerido que un mal funcionamiento del mecanismo inhibitorio que previene de una excesiva o descoordinada contracción muscular podría causar una ruptura tendinosa. Esto explicaría esta lesión en un atleta que vuelve a entrenar tras un periodo de inactividad.

Los corticoesteroides y las fluoroquinolonas se han relacionado también con la ruptura tendinosa. Ambos fármacos causan displasia en las fibrillas de colágeno, disminuyendo la fuerza tensil del tendón (N. Maffulli et al., 2010). La evidencia actual recomienda evitar el uso prolongado de corticoides por vía oral o su administración peritendinosa repetida. Su efecto analgésico puede enmascarar los síntomas de un

tendón dañado y los individuos pueden mantener su nivel de actividad incluso con afectación tendinosa. Además, los corticoides interfieren en la reparación tendinosa por inducir necrosis tisular. Por otro lado, las fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino, se han relacionada con una disrupción de la matriz extracelular y una disminución en el contenido de colágeno, además de un efecto deletéreo en los tenocitos (Bernard-Beaubois, Hecquet, Hayem, Rat, & Adolphe, 1998).

### **1.5.2.2. Tratamiento de la ruptura tendinosa**

Los tratamientos de este tipo de lesiones difieren dependiendo del tipo de tendón lesionado, de las características de la lesión y de la región anatómica (Weise, 2014).

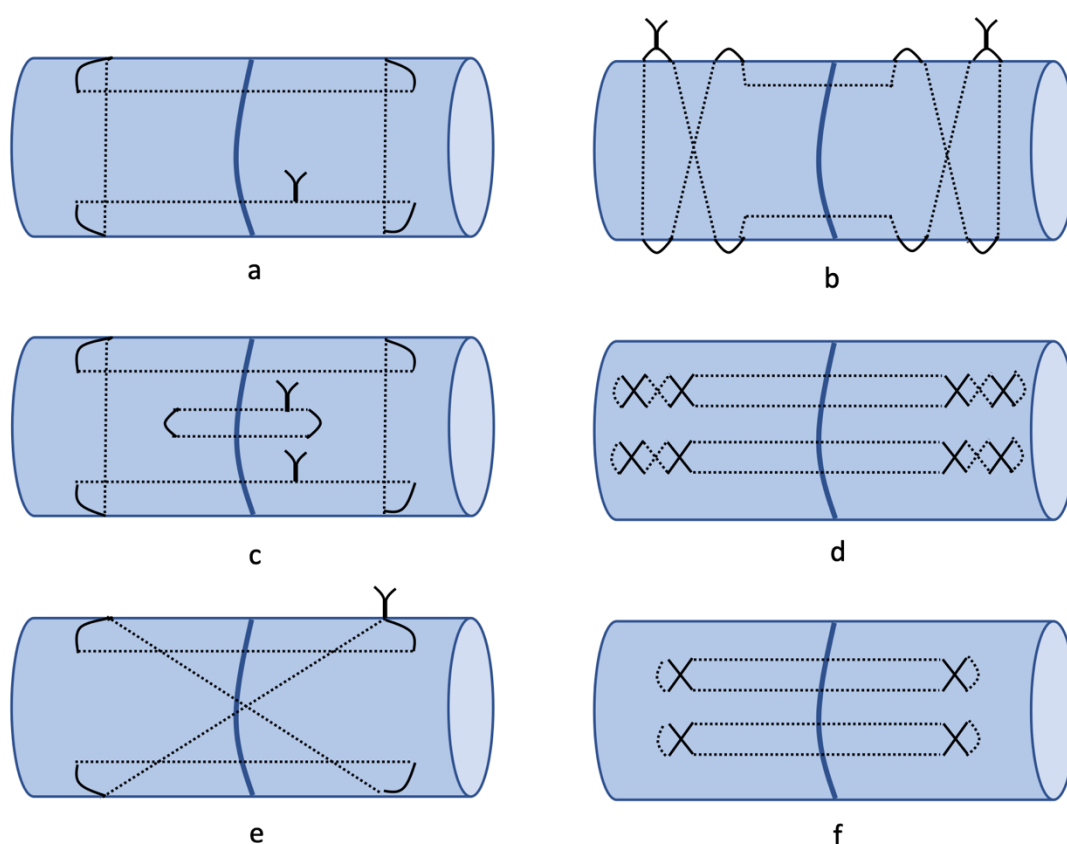
En cuanto a las lesiones presentes en el miembro superior, las roturas del manguito rotador, en pacientes ancianos o con cambios degenerativos avanzados, se lleva a cabo un tratamiento conservador. En la rotura traumática y aguda del manguito rotador se indica un tratamiento quirúrgico al igual que en una rotura del bíceps distal mediante reinserción tendinosa. En el caso de una rotura del bíceps braquial proximal, el tratamiento quirúrgico solo ha demostrado una superioridad leve respecto al tratamiento conservador. Las heridas que impliquen una sección tendinosa en muñeca, mano o dedos también se reparan quirúrgicamente (Weise, 2014).

En cuanto a las lesiones presentes en los miembros inferiores, una ruptura en el aparato extensor se trata de manera conservadora en un número muy reducido de casos como son las infrecuentes rupturas parciales. Las rupturas del tendón de Aquiles se pueden tratar de forma conservadora cuando exista un gap tendinoso mínimo o el lugar de la lesión se encuentre cerca de la inserción ósea. Normalmente, las rupturas del tendón cuadricepsital y rotuliano se tratan de manera quirúrgica. Asimismo, se recomienda la reconstrucción quirúrgica del tendón de Aquiles en individuos activos o donde haya una marca diástasis de la lesión. Por último, en las rupturas agudas de los tendones de la articulación del tobillo y del pie se recomienda realizar un tratamiento quirúrgico (Weise, 2014).



### 1.5.2.3. Técnicas de sutura en la reparación tendinosa

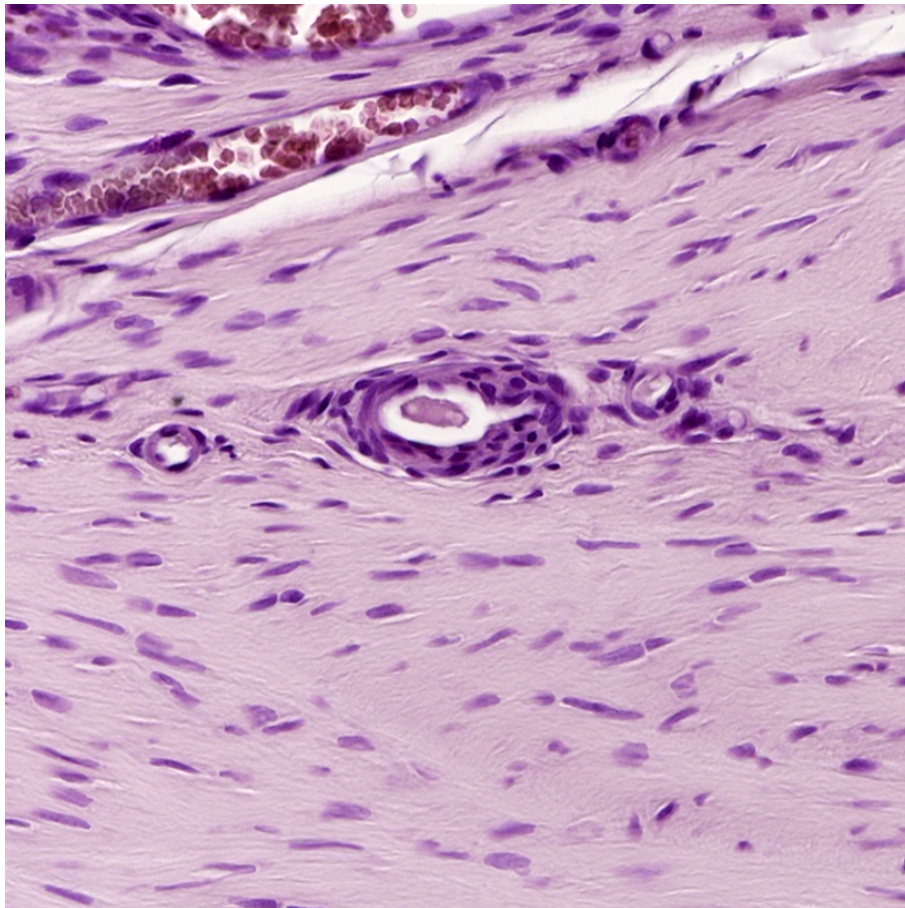
Hay numerosos factores que han demostrado afectar los resultados de una reparación tendinosa. La fuerza que es capaz de resistir la reparación es el factor más importante debido a que la principal función del tendón es transmitir la fuerza, por lo tanto, una reparación tendinosa debe ser capaz de soportar las altas fuerzas a las que es sometida en la movilización activa precoz. Esto ha provocado que se hayan descrito numerosas técnicas de sutura, que intentan mejorar la resistencia de la reparación, cada una intentando incorporar las características de las técnicas más exitosas (Figura 9).



**Figura 9:** Ejemplos de técnicas de sutura. (a) Kessler Modificado, (b) Bunnell, (c) Indiana, (d) Becker modificado, (e) Cruzado, (f) Savage. (Adaptado de Sue & Chang, 2019).

Otro factor a tener en cuenta es prevenir la separación entre los extremos del tendón. Un espacio superior a 3 mm ha demostrado, en modelos *in vivo*, un aumento de la tasa de re-ruptura y una amplitud de movimiento alterada (Gelberman, Boyer, Brodt, Winters, & Silva, 1999).

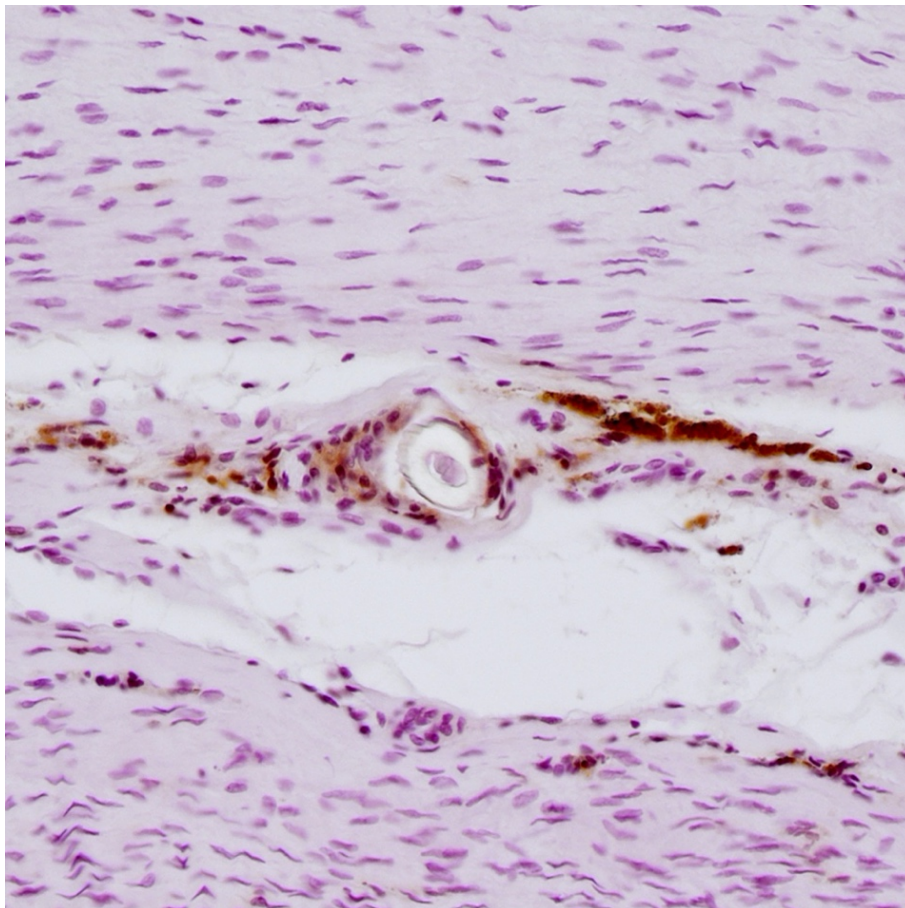
El aumento del número de sutura y de los puntos de anclaje mejora de forma significativa la fuerza y la resistencia de la reparación (Dogramaci et al., 2008). Esto ha conducido a incrementar el número de hileras en las suturas del manguito rotador, por ejemplo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto conlleva un aumento del tiempo quirúrgico y la alteración tisular que provoca la sutura, que dependiendo del material puede inducir una respuesta inflamatoria (Figura 10).



**Figura 10:** Corte histológico de un tendón de rata teñido con la técnica de hematoxilina y eosina. Se pueden observar la presencia del hilo del material de sutura rodeado de una respuesta inflamatoria. Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

Otro factor que influye en la reparación tendinosa es la localización del nudo de la sutura. La localización externa del nudo implica una mayor resistencia al deslizamiento mientras que la localización entre los extremos reparados debería evitarse debido a la disminución de la superficie de contacto del tendón, afectando al proceso de reparación biológica. La localización interna de la sutura también afecta al tejido tendinoso (Angeles, Heminger, & Mass, 2002).

Se ha demostrado que la técnica de la sutura tendinosa implica una muerte celular directamente. En el modelo animal, se observó la formación de una zona acelular alrededor de la sutura, que está presente desde las 72 horas hasta al menos un año tras la reparación (Figura 11) (Wong, Cerovac, Ferguson, & Mcgrouther, 2006). Además, también se ha observado un aumento de la inflamación en los lugares donde se localiza la sutura que puede ser más intensa según el método de sutura elegido (Rawson, Cartmell, & Wong, 2019).



**Figura 11:** Corte histológico de un tendón de rata teñido con la técnica de inmunohistoquímica para CD45. Se pueden observar la presencia del hilo del material de sutura rodeado de algunos elementos linfoides. Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

### **1.5.3. Patología tumoral**

Las lesiones tumorales o pseudotumorales que pueden afectar al tendón son muy infrecuentes. De hecho, las lesiones metastásicas que asientan en este tejido son muy raras y se han descrito muy pocas a lo largo de los años. Por tanto, los tumores malignos o metastásicos del tendón son muy raros, mientras que los tumores benignos o pseudotumores son más frecuentes (L. Józsa & Renner, 1991). Si bien estas lesiones son afortunadamente infrecuentes, la escisión quirúrgica de una masa tumoral localizada en un tendón o en sus estructuras vecinas lleva consigo la creación de un defecto estructural, es cual deberá ser reparado siguiendo las técnicas descritas anteriormente, cuyos resultados serán insatisfactorios mientras más extenso sea el defecto. A continuación, se revisan las neoplasias más relevantes que pueden afectar a los tendones.

#### **1.5.3.1. Fibroma de la vaina tendinosa**

Se define como una neoplasia benigna nodular y fibroblástica que se encuentra adherida a la vaina del tendón. Es una lesión infrecuente que típicamente se localiza en los tendones de los dedos de la mano. Aunque se han descrito localizaciones intra-articulares, éstas son muy raras.

Clínicamente, se presentan como un nódulo firme, pequeño (normalmente menor a 3 cm) y de crecimiento lento. Histológicamente, es una lesión bien circunscrita, lobulada y que contiene una baja cantidad de células fibroblásticas o miofibroblásticas en un fondo colagenoso. Normalmente no existe atipia aunque se pueden observar cambios degenerativos como metaplasia ósea o condroide o células pleomórficas (Sciot & Dal Cin, 2013).

### **1.5.3.2. Tumor tenosinovial de células gigantes**

El término “tumor de células gigantes de la vaina tendinosa” engloba una familia de lesiones que se asientan más a menudo en la sinovial de las articulaciones, las bursas y las vainas tendinosas. Estos tumores se pueden clasificar en dos subtipos principales según su localización (intra o extraarticulares) o su patrón de crecimiento (localizado o difuso) que difieren en su presentación clínica, pero comparten la patogénesis.

El tumor tenosinovial de células gigantes de tipo localizado es una neoplasia benigna compuesta por células mononucleares de tipo sinovial, acompañadas de células multinucleadas de tipo osteoclasto, células espumosas, hemosiderófagos y células inflamatorias. Este tumor se localiza predominantemente en la mano y, aproximadamente el 85% ocurren en los dedos, en proximidad de la vaina tendinosa de la articulación interfalángica. Es raro que estas lesiones impliquen el hueso o la piel (de Saint Aubain Somerhausen & van de Rijn, 2013b).

El tumor tenosinovial de células gigantes de tipo difuso es una neoplasia localmente agresiva compuesta también de células mononucleares de tipo sinovial, mezcladas con células gigantes multinucleadas, hemosiderófagos, células espumosas y células inflamatorias. El infrecuente tumor maligno de células gigantes se define por la coexistencia de un tumor benigno de células gigantes con áreas manifiestas de malignidad o por la recurrencia típica del sarcoma. La forma extraarticular es muy infrecuente y se suele localizar en los tejidos blandos periarticulares (de Saint Aubain Somerhausen & van de Rijn, 2013a).

### **1.5.3.3. Sarcoma de células claras**

Es una neoplasia maligna que típicamente envuelve a tejidos profundos de las extremidades, en proximidad a tendones y estructuras aponeuróticas. Sus características distintivas son el patrón de crecimiento anidado, la consistente diferenciación melanocítica y recurrente fusión génica EWSR1-ATF1.

La gran mayoría de estos tumores ocurren en las extremidades y alrededor del 40% ocurren en la región del pie o tobillo. Es un tumor profundo asociado íntimamente al tendón o la aponeurosis, de crecimiento muy lento, estando presente desde varias semanas o incluso años. La afectación de nódulos linfoides es frecuente.

Es un tumor que histológicamente, presente un crecimiento característico anidado donde bandas de colágeno divide al tumor en compartimentos distintos. Predominantemente tiene una morfología epitelioides pero también puede presentar áreas en haces. A pesar de su nombre, la mayoría de células muestran un patrón pálido eosinófilo o anfífilo y sólo una minoría de células son neoplásicas. A menudo, pueden estar presentes células gigantes multinucleadas dispersas como una corona (Antonescu, 2013).

#### **1.5.3.4. Sarcoma sinovial**

También es conocido como sarcoma tenosinovial y es un tumor mesenquimal que muestra un grado variable de diferenciación epitelial y tienen una translocación específica  $t(X;18)(p11;q11)$ .

La mayoría de estos tumores, alrededor del 70%, se asientan en tejidos blandos profundos de las extremidades, en una localización yuxta-articular. Se tratan usualmente de una masa, a menudo dolorosa, de crecimiento lento y circunscrito, lo que puede confundirla con un tumor benigno.

Histológicamente, pueden ser bifásicos o monofásicos. En el sarcoma sinovial bifásico, los componentes epiteliales y en husos se encuentran presentes en proporción variable. Las células epiteliales se organizan en nidos o cordones sólidos o en glándulas con una arquitectura tubular, alveolar o papilar. Las células en huso se encuentran siempre presentes, pero de manera escasa. Sin embargo, estas células son las predominantes en el sarcoma sinovial monofásico, que se organizan en láminas celulares densas o en fascículos difusos. Por otro lado, en ambos tipos, se encuentran

áreas pobremente diferenciadas con zonas hiper celulares y con atipia (Suurmeijer, de Bruijn, Geurts van Kessel, & Miettinen, 2013).

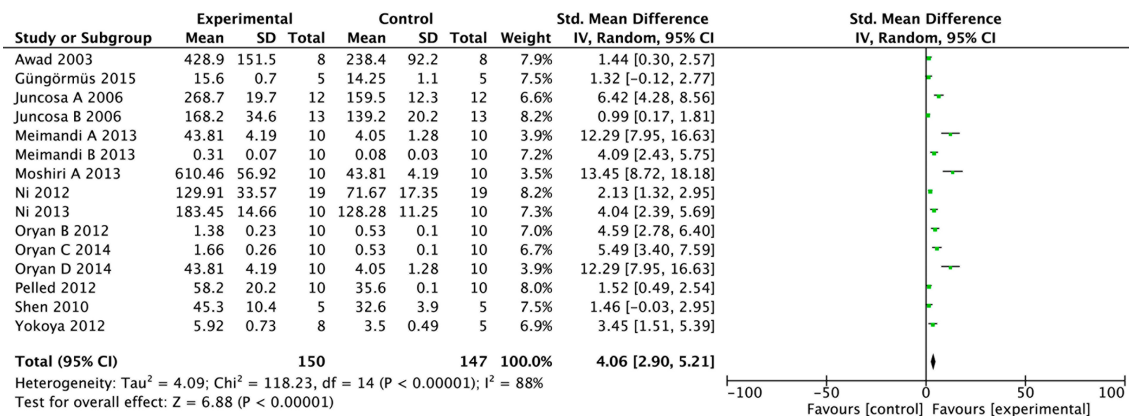
## **1.6. Ingeniería Tisular del tendón**

La Ingeniería Tisular ha emergido como una alternativa prometedora en medicina regenerativa, incluyendo la reparación tendinosa. La Ingeniería Tisular es una ciencia multidisciplinar que, mediante la combinación racional de células, biomateriales y factores de crecimiento permite la biofabricación de sustitutos funcionales para reparar, reemplazar o incluso incrementar la función de tejidos u órganos dañados (A. Campos, 2004).

Un sustituto ideal para el tejido tendinoso debería ser biodegradable, biocompatible y biomecánicamente estable para soportar una fuerza tensil durante la actividad y regeneración favoreciendo la recuperación funcional. Además, desde el punto de vista biológico, la combinación del biomaterial con el tejido nativo debe promover la regeneración tisular y evitar las adhesiones, reacciones inflamatorias, deformación anatómica, toxicidad local y/o rechazo. Si bien no existe un sustituto ideal, muchos modelos de ingeniería tisular propuestos han supuesto una mejora considerable en comparación con los métodos actuales. Se han utilizado diversos modelos animales, biomateriales y fuentes celulares con resultados variables y algunos prometedores (Figura 12) (Buschmann, 2018; González-Quevedo, Martínez-Medina, Campos, Campos, & Carriel, 2018).

A continuación, se presentarán los aspectos más relevantes de la Ingeniería Tisular, como son las propiedades y aplicaciones de los diferentes biomateriales y fuentes celulares. Se prestará especial atención al hidrogel de fibrina-agarosa, cuya aplicación en la reparación tendinosa es el principal objetivo de estudio en el presente proyecto de Tesis Doctoral.





**Figura 12:** Resultados de meta-análisis de los resultados biomecánicos del módulo de Young de diferentes estrategias de ingeniería tisular en terapia tendinosa frente a controles (González-Quevedo et al., 2018).

### 1.6.1. Biomateriales de origen natural

Las proteínas purificadas se utilizan para la generación de hidrogeles y matrices liofilizadas, las cuales se encuentran como polímeros o membranas de uso clínico. En general, la estructura tridimensional de estos biomateriales se puede controlar con técnicas de biofabricación. La solubilización y polimerización de estos polímeros permite la generación de matrices compuestas por fibras aleatoriamente organizadas. Con las técnicas de electrospinning, impresión tridimensional, crosslinking y nanoestructuración es posible regular los parámetros estructurales y biomecánicos de estos biomateriales de acuerdo a las necesidades (Carriel, Alaminos, Garzón, Campos, & Cornelissen, 2014; González-Quevedo et al., 2018).

La técnica de descelerización permite, a través de métodos químicos, físicos y biológicos, eliminar los elementos celulares y preservar la estructura y composición de la matriz extracelular, siendo excelentes biomateriales para diversas aplicaciones biomédicas (Carriel et al., 2013; Roosens et al., 2016).

Las ventajas del uso de biomateriales naturales, especialmente matrices descelerizadas, es su alta bioactividad y, a través de su estructura tridimensional casi



nativa, promueve la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular (Oliveira et al., 2013; Ramos, Peach, Mazzocca, Yu, & Kumbar, 2015).

En lo que respecta a la aplicación de estos biomateriales en la reparación del tendón, hay datos publicados del uso de submucosa del intestino delgado (*small intestinal submucosa*, SIS). Cuando se implanta este biomaterial, se induce una reparación tisular específica con un tendón histológicamente similar al tendón nativo. Sin embargo, el uso de este tipo de constructo se ha relacionado con la posibilidad de generar una reacción inflamatoria o de cuerpo extraño, probablemente por la presencia de un alto contenido de antígenos celulares (Murphy et al., 2008). En este sentido, algunos autores han centrado su trabajo en la decelularización tisular que, además de generar una matriz natural, reduce la inmunogenicidad de estos biomateriales, con una reducción de la respuesta inmune en los estudios realizados *in vivo* (Chato-Astrain et al., 2018).

De la misma manera, constructos híbridos basados en ácido hialurónico con quitosano se han utilizado en la reparación tendinosa demostrando una mejor producción de colágeno tipo I (Majima et al., 2007).

### **1.6.2. Biomateriales de origen sintético**

El uso de polímeros sintéticos ofrece una mayor versatilidad sobre los polímeros naturales, permitiendo que sus propiedades físicas y químicas se puedan ajustar a aplicaciones específicas (González-Quevedo et al., 2018). Sin embargo, la bioactividad de los constructos sintéticos es inferior a los biomateriales naturales. Para intentar solucionar este problema se han desarrollado varios métodos, como el tratamiento de superficie, con el objetivo de unir grupos funcionales a polímeros sintéticos a través de la biofuncionalización (Carriel et al., 2013; Ramos et al., 2015).

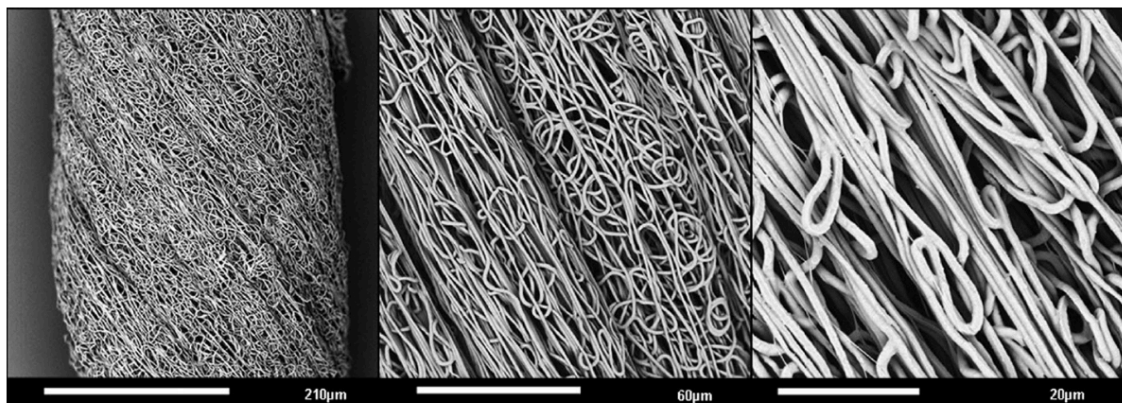
Un ejemplo de constructos sintéticos es aquél basado en el ácido poliglicólico que dan lugar a biomateriales de propiedades mecánicas y estructurales estables que permiten la migración de células tendinosas, especialmente en aquellos biomateriales

sometidos a crosslinking químico (L. Xu et al., 2010). Otro ejemplo es la familia de biopolímeros a la que pertenecen los polihidroxicanoatos que presentan unas propiedades biomecánicas adaptables con biodegradabilidad aceptable (Webb et al., 2013).

### 1.6.3. Biomateriales nanosintéticos

Un biomaterial ideal debe tener una porosidad adecuada para mantener un intercambio de nutrientes adecuado permitiendo la infiltración celular. En la Ingeniería Tisular en terapia tendinosa, un constructo nanosintético puede asemejarse a las fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular nativa y, también, proporcionar tanto una adecuada porosidad como unas propiedades mecánicas adecuadas (Ramos et al., 2015).

Un ejemplo de esta estrategia, es la utilización de una membrana de fibras de PLGA (*poly-lactide-co-glycolide*) con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) diseñada mediante electrospinning. De esta forma, es posible crear una estructura tridimensional de fibras de tamaño uniforme. En el modelo animal utilizado de reparación de manguito rotador, se produjo una mejoría significativa de la organización de las fibras de colágeno respecto al grupo control (Figura 13) (J. Zhao et al., 2014).



**Figura 13:** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran la superficie y la estructura de nanofibras (Mo, Wu, Sun, & El-Hamshary, 2017).

#### **1.6.4. Fuentes celulares en Ingeniería Tisular**

El hecho de añadir células a un biomaterial antes de su implantación es una estrategia básica en Ingeniería Tisular. Específicamente no se conoce si las células juegan un papel fundamental en regenerar el tejido o más bien realizan un papel secundario participando en el reclutamiento celular (Ramos et al., 2015). En cada modelo experimental el rol de las células difiere considerablemente.

La utilización de células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSCs) derivadas del tejido adiposo o de la médula ósea son una fuente celular frecuentemente utilizadas en la Ingeniería Tisular del sistema musculoesquelético. Estas células poseen la capacidad de diferenciación hacia las estirpes mesenquimales y su facilidad para crecer en cultivo. Cuando estas células se utilizan en la reparación tendinosa, resultaron en una mejora del proceso de regeneración tisular a corto plazo. Sin embargo, estos mismos estudios sugieren que no existen diferencias a largo plazo en comparación con el uso de tenocitos (Pietschmann et al., 2013), lo que podría explicarse por la alta capacidad de regeneración de los animales utilizados (H. Shen et al., 2016).

La utilización de células madre derivadas del tendón poseen una mayor expresión de tenomodulina, scleraxis, colágeno tipo I y decorina que las células madre mesenquimales, sugiriendo que podrían ser eficientes en la reparación tendinosa. Sin embargo, en los estudios realizados, no se observó una recuperación satisfactoria de las propiedades biomecánicas del tendón nativo (Ni et al., 2013). Por otro lado, la utilización de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo promueven la neoangiogénesis, la proliferación celular y la remodelación de la matriz extracelular, enriqueciendo el microambiente durante la regeneración tisular (H. Shen et al., 2016).

#### **1.6.5. Factores de crecimiento y señalización**

Los factores de crecimiento u otras moléculas de señalización actúan uniéndose a receptores de superficie desencadenando unas cascadas de señalización que regulan funciones celulares. Como hemos mencionado con anterioridad, se expresan distintos

factores de crecimiento durante el proceso de curación tendinosa, sugiriendo que estos factores juegan un papel fundamental en la regulación de la regeneración tendinosa (Ramos et al., 2015).

Estos factores se pueden utilizar en la reparación tendinosa mediante aplicación directa, utilizando suturas impregnadas en factores de crecimiento o mediante su liberación controlada a través de constructos (Nixon, Watts, & Schnabel, 2012). Se ha demostrado que el uso de factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) tiene un efecto beneficioso en la reparación tendinosa regulando la migración celular, promoviendo la angiogénesis e inhibiendo la actividad inflamatoria (Oryan & Moshiri, 2014). Otro ejemplo es el uso de factor de crecimiento de tejido conectivo (*connective tissue growth factor*, CTGF) que es altamente expresado en las fases iniciales de la reparación tendinosa y puede ayudar a promoverla (P. P. Y. Lui, Wong, & Lee, 2016). Además, se ha utilizado con éxito el factor derivado de células del estroma 1-alfa (*stromal cell-derived factor-1 alpha*, SDF-1 $\alpha$ ) que es una citoquina que regula el reclutamiento de células inflamatorias y podría mejorar las características estructurales y biomecánicas de los tendones reparados (W. Shen et al., 2010).

### **1.7. Hidrogeles en Ingeniería Tisular**

En esta Tesis Doctoral se ha evaluado la eficacia terapéutica de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa, generados en laboratorio de forma controlada, en un modelo de daño y reparación tendinosa. En este sentido, conocer las propiedades básicas de este tipo de biomateriales es una parte fundamental del presente proyecto.

Un hidrogel es una clase específica de biomaterial, generalmente polimérico, con propiedades similares a un gel. Suelen estar compuestos por una trama fibrilar o polimérica la cual gracias a sus propiedades físico-químicas retiene las moléculas de agua (F. Campos et al., 2016). Los hidrogeles son, por tanto, biomateriales hidrosolubles que mantienen una estructura tridimensional (Omidian & Park, 2010). Debido a su alto contenido en agua (sobre el 65%), los hidrogeles aportan un microambiente idóneo para el funcionamiento celular, ya que favorecen la difusión de nutrientes y desechos.

Además, dependiendo de la naturaleza química del componente fibrilar o polimérico, suelen ser altamente biocompatibles, como es el caso de la fibrina, la agarosa, el colágeno, el quitosán y la gelatina (Sudhakar et al., 2015). Las propiedades estructurales de este tipo de biomateriales son fundamental para la viabilidad y función celular, ya que su grado de porosidad puede incrementar la migración y motilidad celular, pero hidrogeles muy densos y escasamente porosos pueden llegar a comprometer la función de las células en su interior (Carriel, Garzón, Campos, Cornelissen, & Alaminos, 2017). Estudios *in vivo* llevados a cabo con el mismo hidrogel, pero con diferentes propiedades estructurales y biomecánicas resulta en una respuesta del huésped diferente (Carriel et al., 2013; Carriel, Scionti, et al., 2017).

La cadena de polímeros que constituyen el hidrogel puede absorber agua del entorno y aumentar su tamaño, a menudo, a varias veces el volumen inicial. Esta propiedad de aumentar o disminuir su volumen depende de la composición de monómeros y de las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas de éstos (X. Zhao, Hong, & Suo, 2008). Asimismo, esta propiedad del cambio de volumen puede responder a estímulos específicos como la temperatura, el pH o la presencia de un campo eléctrico.

Las propiedades de un determinado hidrogel pueden ser reguladas mediante el uso de agentes químicos o crosslinking. Estos agentes químicos crean enlaces entre las moléculas del biomaterial modificando su porosidad, biomecánica, propiedades de hidratación y propiedades biológicas como la biocompatibilidad. Por otro lado, la fricción del hidrogel puede regularse mediante el empleo de surfactantes. De esta forma, existen diversos mecanismos para modificar las propiedades de los hidrogeles de acuerdo a necesidades específicas (F. Campos et al., 2016, 2018; Rodríguez-Arco et al., 2016).

## 1.8. Fibrina y agarosa en Ingeniería Tisular

La *fibrina* es una proteína que se encuentra de forma natural en la sangre y que está implicada en la cascada de la coagulación. El último paso en esta secuencia de reacciones es la conversión de la proenzima fibrinógeno (factor I) en fibrina (factor Ia) y es inducido por la participación de la serina proteasa trombina (factor IIa). La malla de fibrina, en combinación con los trombocitos activados, es la base para la formación del coágulo sanguíneo. Durante este proceso, el factor XIIIa apoya el crosslinking de los monómeros de fibrinógeno y facilita la unión de la fibrina con la matriz extracelular que le rodea. Asimismo, la degradación de la fibrina es conocida como fibrinólisis y en condiciones fisiológicas está regulada por la participación de proteínas fibrinolíticas. La fibrina ha sido utilizada en Ingeniería Tisular por sus propiedades hemostáticas, adhesivas, como sellante o como transporte de fármacos o factores de crecimiento (Kerbl, Heher, Ferguson, & Redl, 2016).

La *agarosa* proviene de las algas rojas y es un polímero de polisacárido lineal que, junto a la agarpectina, forma el agar (polímero de subunidades de galactosa que se encuentra en la pared celular de esta especie). La agarosa es termorreversible y puede modificarse para fundirse o gelificarse a distintas temperaturas. Además, no tiene carga y es hidrofílica. La agarosa es biocompatible pero no es degradable. Existen muchos tipos de agarosa, cada uno con distintas temperaturas de fusión y gelificación. Una concentración de 1.5% de agarosa tipo II gelifica a 26°C, mientras que la misma concentración de agarosa tipo VII y XI-A gelifican a 26-30°C y por debajo de 17°C respectivamente. Asimismo, es posible controlar el tamaño de los poros y sus propiedades mecánicas por lo que es un biomaterial ampliamente utilizado en Ingeniería Tisular (Roach, Nover, Ateshian, & Hung, 2016).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha diseñado el hidrogel de fibrina-agarosa, el cual ha sido ampliamente utilizado en diversos protocolos de Ingeniería Tisular.

### 1.8.1. Aplicaciones biomédicas

El hidrogel de fibrina-agarosa es un hidrogel altamente versátil que ha demostrado ser un biomaterial natural mecánicamente estable, altamente biocompatible, biodegradable, con alto grado de hidratación y mejorable mediante técnicas de nanoestructuración y crosslinking. Actualmente, se trata de un producto aprobado como medicamento de terapias avanzadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Todas estas propiedades convierten al biomaterial de fibrina-agarosa en un candidato prometedor para ser utilizado en protocolos de Ingeniería Tisular del tendón, principal objetivo de la presente Tesis Doctoral.

Este biomaterial se ha utilizado con éxito en diferentes tejidos, cuyo resumen se presenta en la Tabla 5.

Tejido	Modelo Animal	Principales resultados	Referencia
<i>Córnea</i>	Conejo	Adhesión y crecimiento de células endoteliales corneales. Proliferación de queratinocitos. Estructuralmente similar a tejido nativo. Estratificación epitelial. Tejido translúcido.	(Alaminos et al., 2006)
<i>Mucosa oral</i>	Ratón	Proliferación de fibroblastos de mucosa oral humana. Formación de epitelio estratificado. Similitud fenotípica con la mucosa oral.	(Garzón et al., 2013; Sanchez-Quevedo et al., 2007)
<i>Piel</i>	Ratón	Proliferación de fibroblastos y queratinocitos. Formación de epidermis multiestratificada. Presencia de membrana basal. Similitud fenotípica con la piel humana.	(Carriel, Garzón, Jiménez, et al., 2011)

<i>Nervio periférico</i>	Rata	Buena tasa de reinervación por electromiografía. Regeneración de fibras nerviosas periféricas. Expresión de S-100 y GAP-43 a nivel intrafascicular.	(Carriel et al., 2014, 2013; Chato-Astrain et al., 2018)
<i>Paladar completo</i>	Conejo	Estructura simétrica al hueso nativo mediante micro TC. Patrón de alineación de colágeno regular. Similitud histológica. Presencia homogénea de osteocalcina.	(Liceras-Liceras et al., 2017)
<i>Cartílago</i>	<i>Ex vivo</i>	Sustituto de cartílago elástico compuesto por condrocitos inmersos en biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados.	(García-Martínez et al., 2016)
<i>Esclera</i>	Conejo	Reparación y regeneración efectiva de un defecto escleral con el uso de biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa y tratados con genipin.	(Carriel et al., 2019)
<i>Tendón</i>	Rata	Mejora del proceso de regeneración tendinosa con el uso de biomateriales nanoestructurados de fibrina-agarosa	(González-Quevedo et al., 2020) *Estudio de la presente Tesis Doctoral

**Tabla 5:** Principales aplicaciones biomédicas del hidrogel de fibrina-agarosa.

### 1.9. Modelos animales en investigación tendinosa

El uso de modelos animales constituye un marco de trabajo atractivo para investigar en patología tendinosa. Los modelos animales permiten la capacidad de repetir lesiones que se pueden tratar en un medio controlado y de una manera cuantificable. Además, permite evaluar tratamientos invasivos que podrían entrar en conflicto ético si se ensayaran en humanos. Otra ventaja única del uso de modelo animales es la modificación de su genoma, particularmente en modelo de roedores. Esta



tecnología permitiría comparar las propiedades tendinosas del ratón con o sin la capacidad de expresar determinados genes de manera global o en un tejido particular en un momento de tiempo determinado. De esta forma, en ratones con supresión de Scleraxis, se ha demostrado su menor capacidad de generar tendones sanos al nacimiento comparado con los controles, sugiriendo la importancia de esta molécula en la biología del tendón.

Sin embargo, el modelo animal nunca replicará la condición del tendón humano. La mayoría de animales de laboratorio son cuadrúpedos por lo que sus tendones están sujetos a diferentes magnitudes de carga que sus homólogos humanos, por lo que es muy difícil replicar fehacientemente la patología que se observa clínicamente en los pacientes. Además, existen diferencias moleculares entre los animales y los humanos pudiendo confundir aún más la comparación entre especies. Por ejemplo, se ha demostrado que los roedores no poseen el gen humano MMP1 expresado en el manguito rotador. Aun así, el modelo de roedor sigue siendo ampliamente utilizado y es una buena opción teniendo en cuenta estas consideraciones.

De manera global, es importante comprender que, aunque el objetivo siempre sea la investigación traslacional, el uso de modelos animales permite a los investigadores comprender los principios a nivel celular y tisular en el contexto de un organismo vivo.

En el caso del tendón de Aquiles, las ratas se han utilizado frecuentemente para reproducir modelos de ruptura o tendinopatía de manera directa, mecánica o química. Como ejemplo, se ha demostrado que las ratas que corren con 10° de inclinación a 17-20 m/min durante 60 minutos al día, desarrollan cambios leves adaptativos en su tendón de Aquiles. Sin embargo, un ligero aumento en la velocidad y en la duración provoca signos de tendinosis como la ruptura microfibrilar, la hiper celularidad o el incremento de glicosaminoglicanos. De manera alternativa, una tendinopatía se puede provocar haciendo que las ratas corran en bipedestación o con una contracción repetitiva inducida eléctricamente. Sin embargo, el uso de agentes químicos reduce el tiempo y los medios necesarios (Hast, Zuskov, & Soslowsky, 2014).

## **2. Hipótesis y justificación**

De acuerdo a todo lo mencionado anteriormente, las distintas patologías tendinosas son relativamente frecuentes y, debido a las limitaciones actuales de las distintas técnicas quirúrgicas disponibles, la Ingeniería Tisular ha emergido como una solución prometedora para estos pacientes. En este sentido, el uso de hidrogeles de fibrina-agarosa ha demostrado una alta biocompatibilidad y resultados prometedores en la reparación y regeneración de distintos tejidos y órganos, lo que lo convierte en un biomaterial potencialmente útil para ser utilizado en la reparación quirúrgica de lesiones tendinosas.

Es por ello que, la hipótesis de la presente Tesis Doctoral, es que el uso de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa y de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa sometidos a crosslinking con genipin podrían suponer una importante mejora en el proceso de regeneración tendinosa en comparación con las técnicas quirúrgicas y comerciales disponibles actualmente. Por un lado, estos biomateriales podrían ayudar a crear un microambiente tras la reparación del defecto tendinoso que promueva la organización de los componentes celulares y extracelulares durante el complejo proceso de regeneración de este tejido. Por otro lado, la utilización de estos biomateriales como refuerzo externo de la reparación quirúrgica del tendón podría asegurar la protección del proceso de regeneración interna, disminuir la invasión del estroma circundante y, por tanto, disminuir la reacción inflamatoria y adherencias que suelen tener lugar en este tipo de intervenciones. Por último, el uso de estos biomateriales podría contribuir a incrementar la resistencia del tendón tras la reparación favoreciendo su respuesta funcional.

### **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es generar y evaluar a nivel preclínico nuevos sustitutos bioartificiales mediante la utilización de biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados y agentes de crosslinking para su uso en la reparación microquirúrgica de lesiones tendinosas.

### **3.2. Objetivos específicos**

- a) Elaborar por técnicas de Ingeniería Tisular nuevos sustitutos bioartificiales de fibrina-agarosa mediante procesos de nanoestructuración y crosslinking químico con genipin.
- b) Determinar las propiedades y respuesta biomecánica de los sustitutos bioartificiales generados mediante ensayos bajo esfuerzos de tracción.
- c) Determinar las propiedades biológicas y de interacción celular de los sustitutos generados mediante pruebas funcionales, microscópicas y bioquímicas de viabilidad y función celular.
- d) Determinar la eficacia terapéutica, grado de integración y potencial de regeneración tisular de los sustitutos bioartificiales generados en un modelo animal de lesión y reparación tendinosa mediante técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y morfométricas.
- e) Correlacionar los resultados *ex vivo* e *in vivo* para determinar la eficacia terapéutica y potencial traslación clínica de los sustitutos bioartificiales generados para la reparación de lesiones tendinosas.

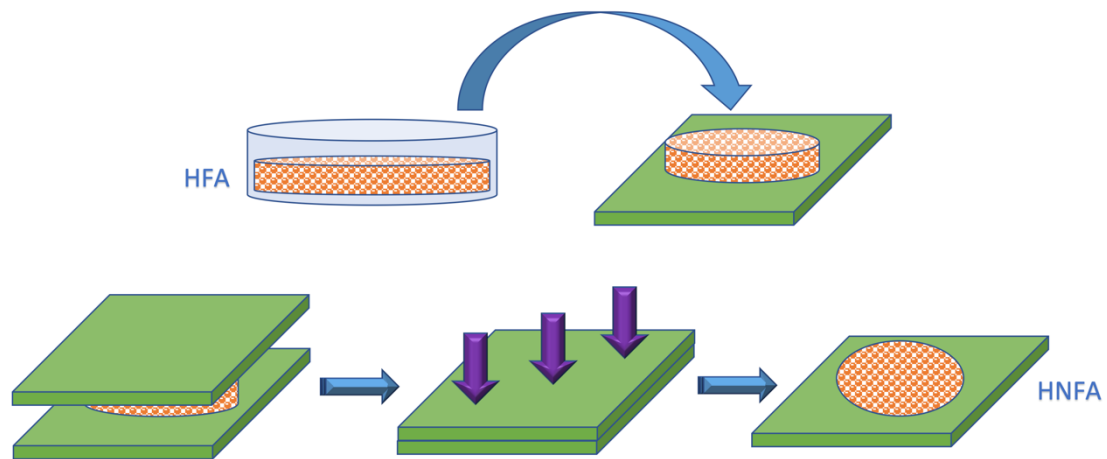
## **4. Metodología**

En este apartado se describe en primer lugar la generación de los hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurada y, la acción del entrecruzamiento del agente químico con genipin, así como la forma de obtención de una matriz comercial. Con posterioridad se describen los distintos métodos y técnicas con las que se determinan las características biomecánicas y biológicas *ex vivo* y, por otro lado, la evaluación de la eficacia terapéutica en un modelo *in vivo* de lesión, reparación y regeneración tendinosa.

#### **4.1. Generación de los biomateriales**

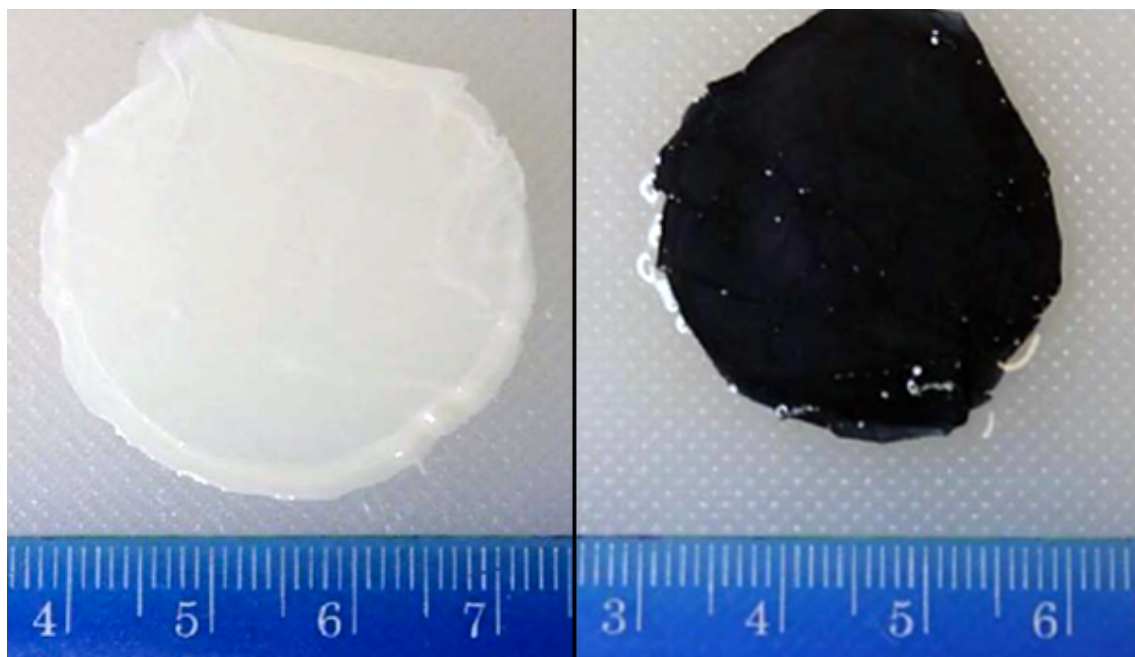
##### **4.1.1. Hidrogel de fibrina-agarosa**

Siguiendo los protocolos establecidos por el grupo de investigación, se utilizan 22.8 ml de plasma humano, 2.25 ml de tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) y 450  $\mu$ l de ácido tranexámico (Amchafibrin, Fides-Ecofarma, Valencia, España) para obtener 30 ml del hidrogel de fibrina-agarosa (HFA) (Alaminos et al., 2006; Carriel, Scionti, et al., 2017). Para promover la gelación, la solución se mezcla con 3 ml de  $\text{CaCl}_2$  al 2% y 1.5 ml de agarosa tipo VII fundida al 2% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). La solución se mezcla cuidadosamente y se mantiene en placas de Petri de 5 ml hasta completar la gelificación durante una hora bajo condiciones estándar de cultivo ( $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5%). De acuerdo con protocolos previamente establecidos, los hidrogeles se sometieron al proceso de nanoestructuración (F. Campos et al., 2016; Carriel, Scionti, et al., 2017) . Para ello, los hidrogeles se colocan entre un par de membranas de filtro de nailon con un tamaño de poro de  $0.22 \mu\text{m}$  (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) y se comprimen entre un par de piezas de papel absorbente estéril de Whatman de 3 mm debajo de un dispositivo de vidrio plano (F. Campos et al., 2016). Después de aplicar una presión mecánica uniforme (500 g, distribuidos homogéneamente) durante 3 minutos, obtenemos un hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa (HNFA) de aproximadamente  $50\text{-}60 \mu\text{m}$  de espesor (Figura 14).



**Figura 14:** Representación esquemática del proceso de nanoestructuración del hidrogel de fibrina agarosa (adaptado de Carriel, Scionti, et al., 2017).

Con el objetivo de mejorar las propiedades estructurales y biomecánicas, estos constructos se sometieron a crosslinking químico con genipin (GP) en incubadora de agua a 37°C durante 72 horas en oscuridad tal y como se ha publicado previamente (F. Campos et al., 2018). El genipin se disolvió en PBS (0.1 M, pH 7.2-7.4) y se utiliza con una concentración final del 0.1%. Después del proceso de crosslinking, los constructos se lavan durante 24 horas con PBS para obtener un hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa con genipin (HNFA-GP) (Figura 15).





**Figura 15:** *Imagen macroscópica de la apariencia del hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa con su color característico blanquecino y del hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa tratado con genipin que muestra su reacción típica azulada colorimétrica (adaptado de F. Campos et al., 2018).*

#### **4.1.2. MatriDerm®**

MatriDerm® (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Alemania) es una matriz tridimensional de colágeno con elastina aprobada para uso clínico. El colágeno (tipo I, III y IV) es obtenido de la dermis bovina y la elastina se obtiene del ligamento nucal bovino mediante hidrolización. Es una matriz biocompatible obtenida por crosslinking que es capaz de modular el tejido de reparación con propiedades hemostáticas y una estabilidad mecánica limitada (Killat et al., 2013).

### **4.2. Caracterización *ex vivo***

#### **4.2.1. Evaluación biomecánica bajo esfuerzo de tracción**

Los biomateriales utilizados (HNFA, HNFA-GP y MatriDerm®) se sometieron a ensayo de tracción con una máquina de prueba universal Instron (Modelo 5943, Needham, EEUU). Los biomateriales (30 mm de longitud, 10 mm de ancho y 0.05-0.06 mm de espesor) se orientaron con su longitud en dirección a la tensión y se sujetaron en ambos extremos, dejando una distancia constante de 1 cm entre las mordazas, según los protocolos previamente publicados (Carriel, Garzón, et al., 2017). Los test se realizaron a una velocidad de deformación constante de 5 mm/min a temperatura ambiente. El ensayo de tracción realizado nos ha permitido determinar tres parámetros biomecánicos: el módulo de Young, el esfuerzo a la rotura y la capacidad de deformación (Scionti et al., 2014).

El módulo de Young (E) se calculó como la tangente de la porción lineal inicial de la curva de tensión-deformación en cada prueba experimental, mientras que los valores del esfuerzo a rotura ( $\sigma$ ) y de la deformación a rotura ( $\epsilon$ ) se determinaron seleccionando el punto de la curva tensión-deformación donde ocurrió la rotura. Valores más altos de

módulo de Young indican un material más rígido mientras que valores más bajos de éste se relacionan con un material más elástico. Los valores de esfuerzo a la rotura nos permite conocer la resistencia de los biomateriales mientras que la deformación a la rotura nos informa, en milímetros o porcentaje, de la capacidad de deformación de un biomaterial (Philips, Cornelissen, & Carriel, 2018). En este proyecto de Tesis Doctoral, para los ensayos de tracción, se utilizó una carga celular de 50 N y se utilizó un total de 5 muestras para cada biomaterial (Figura 16).



**Figura 16:** Ensayo de tracción realizado a un hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa empleando la máquina de prueba universal Instron (Modelo 5943).

#### 4.2.2. Evaluación de la biocompatibilidad

Se aislaron fibroblastos derivados del tendón procedentes de los tendones de las patas traseras de la rata de tres animales independientes del resto del estudio. Los tendones se disecaron de forma cuidadosa y se limpió todo el tejido conectivo circundante. Se fragmentó mecánicamente en pequeñas piezas que se digirieron con solución de colagenasa tipo I al 0.3% (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) durante 7 horas a 37°C. Las células se aislaron por centrifugación y se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) y suplementado con solución de cóctel de antibióticos-antimicóticos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 3 días y se las células se mantuvieron hasta que los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia. En este trabajo, las células más viables y funcionales fueron las células del pase 4-6, las cuales se eligieron para los análisis de interacción célula-biomaterial.

Una porción circular de 8 mm de diámetro de cada biomaterial se adhirió al fondo del pocillo de placas de 24 pocillos y los fibroblastos derivados del tendón se sembraron sobre éstos ( $2 \times 10^4$  células/pocillo). Las células se mantuvieron bajo condiciones de cultivo estándar empleando DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y al 1% de solución de antibióticos. Para evaluar la función y viabilidad celular, a las 48 horas, se realizaron los siguientes análisis previamente validados (F. Campos et al., 2016): Live/Dead® Cell Viability Assay, determinación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales (*water-soluble tetrazolium salt-1*, WST-1) y cuantificación del ADN liberado.

Estos análisis se realizaron en quintuplicado. El ensayo de viabilidad celular Live/Dead® se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Viability/Cytotoxicity kit; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EEUU). Brevemente, los biomateriales con células sembradas en la parte superior ( $10^4$  células por biomaterial) se enjuagaron en PBS tres veces (5 minutos cada una) y luego se incubaron en la solución de trabajo durante 30 minutos. Los biomateriales se enjuagaron de nuevo con PBS y se

analizaron con un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti) equipado con una cámara digital (Nikon DXM 1200c). Los fibroblastos derivados del tendón cultivados se utilizaron como controles técnicos positivos (control positivo 2D) mientras que las células incubadas con Triton X-100 al 2% se utilizaron como controles técnicos negativos (control negativo 2D).

El ensayo WST-1 se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y los protocolos descritos con anterioridad (Garzón et al., 2012; Martin-Piedra et al., 2014). Se colocó sobre la superficie de los biomateriales, el medio se retiró después de 48 horas y los biomateriales se enjuagaron con PBS y se incubaron en la solución de trabajo durante 4 horas a 37°C.

Para evaluar la permeabilidad de la membrana celular, el ADN liberado se cuantificó espectrofotométricamente siguiendo los protocolos previamente publicados (Rodríguez-Arco et al., 2016). El medio se retiró después de 48 horas tras el cultivo, se colocó en tubos de Eppendorf y para cuantificar el ADN liberado se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000-UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU). Las células incubadas con Triton X-100 al 2% se utilizaron como controles técnicos negativos con un alto índice de liberación de ADN, lo que indica un daño irreversible en la membrana celular. El agua destilada y el medio de cultivo se utilizaron como controles técnicos positivos.

### **4.3. Evaluación *in vivo***

#### **4.3.1. Animales de experimentación**

Se seleccionaron y se cuidaron 24 ratas tipo Wistar de 12 semanas de vida y 250-300 g de peso aproximadamente en la Unidad Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada (España). Durante todo el estudio, los animales se mantuvieron en jaulas individuales en una habitación de temperatura controlada (21 ± 1°C), en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso *ad libitum* a agua y pienso animal estándar.

Este proyecto de Tesis Doctoral se realizó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Granada (Número de Aprobación: 231-CEEA-OH-2018).

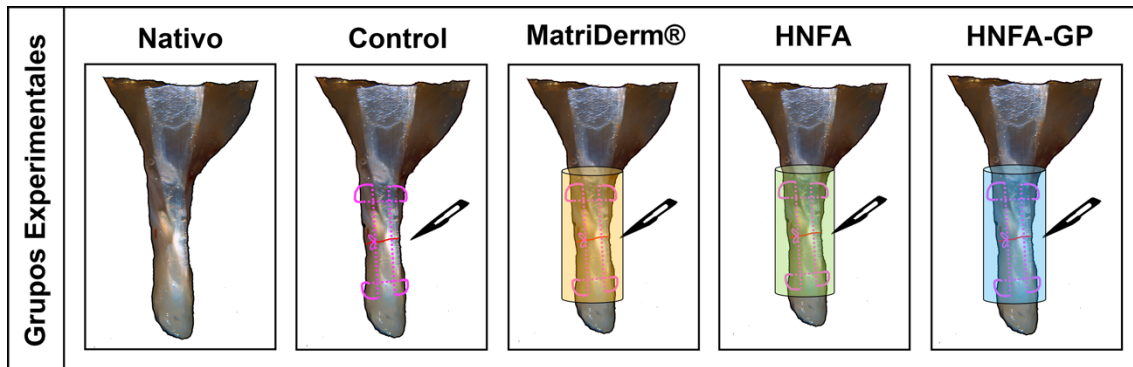
#### **4.3.2. Procedimiento quirúrgico y grupos experimentales**

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general con una inyección intraperitoneal de acepromacina, ketamina y atropina. La piel se rasuró y se desinfectó con una solución de povidona yodada al 10%.

En condiciones de esterilidad, se realizó una incisión longitudinal con bisturí frío sobre el músculo gastrocnemio en dirección al hueso calcáneo, sobre la pata trasera izquierda de cada animal. Los animales se asignaron de forma aleatoria a los siguientes grupos de control y experimentales (n=6 en cada grupo).

- Grupo Control (Control): se cortó la porción central del tendón de Aquiles y se suturó de manera inmediata mediante una sutura modificada de Kessler con una sutura de nylon de 4-0.
- Grupo de matriz de colágeno/elastina (MatriDerm®): la lesión se reparó de la manera descrita en el grupo control y, además, se envolvió con la matriz de MatriDerm®.
- Grupo de hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa (HNFA): el tendón fue reparado de la forma descrita anteriormente y se envolvió con dicho hidrogel.
- Grupo de hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa con genipin (HNFA-GP): el tendón se reparó como se ha descrito en el grupo anterior y se envolvió con el hidrogel.

Podemos observar un resumen de los distintos grupos experimentales en la Figura 17.



**Figura 17:** Esquema de los grupos de control y experimentales.

En todos los grupos, el procedimiento quirúrgico fue realizado por un especialista en cirugía ortopédica y traumatología, autor de la presente tesis doctoral, utilizando la misma técnica quirúrgica. El músculo delgado plantar se utilizó como estabilizador interno. La piel se cerró y se suturó con sutura no absorbible (Figura 18). En el postoperatorio, las ratas se mantuvieron en sus jaulas individuales sin restricción de movilidad. Los animales se sometieron a eutanasia y los tendones reparados se disecaron a las 4 y 8 semanas tras la cirugía (n=3 en cada grupo). Estos puntos de corte se seleccionaron de acuerdo a publicaciones que sugieren que la estructura histológica y las propiedades mecánicas de los tendones reparados en esta especie se aproximan al tendón nativo alrededor de la octava semana tras la reparación (Battaglia et al., 2003).



**Figura 18:** Fotografías realizadas del procedimiento quirúrgico.

### **4.3.3. Evaluación funcional**

Para evaluar la funcionalidad de las ratas se utilizó el *Achilles functional index* (AFI). Las plantas de las patas traseras se pintaron con tinta azul diluida en agua y se permitió que caminaran sobre un papel blanco por un sendero delimitado de aproximadamente 80 cm de longitud y 10 cm de ancho. Las huellas se midieron, se cuantificaron y se calculó el AFI según la fórmula propuesta por el autor Murrell (Murrell et al., 1992). Las huellas se obtuvieron para cada rata de cada grupo experimental a las 4 y 8 semanas.

### **4.3.4. Análisis macroscópicos y microscópicos**

Los tendones de Aquiles normales y reparados de cada rata se disecaron de cada animal tras la perceptiva eutanasia y se fijaron en formalina tamponada al 10% por un período de 48 horas. Los tendones se fotografiaron y analizaron macroscópicamente con el objetivo de detectar algún cambio patológico o reacción adversa a la reparación. Finalmente, los tendones fueron lavados, deshidratados en concentraciones ascendentes de alcohol, diafanizados en xilol e incluidos en parafina.

Para el análisis histológico, las inclusiones se cortaron con un micrótomo, el cual permitió la obtención de cortes histológicos con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ . Estos cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados en soluciones decrecientes de alcohol y agua destilada, y las secciones hidratadas fueron teñidas con las técnicas de hematoxilina y eosina, azul de Alcian, tricrómico de Masson y rojo picrosirio siguiendo los protocolos previamente desarrollados por nuestro grupo de investigación. La tinción de hematoxilina y eosina fue utilizada para el análisis histológico general, para evaluar los hallazgos histopatológicos que pudieran estar presentes y para la valoración histológica cuantitativa (descrita a continuación). El método histoquímico de azul de Alcian se utilizó para la identificación de proteoglicanos ácidos, elementos esenciales para la matriz de colágeno. El tricrómico de Masson y el método de rojo picrosirio fueron utilizados para evaluar la distribución de los colágenos fibrilares (tipo I, II, III) en la matriz nativa y en regeneración. Es preciso mencionar que el método de Picrosirius, al utilizar un fuerte

colorante aniónico poliazó (rojo sirio FB3), permite identificar específicamente los colágenos fibrilares. Además, esta técnica incrementa la birrefringencia natural de las fibras colágenas, lo cual permite determinar el grado de organización tisular de la matriz de fibras colágenas por microscopía de luz polarizada, método que ha sido empleado en el presente estudio (Carriel, Garzón, Alaminos, & Campos, 2011).

Además de las técnicas histoquímicas previamente descritas, se determinó, mediante inmunohistoquímica indirecta, la expresión de la molécula de superficie celular CD45 o antígeno leucocitario común (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Este marcador fue empleado con el objetivo de identificar la presencia y distribución de las células linfoides o inflamatorias dentro del tendón reparado. Estas células son prácticamente inexistentes en un tendón normal, pero su número se puede ver incrementado en las diferentes fases de la regeneración tendinosa (ver sección 1.4 de la introducción de la presente memoria).

En esta Tesis Doctoral, la totalidad de las preparaciones histológicas fueron analizadas y fotografiadas en el laboratorio de microscopía del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. En este sentido, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 90i y el software Nis-Elements (Tokio, Japón).

#### **4.3.4.1. Análisis histológico cuantitativo**

Se determinó de manera cuantitativa la celularidad en el tendón nativo, en el grupo control y en los grupos experimentales mediante el software Image J (National Institutes of Health, EEUU) siguiendo un procedimiento previamente descrito (Carriel et al., 2013; Carriel, Garzón, et al., 2017; Segura-Rodríguez et al., 2020). Brevemente, se utilizaron las muestras con tinción de hematoxilina y eosina para poder identificar los núcleos celulares, seleccionando la función “*Threshold*” del software. Una vez que los núcleos celulares se identifican, se convierten en formato binario y el porcentaje de núcleos celulares por área analizada, o fracción de área, se calcular de manera automática mediante la función “*Measure*” del citado software. Este análisis se realizó para cada muestra de todos los animales de cada grupo y tiempo (n=3).



Asimismo, se realizó asimismo un análisis histológico cuantitativo utilizando un sistema de clasificación diseñado por Stoll y modificado por nuestro grupo de investigación (Stoll et al., 2011). El tendón nativo o no lesionado se puntúa con 18 puntos utilizando esta escala, en la cual se valoran diferentes aspectos histológicos, los cuales se muestran en la Tabla 6.

<b>Características histológicas</b>	<b>Puntos</b>
<i>Organización de las fibras de colágeno y de la matriz extracelular</i>	
Normal (paralelas, compactas, ordenadas)	3
Leve	2
Moderado	1
Anormal (alta desorganización)	0
<i>Alineación y distribución celular</i>	
Normal (uniaxial y homogéneo)	3
Leve	2
Moderado	1
Anormal	0
<i>Morfología del núcleo celular</i>	
Normal (tenocitos)	3
Leve	2
Moderado	1
Anormal (aumento de tamaño, de polimorfismo...)	0
<i>Cambios degenerativos / Metaplasia tisular</i>	
Normal	3
Leve	2
Moderada	1
Grave	0
<i>Vascularización (angiogénesis)</i>	
Normal	3
Leve	2
Moderada	1
Grave	0
<i>Infamación</i>	
Normal	3
Leve	2
Moderada	1
Grave	0
<i>Tendón Nativo</i>	18

**Tabla 6:** Sistema de graduación del patrón histológico del tendón.

#### **4.4. Análisis estadístico**

La totalidad de los análisis estadísticos de la presente Tesis Doctoral se realizaron utilizando el software SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, EEUU) y el software G\*power 3.0.10 (Universität Kiel, Alemania). Las variables categóricas se presentan como valores absolutos y porcentajes, mientras que las variables continuas se presentan como medias con sus respectivas desviaciones estándar (DE).

En este proyecto, las características de distribución de los datos de las variables estudiadas, esto es, si éstas obedecen o no a una distribución normal, fue analizadas con el test de Saphiro-Wilk (Martín Andrés & Luna del Castillo, 2013). Esta prueba confirmó que la totalidad de los datos de las variables analizadas no presentan una distribución normal. Por lo tanto, las diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variables de estudio se determinaron con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney (post-hoc). La prueba de Kruskal-Wallis se empleó para determinar si, para una determinada variable, existen diferencias significativas o si los datos provienen de una misma población. Por otro lado, para determinar las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los grupos experimentales independientes para una misma variable se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Debido al gran número de comparaciones estadísticas realizadas (post-hoc), se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. En este sentido, para los análisis de WST-1 y ADN, valores  $p \leq 0.00454$  se consideraron como estadísticamente significativos, mientras que para la celularidad y el análisis histológico cuantitativo se consideraron estadísticamente significativos valores  $p \leq 0.00138$ . Por último, los valores  $p$  que se encontraban entre los valores de corrección de Bonferroni y 0.05 se consideraron como marginalmente significativos en las pruebas no paramétricas bilaterales.

## **5. Resultados**

Tras exponer la metodología desarrollada para alcanzar los objetivos de la Tesis Doctoral, expondremos en el presente capítulo los resultados obtenidos. En primer lugar, abordaremos los resultados obtenidos con la evaluación *ex vivo* de los biomateriales utilizados en el modelo experimental diseñado tanto en lo que se refiere a los ensayos de tracción como a los de biocompatibilidad y, con posterioridad, los resultados obtenidos con la evaluación *in vivo* en los animales de experimentación utilizados en el presente estudio. A este nivel abordamos el estudio funcional que resulta de la experimentación realizada, el análisis macroscópico y finalmente el estudio histológico, histoquímico e inmuistoquímico de los tendones reparados con los biomateriales utilizados en la presente tesis doctoral.

## **5.1. Propiedades de los biomateriales *ex vivo***

### **5.1.1. Propiedades biomecánicas bajo esfuerzos de tracción**

Como se ha descrito en la metodología de la presente Tesis Doctoral, los biomateriales generados fueron sometidos a una evaluación biomecánica bajo esfuerzos de tracción, la cual nos permitió determinar el módulo de Young, el esfuerzo a la rotura y la capacidad de deformación.

La evaluación del módulo de Young mostró unos valores más altos en MatriDerm® seguido de HNFA-GP y HNFA. El test de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ( $p=0.00242$ ) con todas las comparaciones siendo marginalmente significativas (valores  $p$  entre 0.05 y 0.00416).

Respecto a los valores de esfuerzo a la rotura, los resultados fueron mayores en el grupo de HNFA respecto al resto de biomateriales con un valor  $p=0.01624$  para el test de Kruskal-Wallis. Las diferencias fueron marginalmente significativas entre el grupo de HNFA y los grupos de MatriDerm® ( $p=0.04720$ ) y de HNFA-GP ( $p=0.00902$ ), pero no entre los grupos de MatriDerm® y HNFA-GP ( $p=0.25059$ ).

De manera similar, la capacidad de deformación de los biomateriales (o deformación a la rotura) fue mayor en el grupo de HNFA que en el resto de

biomateriales, con un valor  $p < 0.00001$  para el test de Kruskal-Wallis, siendo las diferencias entre los biomateriales marginalmente significativas.

Los resultados del ensayo de tracción y el análisis estadístico se muestran en la Tabla 7.

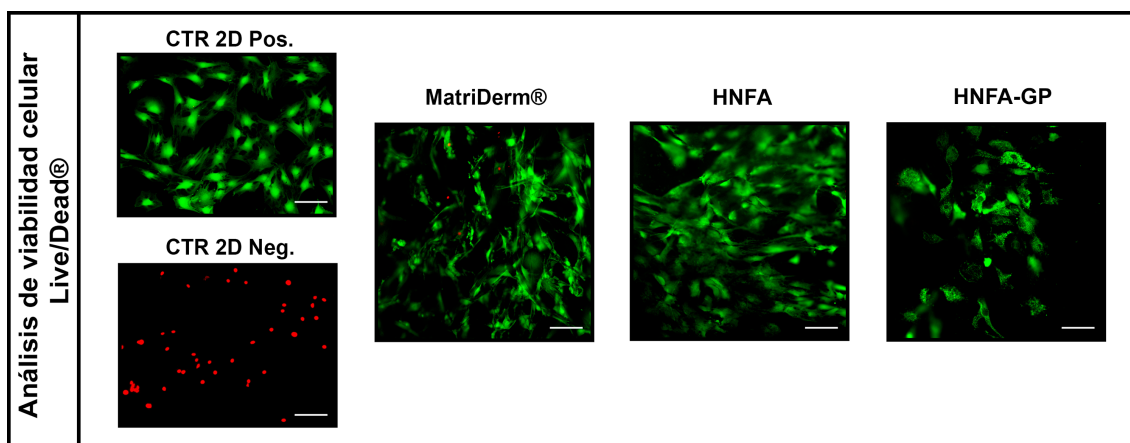
		MatriDerm®	HNFA	HNFA-GP
<i>Módulo de Young (MPa)</i>	Media ± DE	1.54 ± 0.56	0.26 ± 0.08	0.48 ± 0.13
	vs. MatriDerm®		0.00902*	0.00902*
	vs. HNFA			0.01629*
<i>Esfuerzo a rotura (<math>\sigma</math>, MPa)</i>	Media ± DE	0.34 ± 0.12	0.50 ± 0.09	0.26 ± 0.08
	vs. MatriDerm®		0.04720*	0.25059
	vs. HNFA			0.00902*
<i>Deformación a rotura (<math>\epsilon</math>, %)</i>	Media ± DE	57.38 ± 8.88	315.00 ± 59.10	76.43 ± 9.48
	vs. MatriDerm®		0.00902*	0.02828*
	vs. HNFA			0.00902*

**Tabla 7:** Resultados del ensayo de tracción y análisis estadístico. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (DE). Se presentan los valores de p exactos para el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* indica diferencias marginalmente significativas. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas.

### 5.1.2. Biocompatibilidad ex vivo

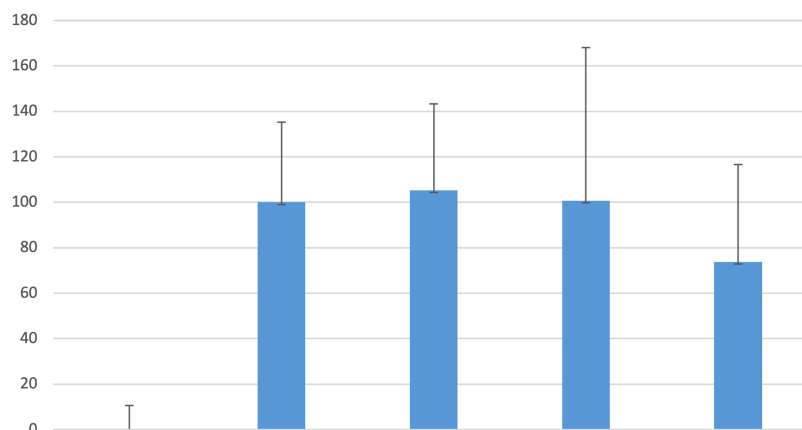
La evaluación funcional y morfológica llevada a cabo mediante el análisis de viabilidad celular *Live/Dead*® mostró la presencia de células viables (fluorescencia verde) en todos los biomateriales utilizados en este trabajo. En el grupo MatriDerm® se observó, en la superficie del biomaterial, la presencia de fibroblastos derivados del tendón más alargados, pero en un menor número comparado con el grupo de HNFA. El análisis del grupo HNFA mostró la presencia de fibroblastos fusiformes y planos sobre la superficie del biomaterial, con una morfología comparable a los fibroblastos nativos o

las células cultivadas en las condiciones 2D, utilizadas como grupo control técnico positivo, durante las primeras 48 horas analizadas. De manera interesante, un menor número de células se adhirieron al biomaterial de HNFA-GP en comparación con el resto de condiciones experimentales analizadas (Figura 19).



**Figura 19:** Ensayo morfofuncional de viabilidad celular. Evaluación de los fibroblastos derivados del tendón en la superficie del biomaterial. Microscopía fluorescente del análisis Live/Dead® mostrando células viables (verde) y células muertas (rojo) en los controles técnicos (CTR 2D) y en los biomateriales. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

El análisis bioquímico de la actividad metabólica celular llevado a cabo mediante el análisis de WST-1 mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con el test de Kruskal-Wallis ( $p < 0.00001$ ). Los valores normalizados de WST-1 en las células cultivadas en la superficie de los tres biomateriales e incluso en los controles técnicos positivos fueron estadísticamente superiores que en los controles técnicos negativos ( $p < 0.00001$ ). El valor medio obtenido para los controles técnicos positivos fue de 100% y las diferencias no fueron estadísticamente significativas con los grupos de MatriDerm® (105%,  $p = 1.000$ ) y de HNFA (100%,  $p = 0.85373$ ). Sin embargo, los valores de WST-1 obtenidos para las células cultivadas en el grupo de HNFA-GP (73%) fueron estadísticamente inferiores que en el grupo control técnico positivo ( $p = 0.00203$ ) y MatriDerm® ( $p = 0.00009$ ) y marginalmente significativos comparados con HNFA ( $p = 0.01103$ ) (Tabla 8).



		CTR-	CTR+	MatriDerm®	HNFA	HNFA-GP
<b>WST-1</b>	Media ± DE	<b>0.00 ± 10.57</b>	<b>100.00 ± 35.27</b>	<b>105.31 ± 37.99</b>	<b>100.77 ± 67.31</b>	<b>73.83 ± 42.79</b>
Valor p	vs. CTR-		<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**
	vs. CTR+			1.00000	0.85373	0.00203**
	vs. MatriDerm®				0.90732	0.00009**
	vs. HNFA					0.01103*

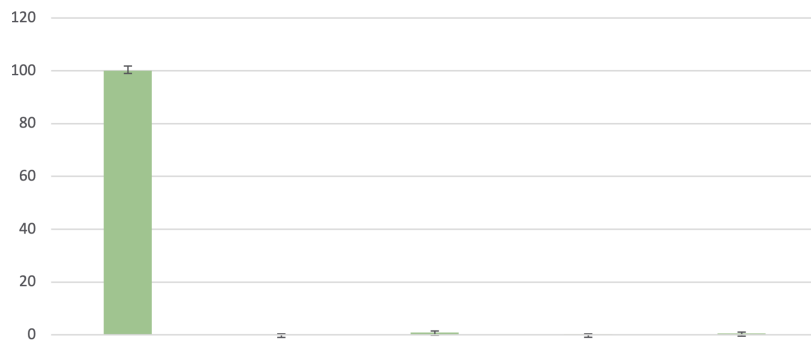
**Tabla 8:** Representación gráfica y numérica de los valores normalizados de WST-1. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (DE). Se presentan los valores de p exactos para el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* indica diferencias marginalmente significativas. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas.

El análisis espectrofotométrico del ADN liberado permitió valorar cuantitativamente la permeabilidad de las membranas celulares. Cultivos celulares con un alto número de células con daño irreversible de la membrana citoplasmática y/o nuclear tendrán una mayor permeabilidad y, por tanto, una mayor liberación de ADN al medio.

Este análisis no mostró datos cuantificables de liberación de ADN al medio de cultivo en el grupo control técnico positivo. No obstante, la totalidad del ADN fue liberado en el grupo control negativo, en el cual las células fueron tratadas con una solución al 2% de Tritón X-100. Este detergente induce un daño irreversible de las membranas celulares de la totalidad de las células con la consecuente liberación de

ADN. Para este análisis, los datos experimentales han sido normalizados en función de los controles técnicos y, por tanto, los valores del control negativo representan el 100% y el control positivo el 0% respectivamente.

En este estudio, el test de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0.00001$ ). Las células cultivadas con los biomateriales y en el control técnico positivo liberaron menos del 1% del contenido de ADN comparado con el control técnico negativo siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.00001$ ). Además, los biomateriales mostraron valores más altos comparado con el grupo control positivo, estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el grupo MatriDerm® ( $p = 0.00012$ ), marginalmente significativas para el grupo HNFA-GP ( $p = 0.01072$ ) y no significativas para el grupo HNFA ( $p = 0.37235$ ). De manera interesante, los valores normalizados de ADN fueron mayores en el grupo MatriDerm® y HNFA-GP que en el grupo HNFA, siendo las diferencias estadísticamente significativas para MatriDerm® ( $p = 0.00002$ ) y marginalmente significativas para HNFA-GP ( $p = 0.01702$ ). Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo MatriDerm® y HNFA-GP ( $p = 0.18412$ ) (Tabla 9).



		CTR-	CTR+	MatriDerm®	HNFA	HNFA-GP
<b>DNA</b>	Media ± DE	<b>100.00 ± 1.81</b>	<b>0.00 ± 0.35</b>	<b>0.87 ± 0.57</b>	<b>0.05 ± 0.29</b>	<b>0.48 ± 0.54</b>
Valor p	vs. CTR-		<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**
	vs. CTR+			0.00012**	0.37235	0.01072*
	vs. MatriDerm®				0.00002**	0.18412
	vs. HNFA					0.01702*



**Tabla 9:** Representación gráfica y numérica de los valores normalizados de ADN liberado. Los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se presentan los valores de *p* exactos para el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* indica diferencias marginalmente significativas. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas.

## **5.2. Evaluación *in vivo***

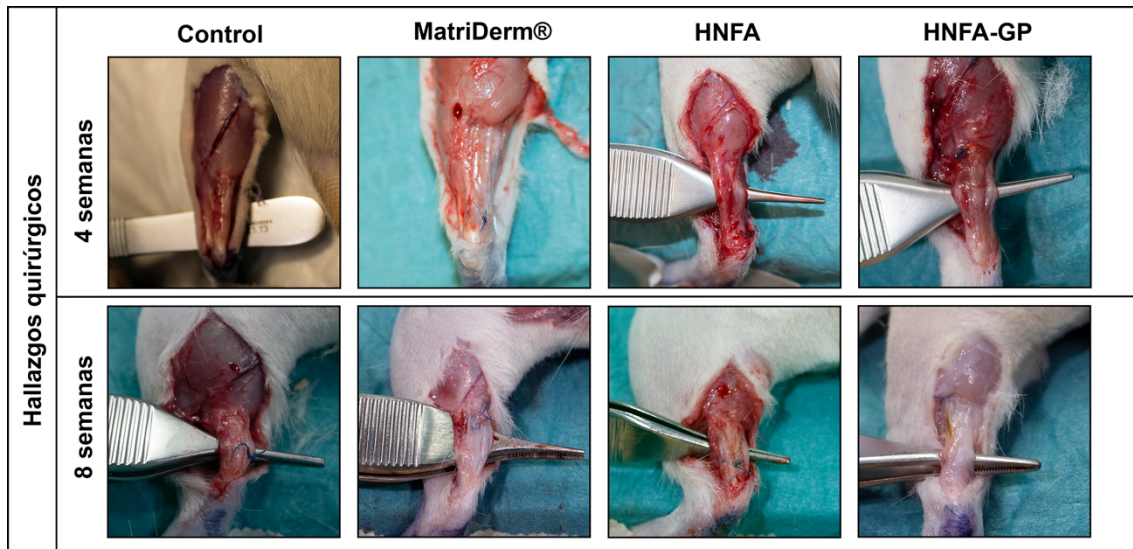
### **5.2.1. Resultados funcionales**

La evaluación clínica de los animales sometidos a reparación quirúrgica mostró una correcta cicatrización de la herida quirúrgica en todos los casos sin complicación clínica relevante. Además, no hubo déficit de movilidad de los animales en sus jaulas y las patas intervenidas realizaban carga completa con una exploración normal de la sensibilidad.

Por otro lado, no existió alteración funcional durante el análisis del índice AFI, con resultados comparables de las condiciones experimentales con los controles.

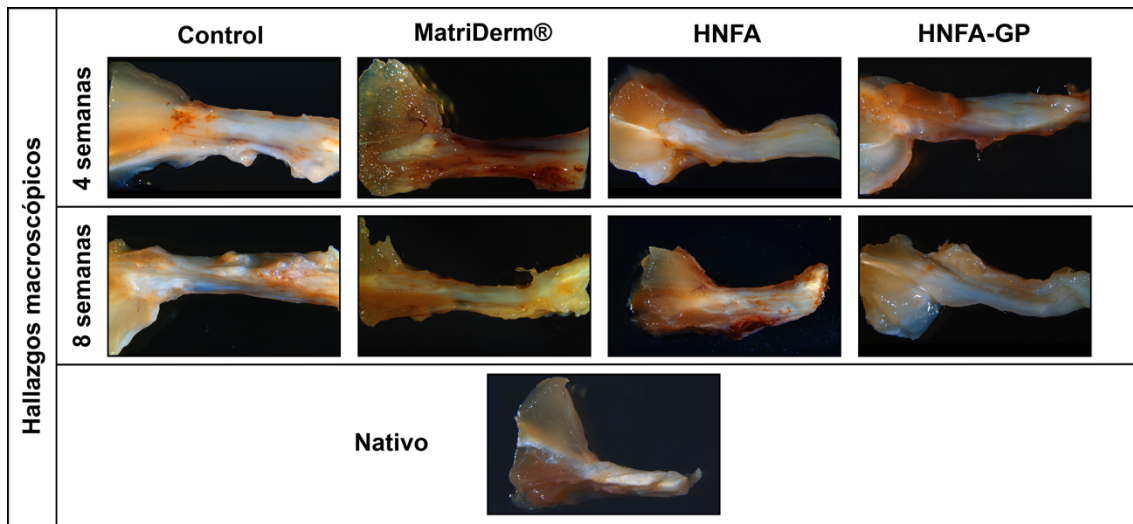
### **5.2.2. Resultados macroscópicos**

El aspecto general de los tendones disecados reveló una pérdida del brillo nacarado característico del tendón nativo. Además, todos los tendones reparados mostraron leves signos de edema en el tejido conectivo y, algunos de ellos, presentaron adhesiones menores a los tejidos circundantes. Sin embargo, no se observaron signos de necrosis tisular, de inflamación grave, de ruptura tendinosa ni de deformidad durante el período de tiempo analizado (Figura 20).



**Figura 20:** Hallazgos quirúrgicos de los grupos experimentales. Se puede observar la integración del biomaterial en los tendones intervenidos y la ausencia de signos de complicaciones como la reruptura tendinosa.

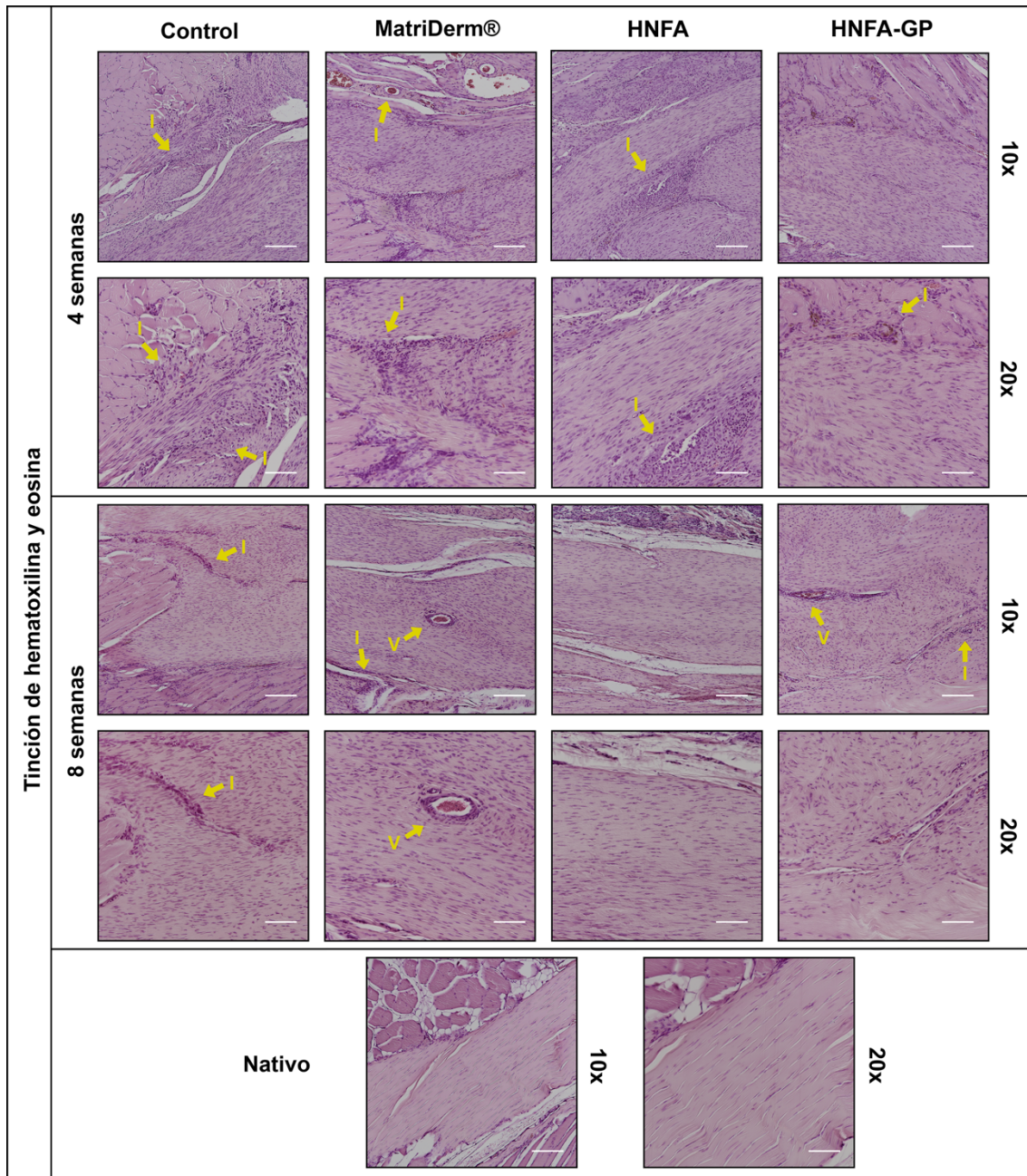
En cuanto a la forma y dimensiones, los tendones reparados resultaron ser un poco más alargados y con más volumen. Por otro lado, el análisis macroscópico mostró que todos los biomateriales utilizados se integraron o se reabsorbieron de forma completa tras 4 y especialmente 8 semanas tras la cirugía (Figura 21).



**Figura 21:** *Hallazgos macroscópicos de los tendones explantados de los grupos nativo y experimentales. Se puede observar una pérdida del brillo característico del tendón nativo. Además, todos los tendones reparados muestran signos de edema tisular y una leve elongación. Todos los biomateriales se integraron sin efectos macroscópicos adversos.*

### **5.2.3. Resultados histológicos**

Los análisis histológicos llevados a cabo mediante la tinción de hematoxilina y eosina a las 4 y 8 semanas revelaron un proceso de regeneración tisular activa, así como un incremento en la celularidad en los tendones reparados en comparación con el tendón nativo. Después de 4 semanas, se observan algunos elementos inflamatorios en la zona reparada, especialmente en los grupos control y MatriDerm®. Además, podemos observar una pérdida de la alineación tisular y un incremento del número de vasos sanguíneos en la zona reparada en todos los animales intervenidos. Los análisis llevados a cabo a las 8 semanas mostraron un descenso del contenido celular y un considerable aumento de la alineación tisular y la vascularización. Finalmente, no se observaron cambios histopatológicos, como reacción a cuerpo extraño, signos de inflamación crónica grave o necrosis, durante las 8 semanas estudiadas en todas las condiciones experimentales (Figura 22).



**Figura 22:** Tinción de hematoxilina y eosina de los tendones explantados. Se puede observar el incremento del número de células en todas las condiciones experimentales. Tras 4 semanas, se pueden identificar la presencia de células inflamatorias (I) y vasos sanguíneos (V) así como una pérdida de la alineación tisular. Tras 8 semanas, hay un descenso de la densidad celular con una clara mejoría de la alineación tisular, aunque no es comparable al nivel de organización del tendón nativo. No se observaron cambios adversos histopatológicos. Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$  (10x) y 100  $\mu\text{m}$  (20x).

### 5.2.3.1. Resultados histoquímicos e inmunohistoquímicos

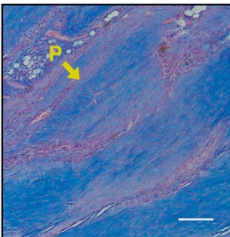
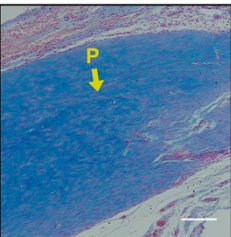
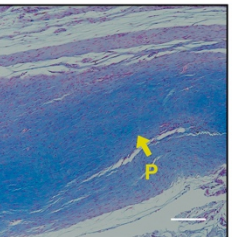
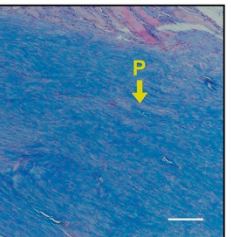
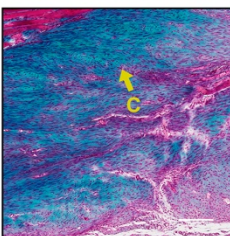
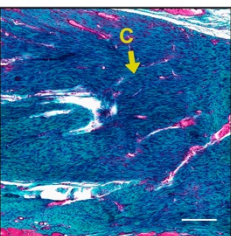
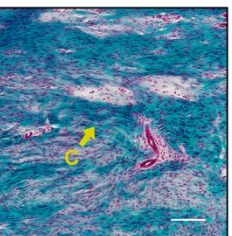
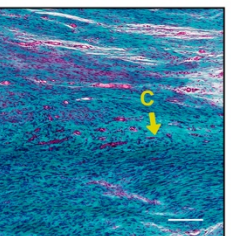
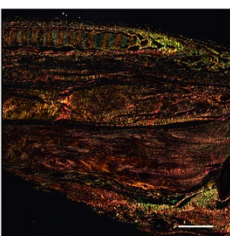
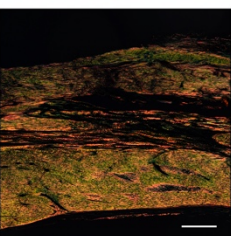
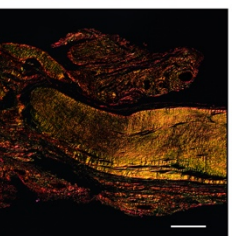
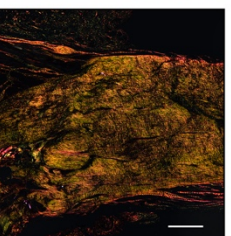
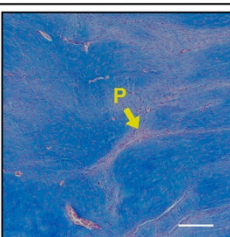
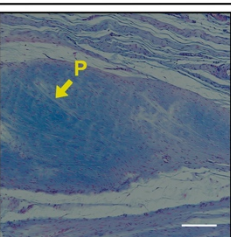
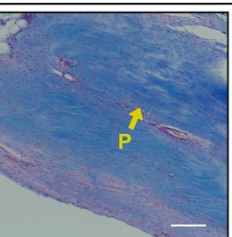
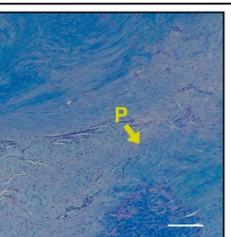
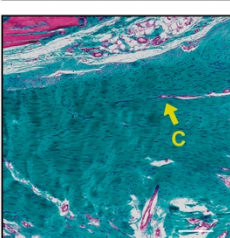
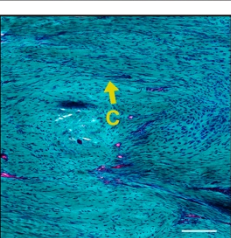
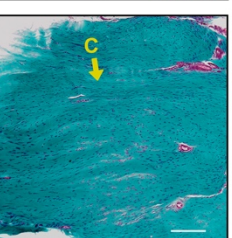
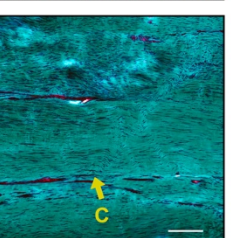
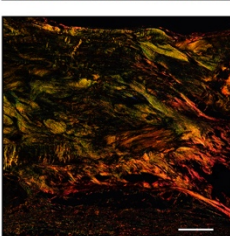
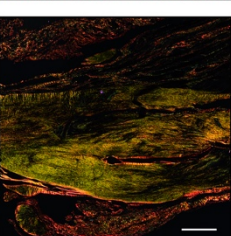
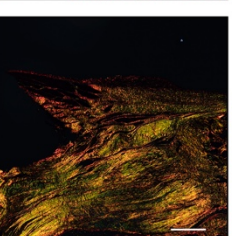
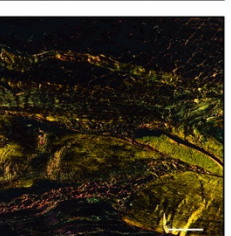
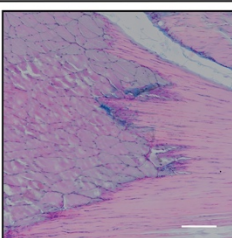
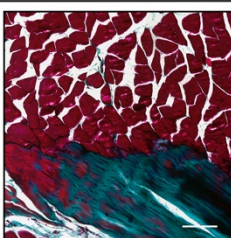
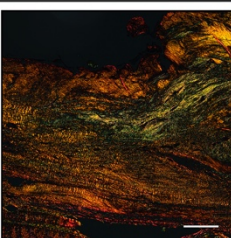
La evaluación histoquímica de los proteoglicanos ácidos llevada a cabo con la tinción azul de Alcian reveló un aumento importante de las moléculas ni fibrilares de la matriz extracelular durante el proceso de curación tendinosa sin diferencias entre las condiciones experimentales a las 4 semanas. Tras 8 semanas, es posible observar una disminución considerable de estos componentes en algunas áreas del tejido tendinoso, especialmente cuando se utiliza HNFA-GP en la reparación (Figura 23).

El análisis histoquímico del colágeno fibrilar mediante las tinciones de rojo picrosirio y tricrómico de Masson, confirmó la formación de colágeno durante la curación tendinosa en todos los grupos. Se puede observar una síntesis y una organización progresivas (microscopía con luz polarizada de la tinción de picrosirio) en todas las condiciones experimentales entre las 4 y las 8 semanas, especialmente con la utilización de HNFA-GP. Sin embargo, el nivel de organización del tendón nativo no se obtuvo en ninguna condición experimental analizada durante el periodo de estudio (Figura 23).

La identificación inmunohistoquímica del antígeno CD45 confirmó la presencia de leucocitos en baja cantidad y localizados, especialmente linfocitos, en los tendones reparados. En este sentido, las células linfoides se observaron en su mayoría en el tejido conectivo alrededor de los vasos sanguíneos y especialmente asociados al material de sutura. Estas células fueron menos abundantes en los grupos de HNFA y HNFA-GP que en el grupo de MatriDerm® y control respectivamente, estando estos resultados en consonancia con los análisis histológicos descritos con anterioridad (Figura 24).

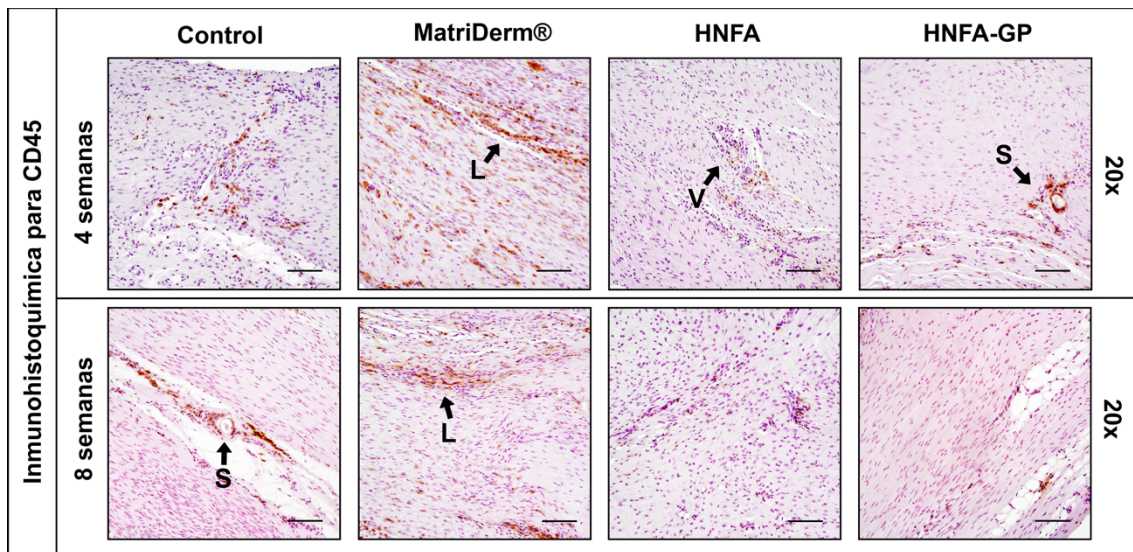


Tinción de azul de Alcian, tricrómico de Masson y rojo picrosirio

	Control	MatriDerm®	HNFA	HNFA-GP	
4 semanas					10x
					10x
					10x
					10x
					10x
					10x
Nativo				10x	



**Figura 23:** Tinción de azul de Alcian, tricrómico de Masson y rojo picosirio de los tendones explantados. La tinción de azul de Alcian mostró un incremento de las moléculas no fibrilares de la matriz extracelular y de los proteoglicanos (P) durante la regeneración tendinosa sin diferencias entre los distintos grupos. Se observa un descenso de estos componentes a las 8 semanas. La tinción de tricrómico de Masson y picosirius (microscopía polarizada) confirmó la formación de colágeno (C) en todas las condiciones experimentales con una mejor organización cuando se utilizan biomateriales, especialmente a las 8 semanas. Barra de escala = 200  $\mu$ m.

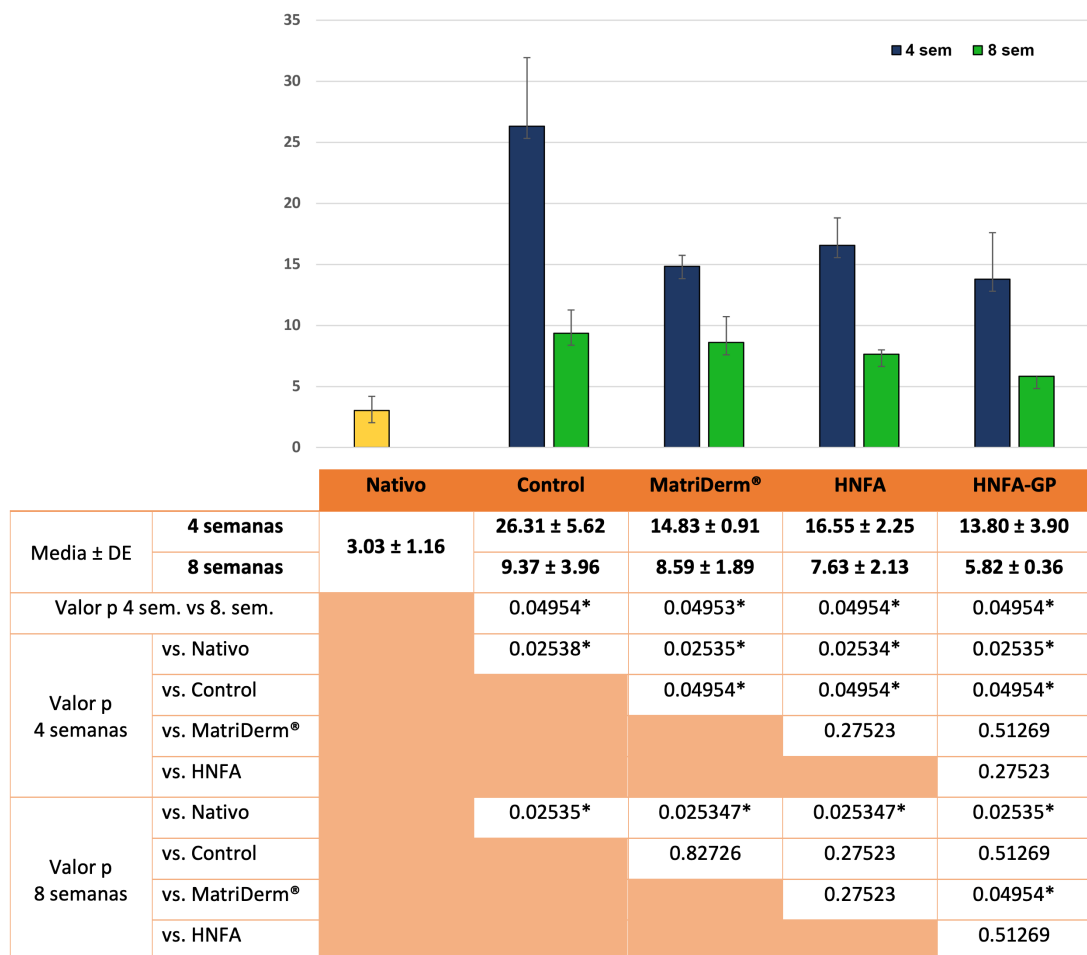


**Figura 24:** Inmunohistoquímica para antígeno CD45 en los tendones reparados. En rojizo, es posible observar la presencia y distribución tisular de algunos leucocitos (L), especialmente linfocitos que pueden encontrarse en el tejido conectivo vascular (V) y alrededor del material de sutura (S). Barra de escala = 200  $\mu$ m.

### 5.2.3.2. Resultados histológicos cuantitativos

El análisis cuantitativo histológico de la celularidad, llevado a cabo en las muestras con tinción de hematoxilina y eosina, confirmaron los hallazgos histológicos descritos, esto es, un aumento de la celularidad en los tendones intervenidos, a las 4 y 8 semanas, comparado con la condición nativa. El test de Kruskal-Wallis mostró diferencias marginalmente significativas a las 4 semanas ( $p=0.00822$ ) y 8 semanas ( $p=0.01897$ ) tras

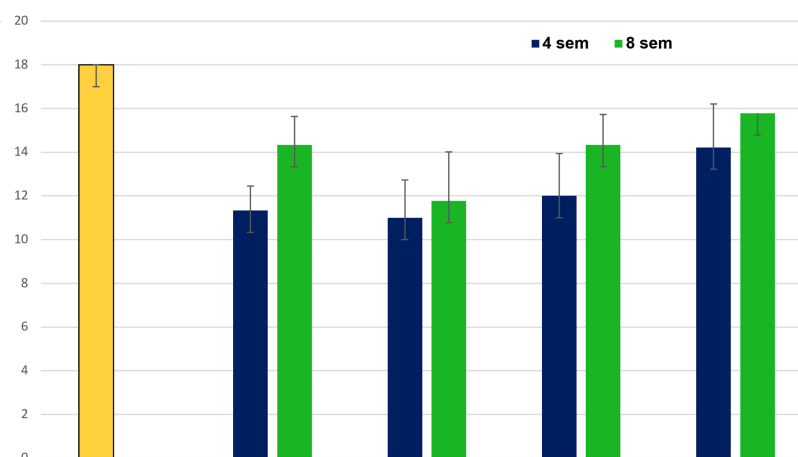
la reparación tendinosa. El incremento del contenido celular observado tras 4 semanas en todos los tendones reparados fue marginalmente significativo comparado con el grupo nativo. Además, se observó un descenso en la cantidad de células entre la cuarta y octava semana. En todos los tendones reparados, todas las diferencias fueron marginalmente significativas. El análisis llevado a cabo a las 4 semanas, mostró un mayor contenido celular en el grupo control ( $26.31 \pm 5.62$ ), seguido de los grupos HNFA ( $16.55 \pm 2.25$ ), MatriDerm® ( $14.83 \pm 0.91$ ) y HNFA-GP ( $13.80 \pm 3.80$ ), siendo todas estas diferencias marginalmente significativas. Los análisis realizados a las 8 semanas, revelaron que la celularidad fue comparable entre todas condiciones experimentales sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) excepto entre los grupos MatriDerm® ( $8.59 \pm 1.59$ ) y HNFA-GP ( $5.82 \pm 0.36$ ), donde las diferencias fueron marginalmente significativas (Tabla 10).





**Tabla 10:** Representación gráfica y numérica de la celularidad en los tendones nativos y reparados. Los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (DE) del porcentaje representado por el núcleo celular / área histológica (fracción de área). Se presentan los valores de  $p$  exactos para el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* indica diferencias marginalmente significativas. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas.

Los hallazgos histológicos e histoquímicos estuvieron en concordancia con los resultados obtenidos con el sistema de graduación histológico utilizado. De hecho, se obtuvieron diferencias marginalmente significativas a las 4 semanas ( $p=0.01495$ ) y estadísticamente significativas a las 8 semanas ( $p=0.00027$ ) con el test de Kruskal-Wallis. Además, este sistema de graduación utilizado mostró que ninguna de las condiciones experimentales, en los dos tiempos analizados, alcanzó la puntuación del tendón nativo ( $18 \pm 0$ ), siendo todas estas diferencias estadísticamente significativas. El análisis realizado a las 4 semanas mostró valores más altos en los grupos HNFA-GP ( $14.22 \pm 1.99$ ) y HNFA ( $12.00 \pm 1.94$ ), mientras que fueron más bajos los valores obtenidos en los grupos control ( $11.33 \pm 1.12$ ) y MatriDerm® ( $11.0 \pm 1.73$ ). Las diferencias entre el grupo HNFA-GP y el resto de condiciones experimentales fueron marginalmente significativas, y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el resto de condiciones experimentales. Aunque los valores obtenidos a las 8 semanas no alcanzaron los valores del tendón nativo, se observó un incremento de la puntuación en los grupos HNFA-GP ( $15.78 \pm 1.39$ ), HNFA ( $14.33 \pm 2.24$ ) y control ( $14.33 \pm 0.71$ ), pero no en el grupo MatriDerm® ( $11.78 \pm 1.30$ ), que continuaba con la puntuación más baja. Las diferencias a las 8 semanas fueron estadísticamente significativas entre los grupos HNFA-GP y MatriDerm® ( $p=0.00031$ ) y marginalmente significativas entre el grupo HNFA con MatriDerm® ( $p=0.01353$ ) y no significativas con HNFA-GP ( $p=0.13632$ ) (Tabla 11).



		Nativo	Control	MatriDerm®	HNFA	HNFA-GP
Media ± DE	4 semanas	18.00 ± 0.00	11.33 ± 1.12	11.00 ± 1.73	12.00 ± 1.94	14.22 ± 1.99
	8 semanas		14.33 ± 0.71	11.78 ± 1.30	14.33 ± 2.34	15.78 ± 1.39
Valor p 4 sem. vs 8. sem.			0.00023*	0.38798	0.05187	0.13611
Valor p 4 semanas	vs. Nativo		0.00009**	0.00012**	0.00013**	0.00012**
	vs. Control			0.85420	0.71368	0.00931*
	vs. MatriDerm®				0.24053	0.00844*
	vs. HNFA					0.02855*
Valor p 8 semanas	vs. Nativo		0.00011**	0.00012**	0.00012**	0.00047**
	vs. Control			0.00045**	0.30697	0.02454*
	vs. MatriDerm®				0.01353*	0.00031**
	vs. HNFA					0.13632

**Tabla 11:** Representación gráfica y numérica del sistema de graduación histológico en los tendones nativo y reparados. Los resultados se muestran como media ± desviación estándar (DE). Se presentan los valores de p exactos para el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* indica diferencias marginalmente significativas. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas.

## **6. Discusión**

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue caracterizar y evaluar a nivel preclínico la utilización de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa con y sin tratamiento químico con genipin en un modelo de lesión y reparación del tendón de Aquiles en ratas Wistar. Actualmente, las técnicas disponibles para la reparación quirúrgica del tendón dan resultados variables, y un tendón reparado no logra restablecer la estructura biomecánica y función de su estado sano o previo a la lesión. En este contexto, el uso de los hidrogeles desarrollados en el presente proyecto podría contribuir al proceso de regeneración disminuyendo la celularidad y respuesta inflamatoria, y mejorando la alineación y organización tisular durante el proceso de regeneración del tendón, lo cual podría suponer una mejora importante en el ámbito de la traumatología. A continuación, se discuten los resultados obtenidos de la caracterización *ex vivo* e *in vivo* de la presente Tesis Doctoral.

El ensayo biomecánico bajo esfuerzos de tracción de los biomateriales utilizados demostró su capacidad y propiedades biomecánicas que respaldan su uso y manipulación durante el acto quirúrgico de la reparación tendinosa. Sin embargo, estos análisis demostraron que los sustitutos generados no tienen las propiedades biomecánicas del tendón de Aquiles. Es importante mencionar que la composición molecular de la matriz tendinosa, así como su patrón altamente organizado sigue siendo un desafío de la Ingeniería Tisular, y, por esta razón, sigue siendo una activa área de investigación en este campo (González-Quevedo et al., 2018). A pesar de que los biomateriales generados no presentan propiedades biomecánicas comparables a un tendón nativo, éstos presentaron propiedades biomecánicas idóneas para ser utilizados como refuerzo externo de la reparación quirúrgica convencional de una transección tendinosa total.

En los últimos años, la Ingeniería Tisular surge como una solución potencial para una gran variedad de aplicaciones médicas (Alaminos et al., 2006; Carriel, Garzón, Jiménez, et al., 2011; H. Lui, Vaquette, & Bindra, 2017). En cirugía ortopédica y traumatología, la Ingeniería Tisular ha proporcionado algunas soluciones para estos especialistas como, por ejemplo, algunos sustitutos óseos, cartilaginosos, nerviosos y

tendinosos (Fernandez de Grado et al., 2018). En lo que respecta a la aplicación de la Ingeniería Tisular en la reparación de lesiones tendinosas, se ha descrito el uso de factores de crecimiento, diferentes fuentes de células madre y biomateriales naturales o sintéticos (Devana et al., 2018; González-Quevedo et al., 2018; Ho, Sawadkar, & Mudera, 2014; Wu, Nerlich, & Docheva, 2017). Además, las lesiones tendinosas puede también beneficiarse de la aplicación de la nanotecnología en esta especialidad (Sullivan, McHale, Parvizi, & Mehta, 2014). Más aún, en la revisión sistemática realizada por nuestro grupo de investigación acerca de los diferentes biomateriales utilizados para el tratamiento de lesiones tendinosas en el modelo animal, se demostró que el uso de diferentes estrategias de Ingeniería Tisular pueden acelerar el proceso de reparación biológica y llegar a producir un funcionamiento biomecánico de los tendones reparados que se asemeje al tendón nativo (González-Quevedo et al., 2018). Por otro lado, se detectó la heterogeneidad presente en el momento actual en este campo de investigación y la necesidad de continuar investigando distintas estrategias para conseguir una mejora significativa de los resultados obtenidos tras una reparación tendinosa.

El uso de hidrogeles en la reparación de lesiones tendinosas ha sido descrito previamente (Gonçalves, Rodrigues, & Gomes, 2017). Por ejemplo, un hidrogel inyectable, derivado del tejido tendinoso, ha sido utilizado en la reparación quirúrgica de rupturas tendinosas en un modelo animal. En este estudio, la utilización de dicho biomaterial resultó en una mejor organización de la matriz de colágeno y un mejor comportamiento biomecánico (Kim et al., 2014). En un estudio más reciente, se utilizó un hidrogel termosensible, el cual previno la aparición de adhesiones postoperatorias en un modelo experimental (Chou et al., 2017). Además de los resultados *in vivo*, existe evidencia de que los hidrogeles derivados del tejido tendinoso tienen propiedades biológicas que favorecen la función celular. En un estudio reciente, un hidrogel derivado del tendón fue suplementado con plasma rico en plaquetas, lo cual resultó en un incremento de la capacidad de migración *in vitro* de las células madres del tejido adiposo (Crowe et al., 2015).

En la presente Tesis Doctoral, hemos evaluado la idoneidad y propiedades terapéuticas de hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa, con y sin tratamiento con genipin, en un modelo de lesión y reparación tendinosa. EL uso biomédico del hidrogel de fibrina-agarosa está sustentado en los estudios *ex vivo*, *in vivo* y clínicos que se han desarrollado con este biomaterial, cuyos resultados han permitido su exitosa traslación clínica. Los estudios *in vivo* de los modelos de córnea (Alaminos et al., 2006), piel (Carriel, Garzón, Jiménez, et al., 2011), paladar (Liceras-Liceras et al., 2017) y/o nervio periférico (Chato-Astrain et al., 2018) han confirmado un alto grado de biocompatibilidad y propiedades regenerativas de los hidrogeles de fibrina-agarosa. En la presente Tesis Doctoral, los fibroblastos derivados del tendón cultivados sobre los hidrogeles generados mostraron una activa proliferación y adhesión celular, lo cual estaba asociado a una alta actividad metabólica. La cuantificación del ADN liberado al medio de cultivo, un signo de daño irreversible de las membranas celulares, fue prácticamente inexistente, confirmando la biocompatibilidad de estos biomateriales. Estos nuevos resultados se suman a los estudios previamente publicados por el grupo de investigación en los que estos hidrogeles apoyan la función y proliferación *ex vivo* de los fibroblastos (Bonhome-Espinosa et al., 2020; F. Campos et al., 2016; García-Martínez et al., 2016). Desde el punto de vista biomecánico, el crosslinking con genipin mejoró significativamente las propiedades biomecánicas del hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa, lo cual está en consonancia con estudios previos publicados (F. Campos et al., 2018; Sundararaghavan et al., 2008). Además, se ha demostrado que los valores de citocompatibilidad *ex vivo* son superiores a los resultados que se observan si los fibroblastos se cultivan en un hidrogel de fibrina-agarosa y crosslinking con glutaraldehído, lo que está en línea con lo que se ha publicado previamente (Alfredo Uquillas, Kishore, & Akkus, 2012). De hecho, el uso de concentraciones de genipin entre el 0.1 y 0.5% demostró un aumento de las propiedades biomecánicas de los hidrogeles con un aceptable grado de biocompatibilidad *in vitro*. En este sentido, la alta viabilidad y funcionalidad de los fibroblastos derivados del tendón observados en el hidrogel con genipin está en línea con los estudios publicados por el grupo de investigación. Los resultados globales del presente estudio demuestran que el hidrogel tratado

químicamente con genipin es comparable a las propiedades de citocompatibilidad del hidrogel de fibrina-agarosa convencional, del biomaterial comercial MatriDerm® y/o de otros biomateriales de similar composición o características. Por lo tanto, los ensayos biomecánicos y de biocompatibilidad *ex vivo* reafirman que el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa tratado con genipin podría ser una opción prometedora para conseguir un proceso de regeneración tendinosa y reparación funcional más eficiente (Fessel, Cadby, Wunderli, van Weeren, & Snedeker, 2014).

Se ha descrito con anterioridad, que la interrupción de la arquitectura tendinosa, debido a una lesión o una reparación, podría conducir a la invasión del tejido conectivo circundante y la formación de adhesiones con los tejidos vecinos. Esta complicación es frecuente en la cirugía reconstructiva del tendón, y explica la disminución de la función biomecánica, movilidad y resistencia del tendón en los meses posteriores a la cirugía (N. Maffulli et al., 2010). En este sentido, los resultados *in vivo* obtenidos en la presente Tesis Doctoral confirman que el uso de estos biomateriales, especialmente el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa tratado con genipin, ayuda a reducir, de forma eficiente, la infiltración de tejido conectivo circundante. Es probable que al cubrir la reparación tendinosa con estos biomateriales favoreciera la creación de un ambiente cerrado, por lo menos hasta la degradación del biomaterial y, de esta manera, contener la invasión estromal.

Además de lo anterior, y siendo crucial para la recuperación funcional del tendón reparado, el uso de biomateriales incrementó la regeneración y alineación tisular en un periodo de ocho semanas. Histológicamente, el análisis histoquímico de los componentes de la matriz extracelular reveló una síntesis y remodelación activa de fibras de colágeno y un incremento en los proteoglicanos ácidos. En relación al incremento en la distribución de proteoglicanos, en la totalidad de los tendones reparados, confirma que el proceso de regeneración tendinosa se encuentra en un estado inmaduro, lo cual coincide con el período de análisis. El incremento en la síntesis de proteoglicanos es un hecho importante, ya que estas moléculas son cruciales para la progresiva remodelación de la matriz de fibras de colágeno, tal y como ocurre en el

desarrollo y regeneración de otros tejidos y órganos (Godoy-Guzmán et al., 2018; Iozzo & Schaefer, 2015). Además de la función estructural atribuida a los proteoglicanos, éstos son fundamentales para mantener la hidratación y promover la difusión de sustancias, aspectos muy relevantes durante la regeneración. Normalmente, el incremento inicial de estas moléculas va seguido de una disminución de los mismos y un incremento de la matriz fibrilar (Carriel, Garzón, Jiménez, et al., 2011; Iozzo & Schaefer, 2015). Curiosamente, se observó una disminución del contenido de proteoglicanos tras utilizar hidrogeles de fibrina-agarosa con genipin en la reparación del tendón. Estos resultados sugieren que este biomaterial podría promover un proceso de regeneración tisular más rápida y eficiente y, además, el tejido resultó ser más organizado (alineado) y con una matriz colágena más madura y compacta. Otra posibilidad a este fenómeno es que los biomateriales tratados con genipin presentan una biodegradación más lenta y, por tanto, son más eficientes a la hora de contener la invasión del estroma circundante. Por último, nuestros resultados son comparables a los hallazgos obtenidos con el uso de constructos biomiméticos que resultaron en una densidad celular, una alineación fibrilar y unas propiedades biomecánicas comparables al tendón nativo (Chen et al., 2018).

Finalmente, nuestros resultados demuestran que el uso de hidrogeles de fibrina-agarosa y de fibrina-agarosa con genipin podrían ser una alternativa segura en la reparación quirúrgica de lesiones tendinosas. Estos biomateriales probablemente proporcionan un microentorno regenerativo cerrado y controlado con una tasa de biodegradación adecuada que favorece la regeneración tisular intrínseca. Asimismo, sólo se produjo una leve respuesta inflamatoria leve, local y transitoria que se pudo observar gracias al análisis histológico e inmunohistoquímico (células CD45 positivas). No obstante, no se observó una reacción a cuerpo extraño a los biomateriales implantados. Esta leve reacción inflamatoria se observó en todos los animales intervenido, siendo menos abundante en los tendones reparados con biomateriales, especialmente con los hidrogeles generados en este estudio. Estos resultados histológicos confirman la alta biocompatibilidad y adecuada biodegradabilidad *in vivo* de los hidrogeles nanoestructurados de fibrina-agarosa y de fibrina-agarosa con genipin en la reparación tendinosa encontrándose en línea con la respuesta tisular del huésped



observada con el uso de este biomaterial en la reparación de la esclerótica y del nervio periférico (Carriel et al., 2019; Chato-Astrain et al., 2018).

A pesar de los últimos avances en la investigación de la Ingeniería Tisular y la terapia tendinosa, el tratamiento óptimo de una ruptura tendinosa continúa siendo controvertido y es necesaria una alternativa eficiente para estos pacientes (Yang et al., 2018). La investigación actual sugiere que los biomateriales pueden tener un papel crucial en la reparación quirúrgica de tendones lesionados (Malagelada, Clark, & Dega, 2016). Sin embargo, estas estrategias se encuentran en una etapa inicial de desarrollo e implementación, y se debe considerar que la respuesta a este tratamiento difiere de manera significativa entre las especies, dificultando la extrapolación de los resultados experimentales en modelos animales al ser humano (de Albornoz, Aicale, Forriol, & Maffulli, 2018; González-Quevedo et al., 2018).

Tras la biografía consultada, este es el primer estudio que informa sobre el valor potencial de los hidrogeles basados en fibrina-agarosa como soporte en la reparación quirúrgica de lesiones tendinosas. Además, la biocompatibilidad de estos hidrogeles se evaluó tanto *ex vivo* como *in vivo*. Esta estrategia ofrece la posibilidad de crear biomateriales autólogos y personalizados para la reparación tendinosa mediante el uso de un biomaterial aprobado para uso clínico en humanos por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). Estos hidrogeles pueden obtenerse de manera muy sencilla a partir de un pequeño volumen de sangre del paciente y suplementarlo con una muy baja concentración de agarosa (0.1%) previo a la intervención, siendo ésta una clara ventaja si se compara con los constructos basados en polímeros sintéticos y dispositivos comerciales, generalmente de origen xenogénico, usados comúnmente en la medicina regenerativa.

Por otro lado, el presente estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, el periodo de observación fue relativamente corto obteniéndose una regeneración parcial del tendón, siendo estos resultados confirmados por el sistema de graduación histológico. En este sentido, son necesarios futuros estudios para determinar el tiempo necesario para obtener una regeneración completa utilizando estos biomateriales. En

segundo lugar, otra limitación del estudio es el número de animales utilizados. De hecho, se obtendría una mayor significación estadística con un mayor tamaño de muestra. Asimismo, en cuanto a la especie utilizada en el estudio, la anatomía, propiedades regenerativas y biomecánica de los tendones de las ratas no son comparables a las del humano, siendo por tanto necesario la experimentación con especies más de mayor tamaño. Finalmente, es necesario desarrollar más investigación en este campo con el objetivo de elucidar los procesos celulares y moleculares que tienen lugar durante la regeneración del tendón tras la utilización de biomateriales, los cuales aportarán información de utilidad para la futura traslación clínica de las estrategias desarrolladas en la presente Tesis Doctoral.

## **7. Conclusiones**

1. La revisión sistemática y meta-análisis realizada en la presente tesis doctoral demostró la heterogeneidad existente en el momento actual en las estrategias de Ingeniería Tisular aplicables al tejido tendinoso. La investigación demostró, asimismo, que la utilización de las técnicas de Ingeniería Tisular ha contribuido a acelerar el proceso de reparación biológica y a generar una respuesta biomecánica comparable a la existente en los tendones nativos.
2. La metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral ha permitido generar dos biomateriales con utilidad potencial en la reparación tendinosa: el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa y el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa con genipin. Dichos biomateriales, generados a partir de protocolos desarrollados y patentados por el Grupo de Ingeniería Tisular de Granada, han demostrado previamente su alta biocompatibilidad y su potencial uso clínico en distintos tejidos y órganos como córnea, piel, mucosa oral, mucosa de la vejiga urinaria, nervio periférico, cartílago, esclera y tejido óseo.
3. Los resultados de los estudios *ex vivo* realizados en la presente tesis doctoral ponen de relieve, en relación con los ensayos de tracción, la capacidad de deformación y resistencia de ambos biomateriales para su utilización en la reparación tendinosa observándose un incremento de las propiedades biomecánicas en el biomaterial de fibrina-agarosa nanoestructurado sometido a la acción de genipin. Los resultados de los ensayos de biocompatibilidad *ex vivo* ponen, asimismo, de relieve la supervivencia y la alta actividad metabólica de los fibroblastos derivados del tendón cultivados sobre ambos biomateriales lo que implica una alta compatibilidad con el tejido tendinoso observándose una menor citotoxicidad en el biomaterial de fibrina-agarosa nanoestructurado no sometido a la acción del genipin. Los ensayos bajo esfuerzos de tracción *ex vivo* realizados sobre los biomateriales generados, demostraron su capacidad de deformación y resistencia para ser utilizados en la reparación tendinosa. Asimismo, el crosslinking con genipin del biomaterial resultó en un incremento de las propiedades biomecánicas.

4. Los resultados clínico-quirúrgicos derivados de la utilización de ambos biomateriales ponen de relieve la fácil adaptabilidad de los mismos a la morfología tendinosa y una manipulación quirúrgica similar a la existente con el modelo comercial de colágena. Los resultados ponen de relieve, asimismo, que la utilización de ambos biomateriales no modifica el patrón de marcha o la sensibilidad distal al sitio de reparación, no retrasa el proceso de cicatrización de la herida quirúrgica a pesar de su íntima relación con los biomateriales, ni incrementa el consumo analgésico por parte de los animales de experimentación. El análisis macroscópico de los tendones explantados mostró la total integración de los dos biomateriales de fibrina-agarosa utilizados sin signo macroscópico alguno de necrosis tisular, re-ruptura, deformación o inflamación grave.
5. Los resultados histológicos *in vivo* ponen de relieve que ambos biomateriales contribuyen significativamente al proceso de regeneración tisular del tendón con una disminución progresiva de la celularidad y de los proteoglicanos de la matriz y con una síntesis progresiva de matriz extracelular colágena que presenta un patrón fibrilar poco organizado, en las primeras cuatro semanas; y evoluciona hasta presentar un patrón fibrilar organizado y alineado con orientación hacia el eje de carga, ocho semanas después de la intervención. La disminución significativa de los proteoglicanos con los biomateriales sometidos a la acción del genipin se vincula a una mayor aceleración del proceso regenerativo tisular; y la baja presencia de linfocitos a la elevada biocompatibilidad de los biomateriales de fibrina-agarosa con los tejidos tendinosos. La utilización de ambos biomateriales no generó reacción de cuerpo extraño, infiltrados inflamatorios crónicos, ni necrosis en el periodo de ocho semanas de evaluación del estudio experimental.

6. Los resultados del análisis cuantitativo del sistema de evaluación histológica desarrollados en la presente Tesis Doctoral, en relación con la reparación tendinosa, ponen de relieve que los biomateriales utilizados, el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa y el hidrogel nanoestructurado de fibrina-agarosa tratado con genipin, muestran valores cercanos al tendón nativo y muy superiores a los que se obtienen con la reparación quirúrgica tradicional; lo que convierte a dichos biomateriales en producto de Ingeniería Tisular, biocompatibles y mecánicamente biomiméticos, susceptibles de traslación a la clínica previa aprobación como medicamentos de terapia avanzada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

## **8. Bibliografía**

- Abrahamsson, S.-O., & Lohmander, S. (1996). Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, *14*, 370-376.
- Abrahamsson, S.-O., Lundborg, G., & Lohmander, L. S. (1991). Long-term explant culture of rabbit flexor tendon: Effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *Journal of Orthopaedic Research*, *9*, 503-515.
- Ackermann, P. W., Domeij-Arverud, E., Leclerc, P., Amoudrouz, P., & Nader, G. A. (2013). Anti-inflammatory cytokine profile in early human tendon repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *21*, 1801-1806.
- Alaminos, M., Sa´nchez-Quevedo, M. D. C., Mun˜oz-A´vila, J. I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., & Campos, A. (2006). Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*, 3311.
- Alfredo Uquillas, J., Kishore, V., & Akkus, O. (2012). Genipin crosslinking elevates the strength of electrochemically aligned collagen to the level of tendons. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *15*, 176-189.
- Alfredson, H., & Lorentzon, R. (2002). Chronic Tendon Pain: No Signs of Chemical Inflammation but High Concentrations of the Neurotransmitter Glutamate. Implications for Treatment? *Current Drug Targets*, *3*. <https://doi.org/10.2174/1389450023348028>
- Angeles, J. G., Heminger, H., & Mass, D. P. (2002). Comparative biomechanical performances of 4-strand core suture repairs for zone II flexor tendon lacerations. *The Journal of Hand Surgery*, *27*, 508-517.
- Antonescu, C. (2013). Clear cell sarcoma of soft tissue. En *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (4.<sup>a</sup> ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Aslan, H., Kimelman-Bleich, N., Pelled, G., & Gazit, D. (2008). Molecular targets for tendon neof ormation. *Journal of Clinical Investigation*, *118*, 439-444.



- Åstroöm, M., & Westlin, N. (1994). Blood flow in the human achilles tendon assessed by laser doppler flowmetry: BLOOD FLOW IN THE HUMAN ACHILLES TENDON. *Journal of Orthopaedic Research*, 12, 246-252.
- Battaglia, T. C., Clark, R. T., Chhabra, A., Gaschen, V., Hunziker, E. B., & Mikic, B. (2003). Ultrastructural Determinants of Murine Achilles Tendon Strength During Healing. *Connective Tissue Research*, 44, 218-224.
- Beach, Z. M., Gittings, D. J., & Soslowsky, L. J. (2017). Tendon Biomechanics. En G. L. Canata, P. d'Hooghe, & K. J. Hunt (Eds.), *Muscle and Tendon Injuries* (pp. 15-22). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Beason, D. P., Hsu, J. E., Marshall, S. M., McDaniel, A. L., Temel, R. E., Abboud, J. A., & Soslowsky, L. J. (2013). Hypercholesterolemia increases supraspinatus tendon stiffness and elastic modulus across multiple species. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 22, 681-686.
- Bedi, A., Kovacevic, D., Hettrich, C., Gulotta, L. V., Ehteshami, J. R., Warren, R. F., & Rodeo, S. A. (2010). The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 19, 384-391.
- Benazzo, F., Zanon, G., & Maffulli, N. (2000). An Operative Approach to Achilles Tendinopathy. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 8.
- Benjamin, M., Qin, S., & Ralphs, J. R. (1995). *Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys*. 9.
- Bernard-Beaubois, K., Hecquet, C., Hayem, G., Rat, P., & Adolphe, M. (1998). In vitro study of cytotoxicity of quinolones on rabbit tenocytes. *Cell Biology and Toxicology*, 14, 10.
- Bi, Y., Ehirchiou, D., Kilts, T. M., Inkson, C. A., Embree, M. C., Sonoyama, W., ... Young, M. F. (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine*, 13, 1219-1227.
- Birch, H. L., Peffers, M. J., & Clegg, P. D. (2016). Influence of Ageing on Tendon Homeostasis. En Paul W. Ackermann & D. A. Hart (Eds.), *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders* (pp. 247-260). Cham: Springer International Publishing.

- Birch, H. L., Wilson, A. M., & Goodship, A. E. (1997). The effect of exercise-induced localised hyperthermia on tendon cell survival. *The Journal of Experimental Biology*, 200, 1703-1708.
- Bisset, L., Beller, E., Jull, G., Brooks, P., Darnell, R., & Vicenzino, B. (2006). Mobilisation with movement and exercise, corticosteroid injection, or wait and see for tennis elbow: Randomised trial. *BMJ*, 333, 939.
- Bonhome-Espinosa, A. B., Campos, F., Durand-Herrera, D., Sánchez-López, J. D., Schaub, S., Durán, J. D. G., ... Carriel, V. (2020). In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 104, 103619.
- Buschmann, J. (2018). Tissue Engineering of Tendons. En H. A. hay E.-S. Kaoud (Ed.), *Tissue Regeneration*. InTech.
- Buschmann, J., & Meier Bürgisser, G. (2017a). Role of cellular response in the healing process of tendons and ligaments. En *Biomechanics of Tendons and Ligaments* (pp. 301-317). Elsevier.
- Buschmann, J., & Meier Bürgisser, G. (2017b). Structure and function of tendon and ligament tissues. En *Biomechanics of Tendons and Ligaments* (pp. 3-29). Elsevier.
- Buschmann, J., Meier-Bürgisser, G., Bonavoglia, E., Neuenschwander, P., Milleret, V., Giovanoli, P., & Calcagni, M. (2013). Cellular response of healing tissue to DegraPol tube implantation in rabbit Achilles tendon rupture repair: An *in vivo* histomorphometric study: DegraPol tube implantation for tendon rupture repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, 413-420.
- Campos, A. (2004). *Cuerpo, histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular*. Presentado en Discurso para la recepción pública del Académico Electo, Real Academia Nacional de Medicina de España.
- Campos, F., Bonhome-Espinosa, A. B., García-Martínez, L., Durán, J. D. G., López-López, M. T., Alaminos, M., ... Carriel, V. (2016). *Ex vivo* characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomedical Materials*, 11, 055004.

- Campos, F., Bonhome-Espinosa, A. B., Vizcaino, G., Rodriguez, I. A., Duran-Herrera, D., López-López, M. T., ... Carriel, V. (2018). Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomedical Materials*, *13*, 025021.
- Carriel, V., Alaminos, M., Garzón, I., Campos, A., & Cornelissen, M. (2014). Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *14*, 301-318.
- Carriel, V., Garrido-Gómez, J., Hernández-Cortés, P., Garzón, I., García-García, S., Sáez-Moreno, J. A., ... Alaminos, M. (2013). Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*, *10*, 026022.
- Carriel, V., Garzón, I., Alaminos, M., & Campos, A. (2011). Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochemistry and Cell Biology*, *136*, 709-717.
- Carriel, V., Garzón, I., Campos, A., Cornelissen, M., & Alaminos, M. (2017). Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits: GAP-43 and neurofilament during nerve regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *11*, 553-563.
- Carriel, V., Garzón, I., Jiménez, J.-M., Oliveira, C.-X., Arias-Santiago, S., Campos, A., ... Alaminos, M. (2011). Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials. *Cells Tissues Organs*. <https://doi.org/10.1159/000330682>
- Carriel, V., Scionti, G., Campos, F., Roda, O., Castro, B., Cornelissen, M., ... Alaminos, M. (2017). *In vitro* characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute: Nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *11*, 1412-1426.

- Carriel, V., Vizcaíno-López, G., Chato-Astrain, J., Durand-Herrera, D., Alaminos, M., Campos, A., ... Campos, F. (2019). Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Experimental Eye Research*, *186*, 107717.
- Chang, J., Most, D., Thunder, R., Mehrara, B., Longaker, M. T., & Lineaweaver, W. C. (1998). Molecular studies in flexor tendon wound healing: The role of basic fibroblast growth factor gene expression. *The Journal of Hand Surgery*, *23*, 1052-1058.
- Chato-Astrain, J., Campos, F., Roda, O., Miralles, E., Durand-Herrera, D., Sáez-Moreno, J. A., ... Carriel, V. (2018). In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 501.
- Chen, E., Yang, L., Ye, C., Zhang, W., Ran, J., Xue, D., ... Hu, Q. (2018). An asymmetric chitosan scaffold for tendon tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation with rat tendon stem/progenitor cells. *Acta Biomaterialia*, *73*, 377-387.
- Chou, P.-Y., Chen, S.-H., Chen, C.-H., Chen, S.-H., Fong, Y. T., & Chen, J.-P. (2017). Thermo-responsive in-situ forming hydrogels as barriers to prevent post-operative peritendinous adhesion. *Acta Biomaterialia*, *63*, 85-95.
- Connizzo, B. K., Bhatt, P. R., Liechty, K. W., & Soslowky, L. J. (2014). Diabetes Alters Mechanical Properties and Collagen Fiber Re-Alignment in Multiple Mouse Tendons. *Annals of Biomedical Engineering*, *42*, 1880-1888.
- Cooper, M. T. (2015). Acute Achilles Tendon Ruptures. *Clinics in Sports Medicine*, *34*, 595-606.
- Crowe, C. S., Chiou, G., McGoldrick, R., Hui, K., Pham, H., & Chang, J. (2015). Tendon Regeneration with a Novel Tendon Hydrogel: In Vitro Effects of Platelet-Rich Plasma on Rat Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *135*, 981e-989e.

- Dakin, S. G., Newton, J., Martinez, F. O., Hedley, R., Gwilym, S., Jones, N., ... Carr, A. J. (2017). Chronic inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. *British Journal of Sports Medicine*, bjsports-2017-098161.
- Dawe, E. J. C., & Davis, J. (2011). (Vi) Anatomy and biomechanics of the foot and ankle. *Orthopaedics and Trauma*, 25, 279-286.
- de Albornoz, P. M., Aicale, R., Forriol, F., & Maffulli, N. (2018). Cell Therapies in Tendon, Ligament, and Musculoskeletal System Repair: *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 26, 48-58.
- de Mos, M., Koevoet, W. J., Jahr, H., Versteegen, M. M., Heijboer, M. P., Kops, N., ... van Osch, G. J. (2007). Intrinsic differentiation potential of adolescent human tendon tissue: An in-vitro cell differentiation study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8, 16.
- de Saint Aubain Somerhausen, N., & van de Rijn, M. (2013a). Tenosynovial giant cell tumour, diffuse type. En *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (4.<sup>a</sup> ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- de Saint Aubain Somerhausen, N., & van de Rijn, M. (2013b). Tenosynovial giant cell tumour, localized type. En *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (4.<sup>a</sup> ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Dederer, K. M., & Tennant, J. N. (2019). Anatomical and Functional Considerations in Achilles Tendon Lesions. *Foot and Ankle Clinics*, 24, 371-385.
- Devana, S. K., Kelley, B. V., McBride, O. J., Kabir, N., Jensen, A. R., Park, S. J., ... SooHoo, N. F. (2018). Adipose-derived Human Perivascular Stem Cells May Improve Achilles Tendon Healing in Rats: *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 476, 2091-2100.
- Dogramaci, Y., Kalaci, A., Sevinç, T. T., Yanat, A. N., Esen, E., & Komurcu, M. (2008). Does Strand Configuration and Number of Purchase Points Affect the Biomechanical Behavior of a Tendon Repair? A Biomechanical Evaluation Using Different Kessler Methods of Flexor Tendon Repair. *HAND*, 3, 266-270.

- Doral, M. N., Alam, M., Bozkurt, M., Turhan, E., Atay, O. A., Dönmez, G., & Maffulli, N. (2010). Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 18*, 638-643.
- Ehrlich, H. P., Lambert, P. A., Siggers, G. C., Myers, R. L., & Hauck, R. M. (2005). Dynamic Changes Appearing in Collagen Fibers During Intrinsic Tendon Repair: *Annals of Plastic Surgery, 54*, 201-206.
- Elliot, D., & Giesen, T. (2013). Primary Flexor Tendon Surgery. *Hand Clinics, 29*, 191-206.
- Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A.-M., Benkirane-Jessel, N., ... Offner, D. (2018). Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering, 9*, 204173141877681.
- Fessel, G., Cadby, J., Wunderli, S., van Weeren, R., & Snedeker, J. G. (2014). Dose- and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics – Toward clinical application for tendon repair. *Acta Biomaterialia, 10*, 1897-1906.
- Forslund, C. (2002). BMP treatment for improving tendon repair. *Acta Orthopaedica Scandinavica, 74*, 1-30.
- Forslund, C., Bylander, B., & Aspenberg, P. (2003). Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica, 74*, 465-469.
- Fredberg, U., & Bolvig, L. (2002). Significance of Ultrasonographically Detected Asymptomatic Tendinosis in the Patellar and Achilles Tendons of Elite Soccer Players: A Longitudinal Study. *The American Journal of Sports Medicine, 30*, 488-491.
- Freedman, B. R., Gordon, J. A., & Soslowky, L. J. (2014). The Achilles tendon: Fundamental properties and mechanisms governing healing. *Muscle Ligaments and Tendons Journal, 11*.
- Freedman, B. R., Sarver, J. J., Buckley, M. R., Voleti, P. B., & Soslowky, L. J. (2014). Biomechanical and structural response of healing Achilles tendon to fatigue loading following acute injury. *Journal of Biomechanics, 47*, 2028-2034.

- Fukashiro, S., Komi, P. V., Järvinen, M., & Miyashita, M. (1995). In vivo achilles tendon loading' during jumping in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 71, 453-458.
- García-Martínez, L., Campos, F., Godoy-Guzmán, C., del Carmen Sánchez-Quevedo, M., Garzón, I., Alaminos, M., ... Carriel, V. (2016). Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1485-9>
- Garzón, I., Miyake, J., González-Andrades, M., Carmona, R., Carda, C., Sánchez-Quevedo, M. del C., ... Alaminos, M. (2013). Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2, 625-632.
- Garzón, I., Pérez-Köhler, B., Garrido-Gómez, J., Carriel, V., Nieto-Aguilar, R., Martín-Piedra, M. A., ... Alaminos, M. (2012). Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18, 408-419.
- Gelberman, R. H., Boyer, M. I., Brodt, M. D., Winters, S. C., & Silva, M. J. (1999). The Effect of Gap Formation at the Repair Site on the Strength and Excursion of Intrasynovial Flexor Tendons. AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE EARLY STAGES OF TENDON-HEALING IN DOGS\*: *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 81, 975-982.
- Godoy-Guzmán, C., Nuñez, C., Orihuela, P., Campos, A., & Carriel, V. (2018). Distribution of extracellular matrix molecules in human uterine tubes during the menstrual cycle: A histological and immunohistochemical analysis. *Journal of Anatomy*, 233, 73-85.
- Gonçalves, A. I., Rodrigues, M. T., & Gomes, M. E. (2017). Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration. *Acta Biomaterialia*, 63, 110-122.

- González-Quevedo, D., Martínez-Medina, I., Campos, A., Campos, F., & Carriel, V. (2018). Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries: A systematic review and meta-analysis of animal models. *Bone & Joint Research*, 7, 318-324.
- Gotoh, M., Hamada, K., Yamakawa, H., Inoue, A., & Fukuda, H. (1998). Increased substance P in subacromial bursa and shoulder pain in rotator cuff diseases. *Journal of Orthopaedic Research*, 16, 618-621.
- Hansen, M., & Kjaer, M. (2016). Sex Hormones and Tendon. En Paul W. Ackermann & D. A. Hart (Eds.), *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders* (pp. 139-149). Cham: Springer International Publishing.
- Hast, M. W., Zuskov, A., & Soslowky, L. J. (2014). The role of animal models in tendon research. *Bone and Joint Research*, 3, 193-202.
- Ho, J. O., Sawadkar, P., & Mudera, V. (2014). A review on the use of cell therapy in the treatment of tendon disease and injuries. *Journal of Tissue Engineering*, 5, 204173141454967.
- Hoffmann, A. (2006). Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 940-952.
- Hogan, M. V., Bagayoko, N., James, R., Starnes, T., Katz, A., & Chhabra, B. A. (2011). Tissue engineering solutions for tendon repair. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 19, 134–142.
- Holm, C., Kjaer, M., & Eliasson, P. (2015). Achilles tendon rupture - treatment and complications: A systematic review: Treatment of Achilles tendon ruptures. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25, e1-e10.
- Ingraham, J. M., Weber, R. A., & Childs, E. W. (2011). Intrinsic tendon healing requires the recycling of tendon collagen fibril segments. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 36, 154-155.
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11-55.



- James, R., Kesturu, G., Balian, G., & Chhabra, A. B. (2008). Tendon: Biology, Biomechanics, Repair, Growth Factors, and Evolving Treatment Options. *The Journal of Hand Surgery*, *33*, 102-112.
- Jarvinen, T. A. H. (2003). Mechanical loading regulates the expression of tenascin-C in the myotendinous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in the skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, *116*, 857-866.
- Józsa, L., & Kannus, P. (2007). Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *7*, 113-118.
- Józsa, L., & Renner, A. (1991). Tumors and tumor-like lesions arising in tendons: A clinicopathological study of 75 cases. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, *110*, 83-86.
- Józsa, L., Lehto, M., Kvist, M., Bálint, J. B., & Reffy, A. (1989). Alterations in Dry Mass Content of Collagen Fibers in Degenerative Tendinopathy and Tendon-Rupture. *Matrix*, *9*, 140-146.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2015). *Histología básica. Texto y atlas*. (12). Editorial Médica Panamericana.
- Kadakia, A. R., Dekker, R. G., & Ho, B. S. (2017). Acute Achilles Tendon Ruptures: An Update on Treatment. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *25*, 23-31.
- Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, *10*, 312-320.
- Kashiwagi, K., Mochizuki, Y., Yasunaga, Y., Ishida, O., Deie, M., & Ochi, M. (2004). Effects of transforming growth factor- $\beta$  1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, *38*, 193-197.
- Ker, R. F. (2002). The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *133*, 987-1000.

- Kerbl, M., Heher, P., Ferguson, J., & Redl, H. (2016). Fibrin. En N. M. Neves & R. L. Reis (Eds.), *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* (pp. 159-175). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Khan, K. M., Cook, J. L., Bonar, F., Harcourt, P., & Åstrom, M. (1999). Histopathology of Common Tendinopathies: Update and Implications for Clinical Management. *Sports Medicine*, 27, 393-408.
- Killat, J., Reimers, K., Choi, C., Jahn, S., Vogt, P., & Radtke, C. (2013). Cultivation of Keratinocytes and Fibroblasts in a Three-Dimensional Bovine Collagen-Elastin Matrix (Matriderm®) and Application for Full Thickness Wound Coverage in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 14460-14474.
- Kim, M. Y., Farnebo, S., Woon, C. Y. L., Schmitt, T., Pham, H., & Chang, J. (2014). Augmentation of Tendon Healing with an Injectable Tendon Hydrogel in a Rat Achilles Tendon Model: *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133, 645e-653e.
- Klein, M. B., Yalamanchi, N., Pham, H., Longaker, M. T., & Chan, J. (2002). Flexor tendon healing in vitro: Effects of TGF- $\beta$  on tendon cell collagen production. *The Journal of Hand Surgery*, 27, 615-620.
- Kurtz, C. A., Loebig, T. G., Anderson, D. D., DeMeo, P. J., & Campbell, P. G. (1999). Insulin-Like Growth Factor I Accelerates Functional Recovery from Achilles Tendon Injury in a Rat Model. *The American Journal of Sports Medicine*, 27, 363-369.
- Lantto, I., Heikkinen, J., Flinkkilä, T., Ohtonen, P., & Leppilahti, J. (2015). Epidemiology of Achilles tendon ruptures: Increasing incidence over a 33-year period: Clinical relevance level IV. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25, e133-e138.
- Lavagnino, M., Arnoczky, S. P., Egerbacher, M., Gardner, K. L., & Burns, M. E. (2006). Isolated fibrillar damage in tendons stimulates local collagenase mRNA expression and protein synthesis. *Journal of Biomechanics*, 39, 2355-2362.

- Lavagnino, M., Wall, M. E., Little, D., Banes, A. J., Guilak, F., & Arnoczky, S. P. (2015). Tendon mechanobiology: *Current knowledge and future research opportunities: TENDON MECHANOBIOLOGY*. *Journal of Orthopaedic Research*, 33, 813-822.
- Lemme, N. J., Li, N. Y., DeFroda, S. F., Kleiner, J., & Owens, B. D. (2018). Epidemiology of Achilles Tendon Ruptures in the United States: Athletic and Nonathletic Injuries From 2012 to 2016. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 6, 232596711880823.
- Liceras-Liceras, E., Garzón, I., España-López, A., Oliveira, A.-C.-X., García-Gómez, M., Martín-Piedra, M.-Á., ... Fernández-Valadés, R. (2017). Generation of a bioengineered autologous bone substitute for palate repair: An *in vivo* study in laboratory animals: Autologous bone substitute for cleft palate repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 1907-1914.
- Lichtwark, G. A. (2005). In vivo mechanical properties of the human Achilles tendon during one-legged hopping. *Journal of Experimental Biology*, 208, 4715-4725.
- Lipman, K., Wang, C., Ting, K., Soo, C., & Zheng, Z. (2018). Tendinopathy: Injury, repair, and current exploration. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 591-603.
- Lohrer, H., David, S., & Nauck, T. (2016). Surgical treatment for achilles tendinopathy – a systematic review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17, 207.
- Loiselle, A. E., Bragdon, G. A., Jacobson, J. A., Hasslund, S., Cortes, Z. E., Schwarz, E. M., ... O'Keefe, R. J. (2009). Remodeling of murine intrasynovial tendon adhesions following injury: MMP and neotendon gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*, 27, 833-840.
- Lui, H., Vaquette, C., & Bindra, R. (2017). Tissue Engineering in Hand Surgery: A Technology Update. *The Journal of Hand Surgery*, 42, 727-735.

- Lui, P. P. Y., Wong, O. T., & Lee, Y. W. (2016). Transplantation of tendon-derived stem cells pre-treated with connective tissue growth factor and ascorbic acid in vitro promoted better tendon repair in a patellar tendon window injury rat model. *Cytotherapy*, *18*, 99-112.
- Maddox, B. K., Mokashi, A., Keene, D. R., & Bächinger, H. P. (2000). A Cartilage Oligomeric Matrix Protein Mutation Associated with Pseudoachondroplasia Changes the Structural and Functional Properties of the Type 3 Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *275*, 11412-11417.
- Maeda, T., Sakabe, T., Sunaga, A., Sakai, K., Rivera, A. L., Keene, D. R., ... Sakai, T. (2011). Conversion of Mechanical Force into TGF- $\beta$ -Mediated Biochemical Signals. *Current Biology*, *21*, 933-941.
- Maffulli, N., Longo, U. G., Sharma, P., & Denaro, V. (2010). Tendon injury and repair mechanics. En *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues* (pp. 394-418). Elsevier.
- Maffulli, Nicola, & Wong, J. (2003). Rupture of the Achilles and patellar tendons. *Clinics in Sports Medicine*, *22*, 761-776.
- Maganaris, C. N. (2002). Tensile properties of in vivo human tendinous tissue. *Journal of Biomechanics*, *35*, 1019-1027.
- Magra, M. (2005). Matrix metalloproteases: A role in overuse tendinopathies. *British Journal of Sports Medicine*, *39*, 789-791.
- Majima, T., Irie, T., Sawaguchi, N., Funakoshi, T., Iwasaki, N., Harada, K., ... Nishimura, S.-I. (2007). Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *221*, 537-546.
- Malagelada, F., Clark, C., & Dega, R. (2016). Management of chronic Achilles tendon ruptures—A review. *The Foot*, *28*, 54-60.
- Martín Andrés, A., & Luna del Castillo, J. de D. (2013). *40  $\pm$  10 horas de bioestadística*. Capitel Ediciones.

- Martin-Piedra, M. A., Garzon, I., Oliveira, A. C., Alfonso-Rodriguez, C. A., Carriel, V., Scionti, G., & Alaminos, M. (2014). Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*, *16*, 266-277.
- Mills, S. E. (2019). *Histology for Pathologists* (5.<sup>a</sup> ed.). Lippincott Williams & Wilkins (LWW).
- Mo, X., Wu, T., Sun, B., & El-Hamshary, H. (2017). Nanofiber composites in tendon tissue engineering. En *Nanofiber Composites for Biomedical Applications* (pp. 345-367). Elsevier.
- Movin, T., Ryberg, Å., McBride, D. J., & Maffulli, N. (2005). Acute Rupture of the Achilles Tendon. *Foot and Ankle Clinics*, *10*, 331-356.
- Müller, S. A., Todorov, A., Heisterbach, P. E., Martin, I., & Majewski, M. (2015). Tendon healing: An overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *23*, 2097-2105.
- Murphy, K. D., Mushkudiani, I. A., Kao, D., Levesque, A. Y., Hawkins, H. K., & Gould, L. J. (2008). Successful Incorporation of Tissue-Engineered Porcine Small-Intestinal Submucosa as Substitute Flexor Tendon Graft Is Mediated by Elevated TGF- $\beta$ 1 Expression in the Rabbit. *The Journal of Hand Surgery*, *33*, 1168-1178.
- Murrell, G. A. C., Lilly, E. G., Davies, H., Best, T. M., Goldner, R. D., & Seaber, A. V. (1992). The achilles functional index. *Journal of Orthopaedic Research*, *10*, 398-404.
- Ni, M., Rui, Y. F., Tan, Q., Liu, Y., Xu, L. L., Chan, K. M., ... Li, G. (2013). Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials*, *34*, 2024-2037.
- Nixon, A. J., Watts, A. E., & Schnabel, L. V. (2012). Cell- and gene-based approaches to tendon regeneration. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, *21*, 278-294.
- Noback, P. C., Jang, E. S., Cuellar, D. O., Seetharaman, M., Malagoli, E., Greisberg, J. K., & Vosseller, J. T. (2017). Risk factors for achilles tendon rupture: A matched case control study. *Injury*, *48*, 2342-2347.

- O'Brien, M. (2005a). Anatomy of Tendons. En Nicola Maffulli, P. Renström, & W. B. Leadbetter (Eds.), *Tendon Injuries* (pp. 3-13). London: Springer-Verlag.
- O'Brien, M. (2005b). The Anatomy of the Achilles Tendon. *Foot and Ankle Clinics*, *10*, 225-238.
- Oliveira, A. C., Garzón, I., Ionescu, A. M., Carriel, V., Cardona, J. de la C., González-Andrades, M., ... Campos, A. (2013). Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. *PLoS ONE*, *8*, e66538.
- Omidian, H., & Park, K. (2010). Introduction to Hydrogels. En R. M. Ottenbrite, K. Park, & T. Okano (Eds.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (pp. 1-16). New York, NY: Springer New York.
- Oryan, A., & Moshiri, A. (2014). Recombinant fibroblast growth protein enhances healing ability of experimentally induced tendon injury *in vivo*: Effects of bFGF on Tendon Repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *8*, 421-431.
- Paavola, M., Kannus, P., Paakkala, T., Pasanen, M., & Järvinen, M. (2000). Long-Term Prognosis of Patients With Achilles Tendinopathy. *The American Journal of Sports Medicine*, *28*, 634-642.
- Petersen, W., Unterhauser, F., Pufe, T., Zantop, T., Südkamp, N. P., & Weiler, A. (2003). The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, *123*, 168-174.
- Philips, C., Cornelissen, M., & Carriel, V. (2018). Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *Journal of Neural Engineering*, *15*, 021003.
- Pietschmann, M. F., Frankewycz, B., Schmitz, P., Docheva, D., Sievers, B., Jansson, V., ... Müller, P. E. (2013). Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *24*, 211-220.

- Ramos, D., Peach, M. S., Mazzocca, A. D., Yu, X., & Kumbar, S. G. (2015). Tendon tissue engineering. En *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces* (pp. 195-217). Elsevier.
- Rawson, S., Cartmell, S., & Wong, J. (2019). Suture techniques for tendon repair; a comparative review. *Muscle Ligaments and Tendons Journal*, *03*, 220.
- Rees, J. D., Maffulli, N., & Cook, J. (2009). Management of Tendinopathy. *The American Journal of Sports Medicine*, *37*, 1855-1867.
- Rees, J. D., Wilson, A. M., & Wolman, R. L. (2006). Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology*, *45*, 508-521.
- Rivenburgh, D. (1992). Physical modalities in the treatment of tendon injuries. *Clinics in Sports Medicine*, *11*, 645-659.
- Roach, B. L., Nover, A. B., Ateshian, G. A., & Hung, C. T. (2016). Agarose Hydrogel Characterization for Regenerative Medicine Applications: Focus on Engineering Cartilage. En N. M. Neves & R. L. Reis (Eds.), *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* (pp. 258-273). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Rodriguez-Arco, L., Rodriguez, I. A., Carriel, V., Bonhome-Espinosa, A. B., Campos, F., Kuzhir, P., ... Lopez-Lopez, M. T. (2016). Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale*, *8*, 8138-8150.
- Roosens, A., Somers, P., De Somer, F., Carriel, V., Van Nooten, G., & Cornelissen, R. (2016). Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, *44*, 2827-2839.
- Rouvière, H., & Delmas, A. (1999). *Anatomía Humana* (10.<sup>a</sup> ed., Vol. 3). Masson.
- Sanchez-Quevedo, M. C., Alaminos, M., Capitan, L. M., Moreu, G., Garzon, I., Crespo, P. V., & Campos, A. (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histology and Histopathology*, *22*, 631-640.

- Sayana, M. K., & Maffulli, N. (2007). Eccentric calf muscle training in non-athletic patients with Achilles tendinopathy. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *10*, 52-58.
- Scionti, G., Moral, M., Toledano, M., Osorio, R., Durán, J. D. G., Alaminos, M., ... López-López, M. T. (2014). Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model: Hydration Effects on the Biomechanical Properties in a Fa Hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *102*, 2573-2582.
- Scot, R., & Dal Cin, P. (2013). Fibroma of tendon sheath. En *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (4.<sup>a</sup> ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Screen, H. R. C., Berk, D. E., Kadler, K. E., Ramirez, F., & Young, M. F. (2015). Tendon Functional Extracellular Matrix. *Journal of Orthopaedic Research*, *33*, 793-799.
- Segura-Rodríguez, D., Bermúdez-Jiménez, F. J., Carriel, V., López-Fernández, S., González-Molina, M., Oyonarte Ramírez, J. M., ... Jiménez-Jáimez, J. (2020). Myocardial fibrosis in arrhythmogenic cardiomyopathy: A genotype–phenotype correlation study. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*, *21*, 378-386.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, *6*, 10.
- Shen, H., Kormpakis, I., Havlioglu, N., Linderman, S. W., Sakiyama-Elbert, S. E., Erickson, I. E., ... Thomopoulos, S. (2016). The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Research & Therapy*, *7*. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0406-0>
- Shen, W., Chen, X., Chen, J., Yin, Z., Heng, B. C., Chen, W., & Ouyang, H.-W. (2010). The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration. *Biomaterials*, *31*, 7239-7249.
- Sherman, V. R., Yang, W., & Meyers, M. A. (2015). The materials science of collagen. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *52*, 22-50.



- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., & Hiraki, Y. (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Developmental Biology*, 298, 234-247.
- Smith, M. M., Sakurai, G., Smith, S. M., Young, A. A., Melrose, J., Stewart, C. M., ... Little, C. B. (2008). Modulation of aggrecan and ADAMTS expression in ovine tendinopathy induced by altered strain. *Arthritis & Rheumatism*, 58, 1055-1066.
- Snedeker, J. G., & Follen, J. (2017). Tendon injury and repair – A perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. *Acta Biomaterialia*, 63, 18-36.
- Speed, C. A. (2001). Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 40, 1331-1336.
- Spiesz, E. M., Thorpe, C. T., Chaudhry, S., Riley, G. P., Birch, H. L., Clegg, P. D., & Screen, H. R. C. (2015). Tendon extracellular matrix damage, degradation and inflammation in response to in vitro overload exercise: TENDON INFLAMMATION IN OVERLOAD. *Journal of Orthopaedic Research*, 33, 889-897.
- Stoll, C., John, T., Conrad, C., Lohan, A., Hondke, S., Ertel, W., ... Schulze-Tanzil, G. (2011). Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation. *Biomaterials*, 32, 4806-4815.
- Sudhakar, C. K., Upadhyay, N., Jain, A., Verma, A., Narayana Charyulu, R., & Jain, S. (2015). Hydrogels—Promising Candidates for Tissue Engineering. En *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* (pp. 77-94). Elsevier.
- Sue, G. R., & Chang, J. (2019). Tendon Repair. En *Global Reconstructive Surgery* (pp. 70-76). Elsevier.
- Sullivan, M. P., McHale, K. J., Parvizi, J., & Mehta, S. (2014). Nanotechnology: Current concepts in orthopaedic surgery and future directions. *The Bone & Joint Journal*, 96-B, 569-573.
- Sundararaghavan, H. G., Monteiro, G. A., Lapin, N. A., Chabal, Y. J., Miksan, J. R., & Shreiber, D. I. (2008). Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A, 308-320.

- Suurmeijer, A., de Bruijn, D., Geurts van Kessel, A., & Miettinen, M. (2013). Synovial sarcoma. En *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (4.<sup>a</sup> ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Thevendran, G., Sarraf, K. M., Patel, N. K., Sadri, A., & Rosenfeld, P. (2013). The ruptured Achilles tendon: A current overview from biology of rupture to treatment. *MUSCULOSKELETAL SURGERY*, 97, 9-20.
- Thomopoulos, S., Parks, W. C., Rifkin, D. B., & Derwin, K. A. (2015). Mechanisms of tendon injury and repair: TENDON INJURY AND REPAIR. *Journal of Orthopaedic Research*, 33, 832-839.
- Thorpe, C. T., Birch, H. L., Clegg, P. D., & Screen, H. R. C. (2013). The role of the non-collagenous matrix in tendon function. *International Journal of Experimental Pathology*, 94, 248-259.
- Thorpe, C. T., Birch, H. L., Clegg, P. D., & Screen, H. R. C. (2015). Tendon Physiology and Mechanical Behavior. En *Tendon Regeneration* (pp. 3-39). Elsevier.
- Thorpe, C. T., & Screen, H. R. C. (2016). Tendon Structure and Composition. En Paul W. Ackermann & D. A. Hart (Eds.), *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders* (Vol. 920, pp. 3-10). Cham: Springer International Publishing.
- Vinhas, A., Rodrigues, M. T., & Gomes, M. E. (2018). Exploring Stem Cells and Inflammation in Tendon Repair and Regeneration. En K. Turksen (Ed.), *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 2* (Vol. 1089, pp. 37-46). Cham: Springer International Publishing.
- Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 75-82.
- Wang, X. T., Liu, P. Y., & Tang, J. B. (2004). Tendon healing in vitro: Genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression. *The Journal of Hand Surgery*, 29, 884-890.

- Waterston, S. W., Maffulli, N., & Ewen, S. W. (1997). Subcutaneous rupture of the Achilles tendon: Basic science and some aspects of clinical practice. *British Journal of Sports Medicine*, *31*, 285-298.
- Webb, W. R., Dale, T. P., Lomas, A. J., Zeng, G., Wimpenny, I., El Haj, A. J., ... Chen, G.-Q. (2013). The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model. *Biomaterials*, *34*, 6683-6694.
- Weise, K. (2014). Tendon Injuries. En H.-J. Oestern, O. Trentz, & S. Uranues (Eds.), *General Trauma Care and Related Aspects* (pp. 211-227). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wezenbeek, E., De Clercq, D., Mahieu, N., Willems, T., & Witvrouw, E. (2018). Activity-Induced Increase in Achilles Tendon Blood Flow Is Age and Sex Dependent. *The American Journal of Sports Medicine*, *46*, 2678-2686.
- Williams, L. N., Elder, S. H., Bouvard, J. L., & Horstemeyer, M. F. (2008). The anisotropic compressive mechanical properties of the rabbit patellar tendon. *Biorheology*, *45*, 577-586.
- Winnicki, K., Ochała-Kłos, A., Rutowicz, B., Pękała, P. A., & Tomaszewski, K. A. (2020). Functional anatomy, histology and biomechanics of the human Achilles tendon—A comprehensive review. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, *229*, 151461.
- Wong, J. K. F., Cerovac, S., Ferguson, M. W. J., & Mcgrouter, D. A. (2006). The Cellular Effect of a Single Interrupted Suture on Tendon. *Journal of Hand Surgery*, *31*, 358-367.
- Woo, S. L.-Y. (1982). Mechanical properties os tendons and ligaments. Quasi-static and nonlinear viscoelastic properties. *Biorheology*, *19*, 12.
- Wu, F., Nerlich, M., & Docheva, D. (2017). Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Reviews*, *2*, 332-342.
- Xu, L., Cao, D., Liu, W., Zhou, G., Zhang, W. J., & Cao, Y. (2010). In vivo engineering of a functional tendon sheath in a hen model. *Biomaterials*, *31*, 3894-3902.

- Xu, Y., & Murrell, G. A. C. (2008). The Basic Science of Tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466, 1528-1538.
- Yang, X., Meng, H., Quan, Q., Peng, J., Lu, S., & Wang, A. (2018). Management of acute Achilles tendon ruptures: A review. *Bone & Joint Research*, 7, 561-569.
- Zhang, F., Zhang, Z., & Linhardt, R. J. (2009). Glycosaminoglycans. En *Handbook of Glycomics* (p. 22). Elsevier.
- Zhang, J., & Wang, J. H.-C. (2009). Mechanobiological response of tendon stem cells: Implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Research*, n/a-n/a.
- Zhao, J., Zhao, S., Zhao, J., Dong, S., Huangfu, X., Li, B., ... Cui, W. (2014). Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes. *International Journal of Nanomedicine*, 2373.
- Zhao, X., Hong, W., & Suo, Z. (2008). Inhomogeneous and anisotropic equilibrium state of a swollen hydrogel containing a hard core. *Applied Physics Letters*, 92, 051904.



## ■ BIOMATERIALS

# Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries

## A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF ANIMAL MODELS

### D. González-Quevedo, Objectives

I. Martínez-Medina,  
A. Campos,  
F. Campos,  
V. Carriel

University of Granada,  
Department of  
Histology (Tissue  
Engineering Group)  
and Instituto de  
Investigación  
Biosanitaria Ibs,  
Granada, Spain

■ D. González-Quevedo,  
MD, Orthopaedic Surgeon,  
Department of Orthopedic  
Surgery and Traumatology,  
Regional University Hospital of  
Málaga, Málaga, Spain,  
PhD Program in Biomedicine,  
University of Granada, Spain.

■ I. Martínez-Medina,  
MD, Orthopaedic Surgeon,  
Department of Orthopedic  
Surgery and Traumatology,  
Regional University Hospital of  
Málaga, Málaga, Spain.

■ A. Campos, MD, PhD,  
Professor,

■ F. Campos, M.Chem, PhD,  
Histologist,

■ V. Carriel, MSc, PhD, M.Biol,  
PhD, Professor, Department of  
Histology (Tissue Engineering  
Group) and Instituto de  
Investigación Biosanitaria Ibs  
University of Granada, Granada,  
Spain.

Correspondence should be sent to  
D. González-Quevedo;  
email: davidgonzalezquevedo@  
yahoo.com

doi: 10.1302/2046-3758.74.BJR-  
2017-0326

Bone Joint Res 2018;7:318–324.

Recently, the field of tissue engineering has made numerous advances towards achieving artificial tendon substitutes with excellent mechanical and histological properties, and has had some promising experimental results. The purpose of this systematic review is to assess the efficacy of tissue engineering in the treatment of tendon injuries.

### Methods

We searched MEDLINE, Embase, and the Cochrane Library for the time period 1999 to 2016 for trials investigating tissue engineering used to improve tendon healing in animal models. The studies were screened for inclusion based on randomization, controls, and reported measurable outcomes. The RevMan software package was used for the meta-analysis.

### Results

A total of 388 references were retrieved and 35 studies were included in this systematic review. The different biomaterials developed were analyzed and we found that they improve the biomechanical and histological characteristics of the repaired tendon. At meta-analysis, despite a high heterogeneity, it revealed a statistically significant effect in favour of the maximum load, the maximum stress, and the Young's modulus between experimental and control groups. In the forest plot, the diamond was on the right side of the vertical line and did not intersect with the line, favouring experimental groups.

### Conclusions

This review of the literature demonstrates the heterogeneity in the tendon tissue engineering literature. Several biomaterials have been developed and have been shown to enhance tendon healing and regeneration with improved outcomes.

Cite this article: *Bone Joint Res* 2018;7:318–324.

Keywords: Tissue engineering, Tendon injury, Cell-based therapies, Tendon healing, Biomaterials, Review

### Article focus

- Tissue engineering has emerged as an interesting alternative in regenerative medicine thanks to its development in recent years.
- Researchers have produced bioartificial substitutes that, by combining cells, biomaterials, and growth factors, restore the function of damaged organs.
- The objective of this study was to assess the efficacy of tissue engineering in the treatment of tendon injuries in animal models by systematically reviewing the scientific literature.

### Key messages

- Complete regeneration of the tendon after injury is never achieved and the

surgical treatment of these lesions have several limitations.

- The use of tissue engineering techniques can accelerate the healing process and produce biomechanical behaviour comparable to that of native tendons.

### Strengths and limitations

- No previous reviews have produced a meta-analysis of biomechanical results of tissue engineering for the treatment of tendon injuries in animal models.
- The included studies were heterogeneous in several ways, including the animal models used and tendon models used.

## Introduction

Most large tendons, such as the Achilles tendon, patellar tendon, rotator cuff, or forearm extensors, among others, are vulnerable to overuse, which can lead to pathological changes in the tendon that cause tendinopathy. This pathology is common among athletes and workers, being the main reason for musculoskeletal consult to the general practitioner (about 30%) and accounting for 17% of first consultations to the orthopedic surgeon.<sup>1</sup> Acute tendon injury includes partial or complete rupture, altering the continuity of the tendon and causing loss of movement. It is followed by a natural healing process but is less efficient than in other components of the musculoskeletal system. Acute and chronic injuries are facilitated by intrinsic and extrinsic factors. For example, degeneration of collagen and alteration of the orientation of its fibres have been shown in the histology of ruptures of the Achilles tendons.<sup>2</sup>

Complete regeneration of the tendon after injury is never achieved. The characteristic response is fibroplasia and the tissue that replaces the defect remains hypercellular with thinner collagen fibres. In tendons with tendinopathy or ruptures, there is a lower proportion of type I collagen and an increase in the amount of type III collagen, which reduces the mechanical resistance because this type of collagen has less crosslinking than type I.<sup>3</sup>

Currently, tendinous repair includes the use of autografts and tendinous transfers because allografts lose their biomechanical properties during the process of sterilization. In this context, tissue engineering emerged as a promising alternative in regenerative medicine, including tendinous repair. Tissue engineering is a multidisciplinary discipline that, through the rational combination of cells, biomaterials, and growth factors, allows the generation of bioartificial substitutes to repair, replace, or even increase the function of damaged tissues or organs.<sup>4,5</sup>

At present, tissue engineering researchers are developing polymers and 3D bioartificial substitutes that accelerate the healing process with biomechanical behaviour comparable to that of native tendons. However, to date, the studies on tendon repair using animal models have not found an ideal biomaterial and 3D bioartificial substitute for this purpose.<sup>6</sup>

Because these experimental studies have shown favourable results for the use of tissue engineering in tendon injuries, an update of the current evidence is required. This study presents a systematic review and meta-analysis of the existing progress in tissue engineering combining stem cells, growth factors, and scaffolds to assess the efficacy of treating tendon injuries in animal models.

## Materials and Methods

**Search strategy.** PRISMA guidelines were followed for this systematic review.

MEDLINE, Embase, and the Cochrane Library were searched for articles published between 1999 and 2016 about the use of tissue engineering in tendon injuries.

The keywords used to conduct the research were “tendon injuries” and “tissue engineering”.

Two researchers (DGQ, IMM) reviewed all of the potential abstracts and full texts independently. If there was any disagreement, it was resolved by consultation with another researcher (AC).

**Article selection.** The studies were included if they investigated tissue engineering techniques (e.g. biomaterials, growth factors) for repairing a tendon lesion. Trials where required to have been conducted in animal models without restriction of specie. *Ex vivo* experimental studies were excluded. The *in vivo* studies that investigated biomechanical or histological outcomes by tissue engineering strategies in injured tendons were also included. Due to the nature of intervention, it was agreed trials without blinding design.

We excluded duplicated studies, review articles, case reports, editorials and studies that were not published in English and: which were not reported as full-text articles; which reported on a molecular or genetic level; which reported without a control group (e.g. normal tendons or tendons repaired with or without a tissue engineering approach); and experimental trials without an animal model of tendon injury.

**Quality assessment.** The ARRIVE Guidelines for reporting animal research were used to measure the methodological quality of all included studies.<sup>7</sup> This checklist of 20 items considers characteristics of animal used and the experimental, statistical, and analytical methods of each study. We set a low, medium, and high quality of the papers with a ARRIVE checklist of 12 or less, 13 to 15, and 16 or more respectively.

**Statistical analysis.** All analyses were performed using the RevMan software (version 5.0, The Cochrane Collaboration, Oxford, United Kingdom). Standard mean difference with 95% confidence interval (CI) was calculated. Heterogeneity between studies was examined using the  $I^2$  statistical test. When the  $I^2$  value was greater than 50%, we considered that heterogeneity was significant. A random effect model was chosen as the main analysis method. Funnel plots were used to check for the potential of publication bias. All the p-values were two-sided; statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## Results

**Literature search and study characteristics.** A total of 388 records were identified for abstract review after removal of duplicates. A total of 105 studies were excluded because of their focus on gene therapy, biomechanics, *ex vivo* experiments, or clinical studies. A total of 176 studies were not included due to their being review articles or discussions, and 20 records were excluded for not being published in English. Of the remaining 43 potential articles, two studies were excluded because the animal model did not include a tendon injury and three articles were excluded due to their focus on gene therapy,

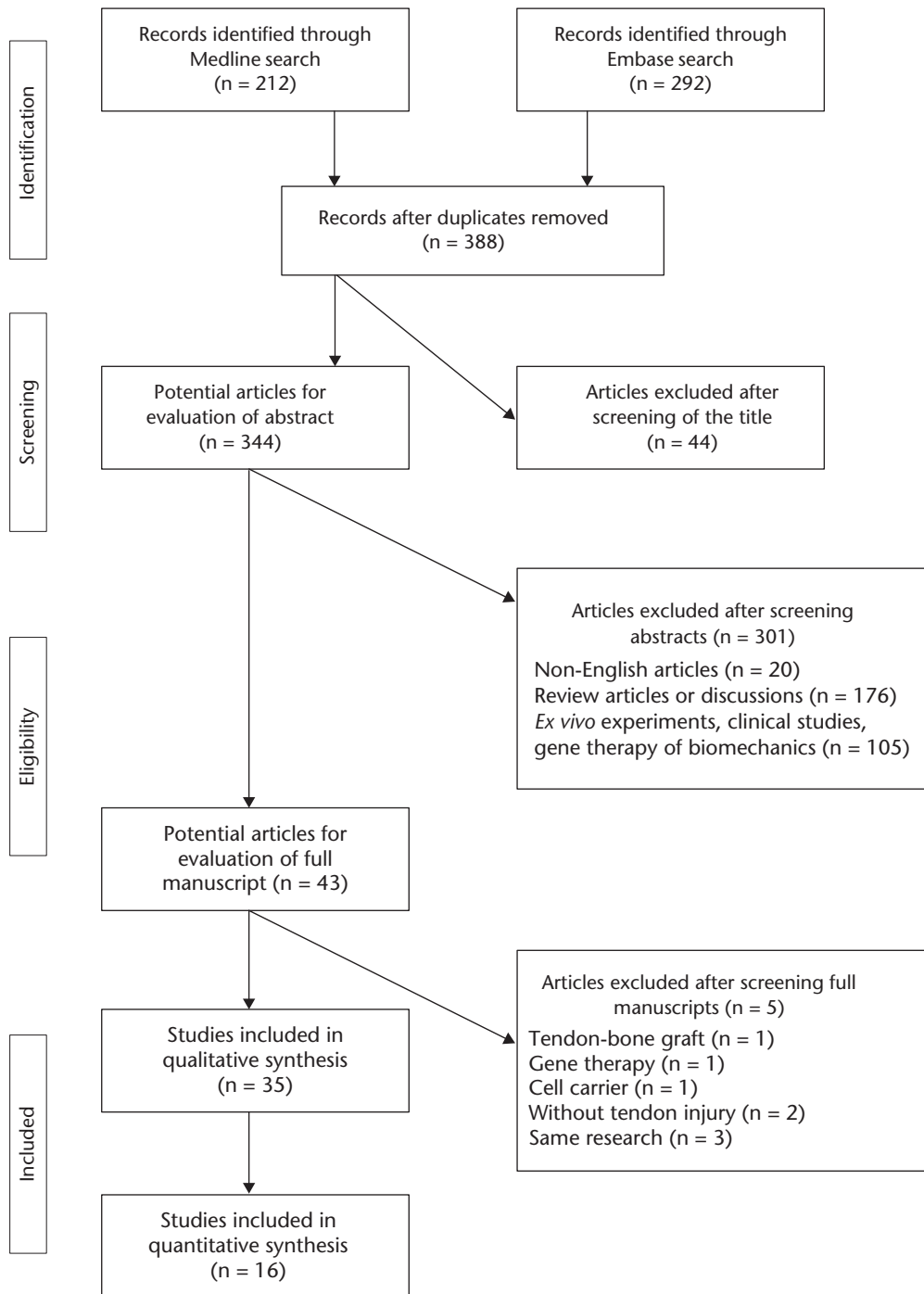


Fig. 1

Flowchart showing the selection process.

tendon-bone graft, and cell carriers, respectively (without animal model). A further three articles were excluded for being part of the same research.

Therefore, a total of 35 studies were included in this review, as reported in Figure 1. The selected articles are summarized in Supplementary table i. A total of 16 studies were included in the meta-analysis.

A total of 15 studies (42.9%) used rabbit models; the same number of trials used rat models. Two studies (5.7%) used hens. Pig, sheep, and dog animal models were used in one trial (2.9%) each. The tendons selected as lesion prototypes were: Achilles tendon (15, 42.9%); patellar tendon (seven, 20%); digital deep flexor tendon (six, 17.1%); supraspinatus tendon (three, 8.6%);

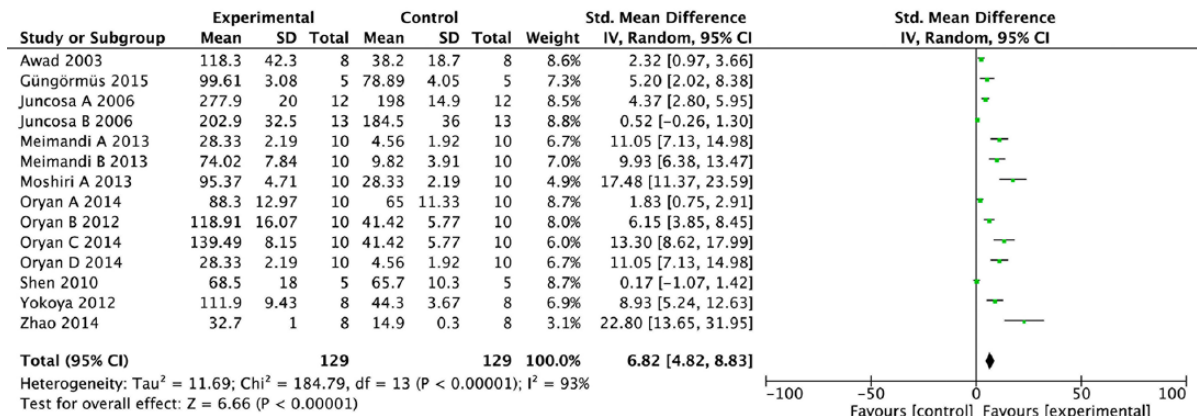


Fig. 2a

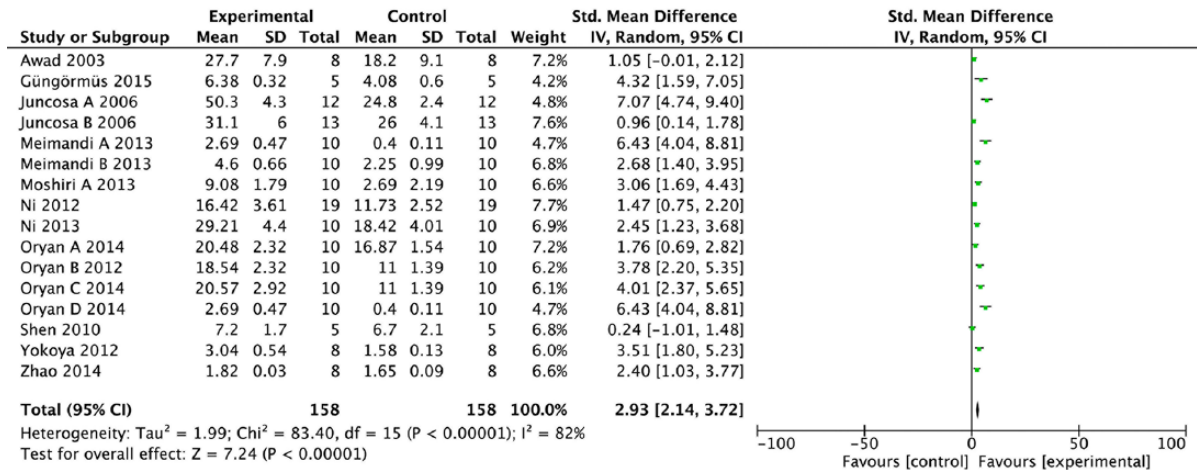


Fig. 2b

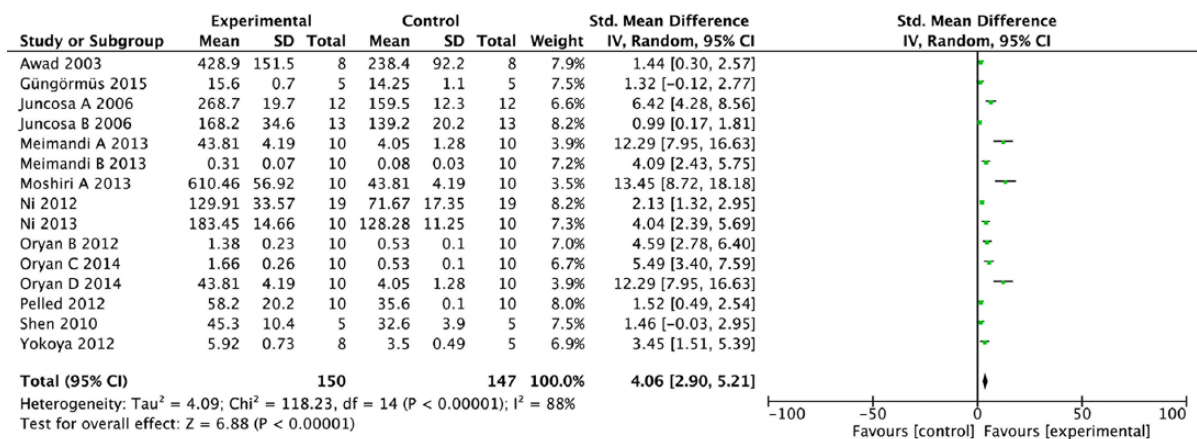


Fig. 2c

Meta-analysis for a) the maximum load, b) the maximum stress, and c) the Young's modulus of experimental groups and controls.

infraspinus tendon (two, 5.7%); and digital superficial flexor tendon (two, 5.7%).

In terms of tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries in these studies, we found the following breakdown: stem cells (18, 51.4%); biological scaffolds (seven, 20%); growth factors (five, 14.3%); synthetic biomaterials (four, 11.4%); and a combination of these approaches (one, 2.9%).

**Meta-analysis.** Overall, the meta-analysis revealed a statistically significant effect in favour of the maximum load (structural property; standard mean difference of 6.82 N, 95% CI 4.81 to 8.83), the maximum stress (material property; standard mean difference of 2.93 MPa, 95% CI 2.14 to 3.72), and the Young's modulus (mechanical property; standard mean difference of 4.06 MPa, 95% CI 2.90 to 5.21) between experimental and control groups (Fig. 2).



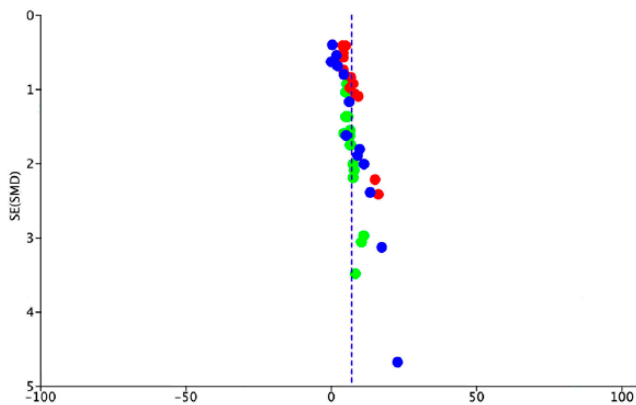


Fig. 3

Funnel plot analysis for the publication bias of maximum load (blue), maximum stress (green), and Young's modulus (red) outcomes. Funnel plot analysis indicated a low likelihood of publication bias.

Nevertheless, there was evidence for significant heterogeneity among groups (the  $I^2$  values were  $>80\%$ ,  $p < 0.01$ ). For this reason, we used a random-effects model for analysis.

In these analyses, in the forest plot, the diamonds were on the right side of the vertical line and did not intersect with the line, favouring experimental groups.

**Publication bias assessment.** Funnel plot indicated low likelihood of publication bias (Fig. 3).

## Discussion

**Animal models.** The selection of animal models is essential to ensure a correct translation to clinical practice. Rats are less expensive and easier to handle and maintain than other laboratory animals. However, their small size reduces the clinical translation of the developed regenerative strategies, but working with them facilitated the histological, functional and biomechanical analyses. Large animals, such as rabbits, dogs, or cows, have high costs and require specialized personnel to handle them, but they are more suitable for testing surgical approaches, techniques, and rehabilitation protocols.<sup>8</sup>

The rat rotator cuff model does not replicate the anatomy and kinematics of the human shoulder, but do share some resemblance. The Achilles and patellar tendons are easy to study using animal models because of their simple surgical approach and the possibility of reproducing tendon injuries and cyclic loads.<sup>9</sup> However, animal models can never replicate human conditions because many of them are quadrupeds and their tendons carry different loads with molecular differences. In addition to anatomical and size differences, histological, potential molecular, and regenerative differences should be considered.

**Tissue-engineered strategies.** Nowadays, an ideal engineered tendon substitute must be biodegradable, biocompatible, and biomechanically stable to support the

tension during healing. Furthermore, the combination of biomaterials and cells must reassemble the native structure of tendon and support the regeneration without adhesions, toxicity, or, tissue rejection.<sup>10</sup>

Tissue engineering approaches to repair and improve tendon healing include: biological and decellularized tissues, the use of natural and synthetic biomaterials, the use of growth factors, stem cell-based therapies, or a combination of these strategies.<sup>11</sup> In addition, there is a growing interest in the use of nanomaterials in tendon tissue engineering, and they could play a key role in tendon healing, as they can act as a carrier for gene therapy or growth factors, and thus help modulate the regenerative function of cells.<sup>12</sup>

An example of a biologic scaffold is the use of porcine small intestinal submucosa. When this biomaterial is implanted, it induces a site-specific tissue repair with a tendon histologically similar to native tendon. However, the use of this scaffold may generate a foreign body and inflammatory reaction.<sup>13</sup> Some authors are focused on the decellularization of tissues and organs in order to reduce the immunogenicity of these grafts, while maintaining the 3D structure and molecular composition of the extracellular matrix.<sup>14,15</sup> In this sense, a reduction of the inflammatory response was observed *in vivo*.<sup>16</sup>

Concerning the use of biomaterials, synthetic ones (such as polyglycolic acid) resulted in biomechanically and structurally stable tendon graft that supports tendon cell migration, especially those subjected to crosslinking.<sup>17</sup> Similarly, chitosan-based hyaluronan hybrid fibre scaffolds have been used in tendon repair with better collagen type I production.<sup>18</sup> Polyhydroxyalkanoates are a family of biopolymers with adaptable mechanical properties and delayed biodegradability.<sup>19</sup>

Collagen type I, the main component of the tendon, has been shown to have an excellent biocompatibility and biodegradability; with nanostructured and crosslinking technologies, it is possible to polymerize the type I collagen to produce effective scaffolds.<sup>20</sup> Electrospinning of collagen fibres produces elaborate nanofibres with the desirable size, density, and alignment.<sup>21</sup>

Bone marrow and adipose mesenchymal stem cells (MSCs) are a commonly used cell source in musculoskeletal and peripheral nerve tissue engineering due to their ability to differentiate and their easy isolation and culture.<sup>4,22,23</sup> When these cells were used in tendon repair, they improved tendinous healing in short-term studies. However, these studies suggest that no significant differences can be observed in long-term comparative studies; this could be related to the high regeneration capability of the animal models used.<sup>24-26</sup> Tendon-derived stem cells have higher mRNA expression of tenomodulin, scleraxis, type I collagen and decorin than that of MSCs, and could promote earlier and better tendon healing. On the other hand, in published studies, the biomechanical

properties of the native tendon have never been restored successfully using tendon-derived stem cells.<sup>27</sup> In addition to the regenerative potential of adipose-derived stromal cells, it was recently reported that these cells promote neoangiogenesis, cell proliferation and extracellular matrix (ECM) remodelling, and that they protect the regenerative microenvironment from macrophages.<sup>28</sup>

Growth factors, which are produced by anti-inflammatory macrophages, play a key role in the regulation of all phases of tendon healing because they are needed to activate different cellular processes (such as proliferation, differentiation, and migration) and to increase the synthesis of crucial ECM.<sup>29</sup> These factors can be delivered to the regenerative microenvironment by direct application or by using impregnated sutures for slow release, or a scaffold-based delivery system.<sup>30</sup> Basic fibroblast growth factor (bFGF) has a beneficial effect on tendon healing by regulating cellular migration, promoting angiogenesis, and inhibiting inflammatory processes.<sup>31</sup> Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) was involved in tendon differentiation and maintenance, modulating collagen formation, and tendon remodelling.<sup>32,33</sup> Another example is the connective tissue growth factor (CTGF) that is highly expressed in the early stage of tendon repair and can promote tendon repair.<sup>34</sup> Platelet-rich plasma (PRP) was recently introduced as a novel treatment for tendon injuries that would enhance the synthesis of type I and type III collagen and would limit matrix degradation.<sup>35,36</sup> Stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) is a cytokine that regulates inflammatory cell recruitment and could improve the structural and biomechanical characteristics of repaired tendon.<sup>37</sup>


Gene therapy is another attractive field in tissue engineering but it is still necessary to define optimal cell targets and identify genes whose modification has a significant therapeutic response.<sup>38</sup>

There are several strengths in this meta-analysis. This is the first study that showed favourable outcomes when using tissue engineering strategies in the treatment of tendon injuries in animal models. Therefore, the quality assessment score for most of the included studies was high, favouring the results of the meta-analysis. Nevertheless, there are a series of limitations associated with this work. First, like any systematic review, the conclusions of our work are affected by the quality of studies included. However, most included studies in this work had a high quality according to ARRIVE guidelines. Second, our search strategy may associate search bias due to this is an English language-only revision, which entails language bias. On the other hand, the results on animal model have a limited value for a human application.

In conclusion, at present, there are numerous gaps in the basic science of tendon healing. As a result, the orthopaedic surgeon has few solutions at his fingertips in the event of a tendon injury. In recent years, thanks to tissue

engineering techniques and the use of animal models, we have growth factors, scaffolds, and stem cells that can improve the histological and biomechanical characteristics of repair tissue, but do not fully recapitulate the native tendon.

### Supplementary material

 A table showing benefits and limitations of tissue engineering strategies for tendon injuries

### References

1. Kaux JF, Forthomme B, Goff CL, Crielaard JM, Croisier JL. Current opinions on tendinopathy. *J Sports Sci Med* 2011;10:238-253.
2. Maffulli N, Barras V, Ewen SW. Light microscopic histology of achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. *Am J Sports Med* 2000;28:857-863.
3. Rees JD, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *Am J Sports Med* 2009;37:1855-1867.
4. Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *Expert Rev Neurother* 2014;14:301-318.
5. Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3311-3317.
6. Hogan MV, Bagayoko N, James R, et al. Tissue engineering solutions for tendon repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2011;19:134-142.
7. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *Animals* 2013;4:35-44.
8. Bottagisio M, Lovati AB. A review on animal models and treatments for the reconstruction of Achilles and flexor tendons. *J Mater Sci Mater Med* 2017;28:45.
9. Hast MW, Zuskov A, Soslowsky LJ. The role of animal models in tendon research. *Bone Joint Res* 2014;3:193-202.
10. Kuo CK, Marturano JE, Tuan RS. Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: advanced biomaterials and regeneration motifs. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 2010;2:20.
11. Longo UG, Lamberti A, Petrillo S, Maffulli N, Denaro V. Scaffolds in tendon tissue engineering. *Stem Cells Int* 2012;2012:517165.
12. Parchi PD, Vittorio O, Andreani L, et al. Nanoparticles for tendon healing and regeneration: literature review. *Front Aging Neurosci* 2016;8:202.
13. Murphy KD, Mushkudiani IA, Kao D, et al. Successful incorporation of tissue-engineered porcine small-intestinal submucosa as substitute flexor tendon graft is mediated by elevated TGF-beta1 expression in the rabbit. *J Hand Surg Am* 2008;33:1168-1178.
14. Roosens A, Somers P, De Somer F, et al. Impact of detergent-based decellularization methods on porcine tissues for heart valve engineering. *Ann Biomed Eng* 2016;44:2827-2839.
15. Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, et al. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One* 2013;8:e66538.
16. Güngörmüş C, Kolankaya D, Aydin E. Histopathological and biomechanical evaluation of tenocyte seeded allografts on rat Achilles tendon regeneration. *Biomaterials* 2015;51:108-118.
17. Bagnaninchi PO, Yang Y, El Haj AJ, Maffulli N, Bosch U. Tissue engineering for tendon repair. *Br J Sports Med* 2007;41:e10.
18. Majima T, Irie T, Sawaguchi N, et al. Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 2007;221:537-546.
19. Webb WR, Dale TP, Lomas AJ, et al. The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model. *Biomaterials* 2013;34:6683-6694.
20. Oryan A, Moshiri A, Meimandi-Parizi A. In vitro characterization of a novel tissue engineered based hybridized nano and micro structured collagen implant and its in vivo role on tenoinduction, tenoconduction, tenogenesis and tenointegration. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25:873-897.
21. Oryan A, Moshiri A, Parizi Meimandi A, Silver IA. A long-term in vivo investigation on the effects of xenogenous based, electrospun, collagen implants on the healing of experimentally-induced large tendon defects. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013;13:353-367.

22. Paredes JJ, Andarawis-Puri N. Therapeutics for tendon regeneration: a multidisciplinary review of tendon research for improved healing. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1383:125-138.
23. Carriel V, Scionti G, Campos F, et al. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:1412-1426.
24. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, et al. Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:681-689.
25. Juncosa-Melvin N, Shearn JT, Boivin GP, et al. Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:2291-2300.
26. Chong AK, Ang AD, Goh JC, 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-A:74-81.
27. Ni M, Rui YF, Tan Q, et al. Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials* 2013;34:2024-2037.
28. Shen H, Korpakakis I, Havlioglu N, et al. The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:144.
29. Nourissat G, Berenbaum F, Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11:223-233.
30. Longo UG, Lamberti A, Maffulli N, Denaro V. Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review. *Br Med Bull* 2011;98:31-59.
31. Oryan A, Moshiri A. Recombinant fibroblast growth protein enhances healing ability of experimentally induced tendon injury in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8:421-431.
32. Chamberlain CS, Lee J-S, Leiferman EM, et al. Effects of BMP-12-releasing sutures on Achilles tendon healing. *Tissue Eng Part A* 2015;21:916-927.
33. Lipner J, Shen H, Cavinatto L, et al. In vivo evaluation of adipose-derived stromal cells delivered with a nanofiber scaffold for tendon-to-bone repair. *Tissue Eng Part A* 2015;21:2766-2774.
34. Lui PPY, Wong OT, Lee YW. Transplantation of tendon-derived stem cells pre-treated with connective tissue growth factor and ascorbic acid in vitro promoted better tendon repair in a patellar tendon window injury rat model. *Cytotherapy* 2016;18:99-112.
35. Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, et al. Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *J Orthop Res* 2013;31:306-314.
36. Kaux JF, Drion PV, Colige A, et al. Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats. *Wound Repair Regen* 2012;20:748-756.
37. Shen W, Chen X, Chen J, et al. The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration. *Biomaterials* 2010;31:7239-7249.
38. Huang D, Balian G, Chhabra AB. Tendon tissue engineering and gene transfer: the future of surgical treatment. *J Hand Surg Am* 2006;31:693-704.

#### Funding Statement

- The research and publication of research were supported by the Spanish Society of Orthopedics and Traumatology (SECOT) Foundation.

#### Author Contributions

- D. González-Quevedo: Online research and abstract selection, Analyzing and interpreting the data, Writing the manuscript.
- I. Martínez-Medina: Online research and abstract selection.
- A. Campos: Supervising the study.
- F. Campos: Critical revision of the manuscript.
- V. Carriel: Critical revision of the manuscript.

#### Conflict of Interest Statement

- None declared.

© 2018 Author(s) et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (CC-BY-NC), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, but not for commercial gain, provided the original author and source are credited.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material

**Table i.** Benefits and limitations of tissue engineering strategies for tendon injuries

Author (year)	Animal model	Tissue-engineered material	Results	Limits	Quality	Randomisation	Blinding
Cao et al <sup>1</sup>	Hen, digital deep flexor tendon	Autologous tenocytes + polyglycolic acid fibres	Histologic: Cell-to-collagen ratio and collagen alignment pattern same as normal tendon. Biomechanics: 83% of normal strength.	Using tenocytes need to harvest autologous tendon tissue. In tendon defect model, the engineered tendons were thicker with severe adhesions.	Low	No	No
Awad et al <sup>2</sup>	Rabbit, patellar tendon	Autologous mesenchymal stem cells (MSC) + composite collagen cell	Histologic: qualitatively similar cell alignment and cell density characteristics. Greater repair volume. Biomechanics: graft composite repair tissues were stronger and stiffer than natural repair tissues (but less than normal tissues)	Ectopic bone formation in some graft composite repairs. Mixed subpopulations of rabbit MSCs and osteogenic progenitors.	Medium	Yes	No
Curtis et al <sup>3</sup>	Rat, digital deep flexor tendon	Polydioxanone sheet	Histologic: it aligns the tendon cells correctly and accelerates the cell migration. It degrades at the correct time.	Lack of biomechanical test.	Low	No	No
Juncosa-Melvin et al <sup>4,5</sup>	Rabbit, patellar tendon; rabbit, Achilles tendon	Autologous MSCs + collagen sponge; autologous MSCs + collagen gel	Histologic: similar biochemical staining and cellular alignment compared with normal. Biomechanics: increased repair maximum force, linear stiffness, maximum stress and modulus.	Cellular and acellular constructs may have had different densities and mechanical properties. Tension was not controlled at surgery.	Medium	No	Yes
Liu et al <sup>6</sup>	Pig, digital superficial flexor tendon	Autologous dermal fibroblasts + PGA fibres	Histologic: matrix production and histological structure were comparable with natural tendon. Biomechanics: 74%-76% of normal tendon's tensile strength.	Moderate level of tissue adhesion was observed. Difficulty in excluding the role played by endogenous fibroblasts.	High	Yes	No
Chong et al <sup>7</sup>	Rabbit, Achilles tendon	Autologous MSCs + fibrin carrier	Histologic: cellularity was increased at the repair site with denser collagen I structures (more organized). Biomechanics: 32% higher modulus compared with control.	At twelve weeks, there was no difference in material properties.	High	Yes	No
Hankemeier et al <sup>8</sup>	Rat, patellar tendon	Human MSCs + fibrin glue	Histologic: more mature tissue dominated by dense collagen fibre bundles (spindle-shaped cells orientated parallel). No ectopic tissue.	Need for biomechanical and ultrastructural studies.	Low	Yes	No
Majima et al <sup>9</sup>	Rabbit, infraspinatus tendon (rotator cuff)	Chitosan-based hyaluronan (HA) hybrid polymer fibre	Histologic: type I collagen was more abundant. Biomechanics: greater tensile strength and tangent modulus at 12 weeks.	Lack of integration to the bony attachment of the graft. Immunological reactions of chitosan.	Low	No	No
Murphy et al <sup>10</sup>	Rabbit, digital deep flexor tendon	Porcine small intestinal submucosa (SIS) xenograft	Histologic: mature collagen content and TGF-β1 protein were greater. Biomechanics: the intrinsic strength was greater at 4 weeks.	Repair strength was similar between groups at 8 weeks.	High	Yes	No
Butler et al <sup>11</sup>	Rabbit, patellar tendon	Autologous MSCs + collagen sponge	Histologic: no ectopic bone was found. All repairs showed strong straining for decorin and fibronectin. Biomechanics: all repairs achieved higher linear stiffness, maximum force and maximum stress.	Repair was more cellular with poorly aligned cells. Repairs did not match the normal tendon's tangent stiffness.	Low	No	No
Cohen et al <sup>12</sup>	Rat, Achilles tendon	Connective tissue progenitors (CTPs) from human embryonic stem cells (hESCs)	Histologic: grafts remodelled with fascicle-like organization and high matrix-to-cell ratio. Biomechanics: tests showed results similar to the control.	Persistence of pluripotency and the formation of tumours (teratoma) is not clear.	Low	No	No
Shen et al <sup>13</sup>	Rat, Achilles tendon	Recombinant human SDF-1 (rhSDF-1) alpha + collagen sponge	Histologic: organized bundles of collagen fibres with higher concentrations of type I collagen. Biomechanics: the maximum force and stress at failure were similar.	The regenerated tendon did not exhibit the typical shiny white smooth surface.	High	Yes	Yes
Xu et al <sup>14</sup>	Hen, digital deep flexor tendon	Sheath derived cells + PGA fibres	Histologic: the former structure was equivalent to native sheath. Biomechanics: less power consumption for tendon movement.	The lesion model used do not replicate the clinical reality. Mild hyperplasia of synoviocytes.	High	Yes	No
Loeffler et al <sup>15</sup>	Rat, supraspinatus tendon (rotator cuff)	Cells from tendon-to-bone interface + collagen sponge	Histologic: improved collagen organization with greater cellularity and vascularity.	Lack of biomechanical tests.	High	Yes	No
Ni et al <sup>16,17</sup>	Rat, patellar tendon	Tendon-derived stem cells (TDSCs) + fibrin glue	Histologic: longitudinally arranged healing tendon cells between parallel collagen fibres. Biomechanics: the ultimate stress and the Young's modulus were higher.	Restored the Young's modulus to 57% of the control.	Medium	Yes	Yes

(continued)

**Table i.** (Continued)

Author (year)	Animal model	Tissue-engineered material	Results	Limits	Quality	Rando- misation	Blinding
Oryan et al <sup>18</sup>	Rabbit, digital superficial flexor tendon	Human basic fibroblast growth factor (bFGF)	Histologic: enhanced collagen fibre alignment, angiogenesis and tenoblast maturity. Biomechanics: improved ultimate strength, stiffness and maximum stress.	Maximum stress was still inferior to that of normal tendons.	High	Yes	No
Pelled et al <sup>19</sup>	Rat, Achilles tendon	Autologous MSCs (Smad 8 / BMP2 overexpressed) + fibrin gel	Histologic: cells appeared organized in parallel columns with a more structured ECM. Biomechanics: elastic modulus was greater.	Ectopic bone formation in 28%. No improvement in the biomechanical properties compared with natural healing.	Medium	Yes	No
Martinello et al <sup>20</sup>	Sheep, digital deep flexor tendon	MSCs + platelet-rich Plasma (PRP)	Histologic: increased regeneration of ECM with neovascularization and positive expression for matrix proteins.	Lack of biomechanical tests. Hypervascularization may indicate pathological changes.	Medium	Yes	No
Oryan et al <sup>21-26</sup>	Rabbit, Achilles tendon; rabbit, Achilles tendon; rabbit, Achilles tendon; rabbit, Achilles tendon	Bovine nanostructured type I collagen; bovine nanostructured type I collagen + bovine-derived platelet gel; bovine nanostructured type I collagen + PDS sheath; bovine nanostructured and crosslinked type I collagen	Histologic: increased diameter and density of collagen fibrils, more rapid collagen differentiation and earlier development of hierarchical organization. Biomechanics: increased maximum load, maximum stress and modulus of elasticity.	Lack of molecular, biochemical and biomechanical studies to explain how the implant influences tendon healing. Autogenous platelets may not be effective in tendon healing. Immunogenic activity of the novel artificial tendon may interfere in tendon healing. Structurally and biomechanically inferior to normal tendon.	High	Yes	Yes
Webb et al <sup>27</sup>	Rat, Achilles tendon	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) + collagen gel	Histologic: increased cellular alignment (with tenocyte-like morphology). Biomechanics: reduction in maximum force and elastic modulus	Immune response measured by C-reactive protein (PCR).	High	Yes	Yes
Yokoya et al <sup>28</sup>	Rabbit, infraspinatus tendon (rotator cuff)	Autologous MSCs + PGA sheet	Histologic: paralleled fibrous tissue with Sharpey's fibres at the tendon insertion. Maturation of type I collagen. Biomechanics: no differences in the cross-sectional area and Young's modulus at 16 weeks.	Unknown mechanism by MSC enhance the regeneration of tendon insertion.	High	Yes	Yes
Zhao et al <sup>29</sup>	Rat, supraspinatus tendon (rotator cuff)	bFGF + poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) membrane	Histologic: cells aligned regularly with more parallel fibrous tissues (improved collagen organization). Biomechanics: greater load-to-failure, stiffness and mechanical stress.	Repair used in this model differs from that used in humans. Load-to-failure biomechanical test does not replicate the clinical setting. Lack of biomechanical tests.	High	Yes	No
Chamberlain et al <sup>30</sup>	Rat, Achilles tendon	BMP12 + releasing suture	Histologic: adhesions and vascularity in the surrounding area were reduced. Improved collagen organization.	Lack of biomechanical tests.	High	Yes	No
Güngörmüş et al <sup>31</sup>	Rat, Achilles tendon	Cultured tenocytes allograft + decellularized matrix (DCM)	Histologic: cell distribution was more homogeneous with better organized ECM (compact and aligned collagen fibres). Biomechanics: improvement of ultimate tensile stress and Young's modulus.	Degenerative changes or chondroid metaplasia were detected.	High	Yes	Yes
Lipner et al. <sup>32</sup>	Rat, supraspinatus tendon (rotator cuff)	Allogeneic BMP2 adipose-derived stromal cells (ADSCs) + PLGA nanofibre	Histologic: notably delayed healing response with higher trabecular thickness and increased. Biomechanics: strength and modulus were decreased.	PLGA products may impair the healing process. Use of viral vector for delivering BMP2 could cause an immune reaction.	Medium	Yes	Yes
Komatsu et al <sup>33</sup>	Rat, Achilles tendon	TDSCs + cell sheet carrier	Histologic: higher density of round-shaped cells and aligned parallel to axis. Type I collagen fibres well organized. Biomechanics: maximum load and stiffness were higher.	Possibility of presence of bone-like tissue in the regenerated area. The long-term effects on tendon maturation are not clear.	High	Yes	Yes
Lui et al <sup>34</sup>	Rat, patellar tendon	TDSCs with connective tissue growth factor (CTGF) + fibrin glue	Histologic: healing cells were better aligned with load. Better fibre arrangement and structure. Biomechanics: ultimate stress and maximum Young's modulus increased at a faster rate.	Presence of ectopic mineralized tissues. Difference in the cell density of the TDSC groups.	High	Yes	Yes
Shen et al <sup>35</sup>	Dog, digital deep flexor tendon	Autologous ADSCs + HA hydrogel	Histologic: influence the inflammatory response, promote angiogenesis, cell proliferation and matrix remodelling. Suppress the negative effects of macrophages.	Lack of biomechanical test. Unclear how inflammation is regulated and if it will result in long-term benefits.	High	Yes	Yes



## References

- Cao Y, Liu Y, Liu W, et al.** Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. *Plast Reconstr Surg* 2002;110:1280-1289.
- Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, et al.** Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003;21:420-431.
- Curtis ASG, Wilkinson CDW, Crossan J, et al.** An in vivo microfabricated scaffold for tendon repair. *Eur Cell Mater* 2005;9:50-57.
- Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, et al.** Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:681-689.
- Juncosa-Melvin N, Shearn JT, Boivin GP, et al.** Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2006;12:2291-2300.
- Liu W, Chen B, Deng D, et al.** Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model. *Tissue Eng* 2006;12:775-788.
- Chong AK, Ang AD, Goh JC, 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-A:74-81.
- Hankemeier S, van Griensven M, Ezechieli M, et al.** Tissue engineering of tendons and ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix in immunodeficient rats: results of a histologic study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007;127:815-821.
- Majima T, Irie T, Sawaguchi N, et al.** Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 2007;221:537-546.
- Murphy KD, Mushkudiani IA, Kao D, et al.** Successful incorporation of tissue-engineered porcine small-intestinal submucosa as substitute flexor tendon graft is mediated by elevated TGF-beta1 expression in the rabbit. *J Hand Surg Am* 2008;33:1168-1178.
- Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, et al.** Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bioscaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res* 2008;26:1-9.
- Cohen S, Leshansky L, Zussman E, et al.** Repair of full-thickness tendon injury using connective tissue progenitors efficiently derived from human embryonic stem cells and fetal tissues. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3119-3137.
- Shen W, Chen X, Chen J, et al.** The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration. *Biomaterials* 2010;31:7239-7249.
- Xu L, Cao D, Liu W, et al.** In vivo engineering of a functional tendon sheath in a hen model. *Biomaterials* 2010;31:3894-3902.
- Loeffler BJ, Scannell BP, Peindl RD, et al.** Cell-based tissue engineering augments tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus model. *J Orthop Res* 2013;31:407-412.
- Ni M, Rui YF, Tan Q, et al.** Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials* 2013;34:2024-2037.
- Ni M, Lui PPY, Rui YF, et al.** Tendon-derived stem cells (TDSCs) promote tendon repair in a rat patellar tendon window defect model. *J Orthop Res* 2012;30:613-619.
- Oryan A, Moshiri A.** Recombinant fibroblast growth protein enhances healing ability of experimentally induced tendon injury in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8:421-431.
- Pelled G, Snedeker JG, Ben-Arav A, et al.** Smad8/BMP2-engineered mesenchymal stem cells induce accelerated recovery of the biomechanical properties of the Achilles tendon. *J Orthop Res* 2012;30:1932-1939.
- Martinello T, Bronzini I, Perazzi A, et al.** Effects of in vivo applications of peripheral blood-derived mesenchymal stromal cells (PB-MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on experimentally injured deep digital flexor tendons of sheep. *J Orthop Res* 2013;31:306-314.
- Oryan A, Moshiri A, Meimandi-Parizi A.** In vitro characterization of a novel tissue engineered based hybridized nano and micro structured collagen implant and its in vivo role on tenoinduction, tenoconduction, tenogenesis and tenointegration. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25:873-897.
- Oryan A, Moshiri A, Parizi Meimandi A, Silver IA.** A long-term in vivo investigation on the effects of xenogenous based, electrospun, collagen implants on the healing of experimentally-induced large tendon defects. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013;13:353-367.
- Meimandi-Parizi A, Oryan A, Moshiri A.** Role of tissue engineered collagen based tridimensional implant on the healing response of the experimentally induced large Achilles tendon defect model in rabbits: a long term study with high clinical relevance. *J Biomed Sci* 2013;20:28.
- Meimandi-Parizi A, Oryan A, Moshiri A.** Tendon tissue engineering and its role on healing of the experimentally induced large tendon defect model in rabbits: a comprehensive in vivo study. *PLoS One* 2013;8:e73016.
- Moshiri A, Oryan A, Meimandi-Parizi A.** Role of tissue-engineered artificial tendon in healing of a large Achilles tendon defect model in rabbits. *J Am Coll Surg* 2013;217:421-441.e8.
- Oryan A, Moshiri A, Meimandi-Parizi A.** Implantation of a novel tissue-engineered graft in a large tendon defect initiated inflammation, accelerated fibroplasia and improved remodeling of the new Achilles tendon: a comprehensive detailed study with new insights. *Cell Tissue Res* 2014;355:59-80.
- Webb WR, Dale TP, Lomas AJ, et al.** The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model. *Biomaterials* 2013;34:6683-6694.
- Yokoya S, Mochizuki Y, Natsu K, et al.** Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2012;40:1259-1268.
- Zhao S, Zhao J, Dong S, et al.** Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes. *Int J Nanomedicine* 2014;9:2373-2385.
- Chamberlain CS, Lee J-S, Leiferman EM, et al.** Effects of BMP-12-releasing sutures on Achilles tendon healing. *Tissue Eng Part A* 2015;21:916-927.
- Güngörmüş C, Kolankaya D, Aydin E.** Histopathological and biomechanical evaluation of tenocyte seeded allografts on rat Achilles tendon regeneration. *Biomaterials* 2015;51:108-118.
- Lipner J, Shen H, Cavinatto L, et al.** In vivo evaluation of adipose-derived stromal cells delivered with a nanofiber scaffold for tendon-to-bone repair. *Tissue Eng Part A* 2015;21:2766-2774.
- Komatsu I, Wang JHC, Iwasaki K, Shimizu T, Okano T.** The effect of tendon stem/progenitor cell (TSC) sheet on the early tendon healing in a rat Achilles tendon injury model. *Acta Biomater* 2016;42:136-146.
- Lui PPY, Wong OT, Lee YW.** Transplantation of tendon-derived stem cells pre-treated with connective tissue growth factor and ascorbic acid in vitro promoted better tendon repair in a patellar tendon window injury rat model. *Cytherapy* 2016;18:99-112.
- Shen H, Korpakakis I, Havioglu N, et al.** The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:144.



# The Bone & Joint Journal

70 years of orthopaedic excellence

**Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model.**

Journal:	<i>The Bone &amp; Joint Journal</i>
Manuscript ID	BJJ-2019-1143.R2
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	Tissue engineering, Fibrin-agarose hydrogels, Nanostructured biomaterials, Orthopedic surgery, Tendon repair, In vivo tissue regeneration

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## Decision Letter (BJJ-2019-1143.R2)

**From:** d.gray@boneandjoint.org.uk  
**To:** davidgonzalezquevedo@yahoo.com  
**CC:** davidgonzalezquevedo@yahoo.com, miriam\_diaz95@hotmail.com, jesus.chato.a@gmail.com, david.s.p.94@gmail.com, isktamimi80@yahoo.com, acampos@ugr.es, fcampos@ugr.es, vcarriel@ugr.es  
**Subject:** The Bone & Joint Journal - Decision on Manuscript ID BJJ-2019-1143.R2  
**Body:** 16-Apr-2020

Dear Dr González Quevedo,

BJJ-2019-1143.R2 Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model.

Thank you for sending us your resubmission. I am very pleased to tell you that we would now like to publish your article, subject to the usual in-house editing. The editing process only begins now and involves several stages, performed by orthopaedic specialists, as well as editorial staff. Please note that we may also remove any figures or tables that the Editor feels are unnecessary at this stage.

If you have any audio/video file(s) which you would like to accompany your paper on our website, subject to editorial approval, please let us know.

In order to aid us in the promotion of your work after publication, if you or any of your co-authors are on Twitter, please add your Twitter names to the title page details of the galley proofs when you receive them.

Sign-up to receive the BJJ e-table of contents so you can be the first to see it published!  
<https://online.boneandjoint.org.uk/action/registration>

**\*\*Each author on the paper will need to complete an ICMJE form and sign a Copyright Assignment, both of which are attached. Please return all documents by email to the Production Management Assistant, Deborah Gray (d.gray@boneandjoint.org.uk), and note that your paper cannot be published without these forms. All ICMJE forms will be uploaded to the website as supplementary material on publication of your paper.**

**\*\*Please note that there can only be one corresponding author per paper. Please agree who is to act as corresponding author for this paper and then let Deborah know. The corresponding authorship does not convey any importance or superiority over the other authors; it is simply the designated contact person during production and in publication. You can have one author during production, and then change the author for publication purposes but you must make this change on the galley proofs.**

If you are planning on being away for any length of time over the next few months, it would also be helpful if you could let us know, and if you could nominate a co-author (and provide their email address) for us to contact should we need to get in touch during your absence. This is also useful if we find ourselves unable to get in contact with you for any reason during the editorial process.

**\*\*Please direct all communication through the corresponding author\*\***

With Best Wishes

Professor Fares Haddad  
Editor-in-Chief, The Bone & Joint Journal  
The British Editorial Society of Bone & Joint Surgery  
22 Buckingham Street, London WC2N 6ET  
t: 020 7782 0010 f: 020 7839 9777  
e: d.gray@boneandjoint.org.uk

=====  
Register on our website <https://tinyurl.com/yb6rnkyb> and check 'Yes' to receive marketing emails, which will include updates from the Editor-in-Chief as well as most-read and new articles.  
=====

**Date Sent:** 16-Apr-2020

**File 1:** \* [CopyrightAssignment.pdf](#)

**File 2:** \* [ICMJE-Disclosure-form.pdf](#)



## Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model.

### Abstract

**Aims:** Achilles tendon injuries are a frequent problem in orthopedic surgery due to their limited healing capacity and controversial surgical treatments. In recent years, tissue engineering research has focused on the development of biomaterials that could improve this healing process. The aim of this study was to analyze the effect of tendon augmentation with a nanostructured fibrin-agarose hydrogel (NFAH) or genipin crosslinked nanostructured fibrin-agarose hydrogel (GP-NFAH), on the healing process of the Achilles tendon in rats.

**Materials and Methods:** NFAH, GP-NFAH and MatriDerm® (control) scaffolds were generated (n=5 in each group). A biomechanical and cell-biomaterial-interaction characterization of these biomaterials was then performed: Live/Dead® Cell Viability Assay, water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay and DNA-released after 48 hours. Furthermore, a complete section of the left Achilles tendon was made in 24 Wistar rats. Animals were divided into 4 treatment groups (n=6 in each group): direct repair (Control), tendon repair with MatriDerm® or NFAH or GP-NFAH. Animals were euthanized for further histological analyses after 4 and 8 weeks post-surgery. The Achilles tendons were harvested and a histopathological analysis was performed.

**Results:** Tensile test revealed that NFAH and GP-NFAH had significantly higher overall biomechanical properties compared to MatriDerm®. Moreover, biological studies confirmed a high cell viability in all biomaterials, especially in NFAH. In addition, *in vivo* evaluation of repaired tendons by using biomaterials (NFAH, GP-NFAH and MatriDerm®) resulted in better organization of the collagen fibers and cells alignment without clinical complications than direct repair with better histological score in GP-NFAH.

**Conclusion:** This study demonstrated that NFAH and GP-NFAH could improve tendon healing following a surgical repair. However, future studies are needed to determine the potential clinical usefulness of these engineered strategies.

### Keywords

Tissue Engineering; tendon repair; fibrin-agarose hydrogels; nanostructured biomaterials; *in vivo* tissue regeneration, orthopedic surgery.

## 1. Introduction

Tendons are biomechanically stable functional organs which efficiently connect the skeletal muscles to the bone system allowing the locomotion and postural functions. Histologically, these organs are mainly composed of a collagen-rich extracellular matrix (ECM), a few amounts of none fibrillar ECM molecules and cells. Collagens fibers, especially collagen type I, are highly organized and arranged in a hierarchical manner while none fibrillar ECM provide organization and hydration to this highly dense ECM. These ECM molecules are synthesized by specialized cells, called tenocytes, which reside within the collagen fascicles or in the periphery <sup>1</sup>.

The structure and function of tendons is often affected by tendinopathies and acute traumatic injuries <sup>2</sup>. The Achilles tendon is the largest and biomechanically strongest tendon of the body. However, it is one of the most frequently ruptured tendons in humans. This tendon is subjected to a continuous loading that leads to the development of degenerative changes which is predisposed to rupture <sup>3,4</sup>. The growing interest in recreational sports, has led to an increase in the incidence of Achilles injuries in patients of different age groups <sup>5</sup>. Moreover, it seems that activity level is also an important risk factor for tendon rupture <sup>6</sup>.

There is no consensus for the optimal treatment of these lesions <sup>7</sup>. Recent studies suggest that non operative treatment offers satisfactory outcomes with fewer soft-tissue complications <sup>8</sup>. However, in younger and physically demanding patients, it is preferable to perform an open or percutaneous repair of the tendon <sup>9</sup>.

The biological etiology and healing process of these injuries remains poorly understood and repaired tendons never achieve pre-injured status <sup>10</sup>. The use of tissue engineering strategies could improve the outcome of these injuries and potentially become a key factor for the treatment of these injuries <sup>11</sup>. Our research group has previously developed a fibrin-agarose based hydrogel with promising *ex vivo* and *in vivo* outcomes in other tissues and organs <sup>12-14</sup>. In addition, it has been recently demonstrated that the structural and biomechanical properties of these biomaterials could be improved and controlled by using chemical cross-linkers agents and nanostructuring technique suggesting its potential use in tendon repair <sup>15,16</sup>.

For all the above reasons, we hypothesize that the use of a nanostructured fibrin-agarose based hydrogel in an Achilles surgical repair could enhance tendon healing, resulting in better tissue regeneration and organization at the histological level, especially with crosslinked biomaterials. Accordingly, the main objective of this study was to develop and characterize *in vitro* a nanostructured fibrin-agarose based hydrogel and to investigate the potential usefulness of these biomaterials in tendon repair *in vivo*. In addition, we compared these results with a collagen-elastin matrix (MatriDerm<sup>®</sup>), which showed promising results in tendon injuries in humans <sup>17</sup>.

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Ex vivo* biomaterials characterization

#### 2.1.1 *Biomaterials generation*

Following previously described protocols, 22.8 ml of human plasma, 2.25 ml of phosphate buffered saline (PBS) and 450  $\mu$ l of tranexamic acid (Amchafibrin, Fides-Ecofarma, Valencia, Spain) were used to obtain 30 ml of fibrin-agarose based hydrogel (FAH)<sup>12,13</sup>. To promote gelation, the solution was mixed with 3 ml of 2% CaCl<sub>2</sub> and 1.5 ml of melted 2% type-VII-agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The solution was carefully mixed and kept in 55 mm Petri dishes until complete gelation during 1 hour under standard culture conditions (37°C and 5% CO<sub>2</sub>). The hydrogels were placed between a couple of nylon filter membranes with a pore size of 0.22  $\mu$ m (Merck-Millipore Darmstadt, Germany) and compressed between a pair of absorbent pieces of paper below a flat glass device according to previously described procedures<sup>15</sup>. After applying a uniform mechanical pressure (500 g) for 3 min, we obtained a high-density membrane-like nanostructured fibrin-agarose hydrogel (NFAH) with 50-60  $\mu$ m thickness.

To improve the structural and biomechanical properties, these constructs were subjected to chemical cross-linking with genipin (GP) in bath water at 37°C during 72h in darkness as previously reported<sup>16</sup>. The GP was dissolved in PBS (0.1 M, pH 7.2-7.4) and used at a final concentration of 0.1% w/v. After the cross-linking with GP, the constructs were washed during 24h with PBS obtaining a GP cross-linked nanostructured fibrin-agarose hydrogel (GP-NFAH).

#### 2.1.2 *MatriDerm*<sup>®</sup>

MatriDerm<sup>®</sup> (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Germany) is a tridimensional matrix of collagen with elastin approved for clinical use. The collagen (type I, III and IV) is obtained from bovine dermis and the elastin is collected from bovine paddywhack by hydrolyzation. It is a biocompatible crosslinking matrix which modulates the scar tissue with hemostatic properties and limited mechanical stability.

#### 2.1.3 *Biomechanical evaluation*

NFAH, GP-NAH and MatriDerm<sup>®</sup> biomaterials were subjected to a tensile test with a universal testing machine (Instron, Model 5943, Needham, MA, USA). The biomaterials (30 mm x 10 mm x 0.05-0.06 mm) were orientated with their length along the direction of tension and clamped at each end, leaving a constant distance of 1 cm between the clamp, according to previously described protocols<sup>18</sup>. The tests were run at a constant strain rate of 5 mm/min at room temperature. Young's modulus was calculated as the tangent modulus of the initial linear portion of the stress-strain curve of each experimental run, while the stress at break ( $\sigma$  break) and the strain at break ( $\epsilon$  break) values were determined by selecting the point of the stress-strain curve where the fracture occurred. A 50 N load cell sampling was used to obtain the data. For tensile test n=5 was used for each biomaterial.

#### 2.1.4 Cell-biomaterial interaction assessment

Tendon-derived fibroblasts were isolated from rat tails' tendons obtained from 3 independent animals. Tendons were carefully dissected and cleaned from the surrounded connective tissue, mechanically fragmented into small pieces and digested with 0.3% type I collagenase solution (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) for 7 hours at 37°C. Cells were isolated by centrifugation and cultured in basal medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] and antibiotic-antimycotic cocktail solution at 37°C and 5% carbon dioxide. The culture media was renewed every 3 days, and cells were maintained until the cultures reached a confluence of 80%. In this study, the most viable and functional cells were chosen for the cell-biomaterial interaction analyses.

Tendon-derived fibroblasts from passage 4-6 were cultured on top of the different biomaterials generated in this study at  $2 \times 10^4$  cell/scaffold. For the assessment of the cell function and viability, the following assays were performed as previously described<sup>15,16</sup>: Live/Dead® Cell Viability Assay (Viability/Cytotoxicity kit; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) assay and DNA-released after 48 hours.

These analyses were done in quintuplicate. Tendon-derived fibroblasts cultured on chamber slides were used as positive technical controls (2D positive controls), while cells seeded and incubated with 2% Triton X-100 were used as technical negative controls (2D negative controls).

### 2.2 In vivo evaluation

#### 2.2.1 Laboratory animals

Twenty-four 12-week-old male Wistar rats weighing 250-300 g were provided and maintained in the Experimental Unit of the University Hospital Virgen de las Nieves in Granada (Spain). This work was conducted under the approval of the University of Granada Ethical Committee (Approval Number: 231-CEEA-OH-2018). During the whole study, animals were kept in individual cages in a temperature-controlled room ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ), on a 12h light/dark cycle with *ad libitum* access to tap water and standard rat chow.

#### 2.2.2 Surgical procedure and experimental groups

The summary of all experimental groups is presented in Figure 1. The surgical procedure was performed under general anesthesia (intraperitoneal injection of acepromazine, ketamine and atropine). The skin was shaved and disinfected with a povidone iodine 10% solution.

Under sterile conditions, a longitudinal incision was made above the gastrocnemius muscle to calcaneus bone on the left leg of each animal. Animals were randomly assigned to the following experimental and control conditions (n=6 each).

- Control group (Control): central portion of the Achilles tendon was cut and immediately sutured using a modified Kessler method with 4-0 Nylon suture.
- Collagen/elastin matrix group (MatriDerm®): the injury was repaired as described in the

Control group and subsequently wrapped up with a commercially available MatriDerm® sheet.

- Nanostructured fibrin-agarose group (NFAH): repaired tendons were wrapped using a NFAH membrane, which was previously generated as described above.
- Genipin cross-linked NFAH group (GP-NFAH): in which repaired tendons were wrapped, following the same technique described above, with a GP-NFAH membrane.

In all groups, tendons were repaired by the same orthopedic surgeon (DGQ) using the same surgical technique. The plantar tendon was used as internal splitting. The skin was closed with interrupted nonabsorbable sutures. Postoperatively, the rats were maintained in individual cages and allowed to move without restrictions. Repaired tendons were harvested from each group at 4 and 8 weeks after surgery (n=3 each). These cut-off points were selected according to previous publications which suggest that the histological structure and biomechanical properties of the repaired tendons in this specie approach those of native ones from 8 weeks onward. Therefore, further time points are less recommended<sup>19</sup>.

#### 2.2.3 Achilles functional index (AFI)

The Achilles functional index was used to evaluate the functionality of the rats<sup>20</sup>. The hind paws were painted with water based blue ink and allowed to go through an enclosed walkway of approximately 80 cm long and 10 cm wide on white paper. Tracks were measured and quantified and we calculated the AFI using Murrell's formula. Prints were obtained at postoperative weeks 4 or 8 for every rat from each experimental group.

#### 2.2.4 Macroscopic and Histological analyses

The normal and repaired Achilles tendons were harvested from each animal after euthanasia, fixed in 10% buffered formalin, macroscopically analyzed and finally longitudinally embedded in paraffin wax. For histological analysis, the samples were serially cut at 5 mm thickness using a microtome and the sections were dewaxed, hydrated and stained with hematoxylin and eosin (H&E), Alcian blue (acid proteoglycans), Masson's trichrome and picosirius red (fibrillar collagen fibers) for histological assessment<sup>21</sup>. In addition, the expression of CD45 or leukocyte common antigen (Abcam, Cambridge, UK) was determined by indirect immunohistochemistry for the identification of inflammatory cells within the repaired and regenerating tendons. Micrographs from all groups were captured at the sutured region by using a Nikon Eclipse 90i microscope (Tokyo, Japan).

Cellularity was determined in controls (Native, CTR) and experimental conditions (MatriDerm®, NFAH and GP-NFAH) with Image J software (National Institutes of Health, USA) following a previously described quantitative procedure<sup>18,22</sup>. Briefly, the nuclear staining with H&E in all histological sections stained with H&E were used and the nuclear staining, which indicate the location of the cells, was selected by using the threshold function of the software. Once the cell nuclei were

1  
2  
3 selected, the images were converted into binary format and then the percentage of cell nuclei by  
4 analyzed area, or area fraction, was automatically calculated with measure function of the Image J  
5 software. This analysis was conducted with all the animals corresponding to each group and time (n=3).

6  
7  
8         Historical scoring analysis was performed with a grading system designed by Stoll <sup>23</sup> and  
9 modified by our research group (Table 1). A non-injured or native Achilles tendon scored 18 points  
10 using this scale.

### 11 12 13         2.3 Statistical analysis

14  
15         Statistical analyses were performed using SPSS 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and  
16 G\*power 3.0.10 (Universität Kiel, Germany). Categorical variables were presented as absolute values  
17 and percentages respectively. Means were presented with their corresponding standard deviation  
18 (SD). Shapiro-Wilk test was applied to determine the normal distribution. Variables were not normally  
19 distributed and therefore differences among several experimental groups were determined by using  
20 the Kruskal-Wallis test followed by post-hoc group-to-group analysis using the Mann-Whitney test.  
21 Correction for multiple comparisons was performed using Bonferroni-adjusted p values. For WST-1  
22 and DNA, p values below 0.00454 were considered as statistically significant, whilst p values below  
23 0.00138 were considered for the cellularity and histological score. In all cases, p values between the  
24 significance threshold and 0.05 were considered as marginally significant. All test were performed  
25 double tailed.

## 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37         3. Results

### 38         3.1 Ex vivo biomaterials properties

#### 39         3.1.1 Tensile test results

40  
41         The evaluation of the Young's modulus showed higher average values in MatriDerm<sup>®</sup> followed  
42 by GP\_NFAH and lastly NFAH (Table 2). The Kruskal-Wallis test revealed statistically significant  
43 differences among the three groups (p=0.00242) with all comparisons being marginally significant (p-  
44 values between 0.05 and 0.00416) (Table 2). Concerning the stress at fracture values, results were  
45 higher in NFAH than the other biomaterials (Table 2) with p=0.01624 for Kruskal-Wallis test.  
46 Differences were marginally significant between NFAH and MatriDerm<sup>®</sup> (p=0.04720) and GP-NFAH  
47 (p=0.00902), but not between MatriDerm<sup>®</sup> and GP-NFAH (p=25059) (Table 2). Similarly, the  
48 deformation capability of the biomaterials, or strain at fracture, was higher with the NFAH than the  
49 other biomaterials, with p<0.00001 for Kruskal-Wallis test, being all differences among biomaterials  
50 marginally significant (Table 2).

#### 51 52 53 54 55 56 57         3.1.2 Ex vivo biocompatibility

1  
2  
3 Functional and morphological analyses with LD showed viable cells (green fluorescence) in all  
4 biomaterials used in this study (Figure 2). In the MatriDerm® group, elongated tendon-derived  
5 fibroblasts were observed in biomaterials surface, but the number of cells decreased compared to  
6 NFAH group. The analysis of NFAH group, revealed fusiform and flat fibroblasts attached to the surface  
7 of the biomaterials with comparable morphology to native fibroblasts or cells cultured in 2D culture  
8 conditions used as a technical positive control group during the first 48h analyzed (Figure 2).  
9 Interestingly, less numbers of cells were observed attached to GP crosslinked NFAH (GP-NFAH group)  
10 as compared to the other experimental conditions and controls (Figure 2).  
11

12  
13 The biochemical analysis of the cell metabolic activity carried out with WST-1 assay showed  
14 significant differences with Kruskal-Wallis test ( $p < 0.00001$ ). The WST-1 normalized values obtained  
15 within the cells cultured on top of the three biomaterials and within the positive technical control were  
16 significantly higher than the negative technical control ( $p < 0.00001$ ) (Figure 3). Values for the technical  
17 positive control represented 100% and differences were not statistically significant with MatriDerm®  
18 (105%,  $p = 1.000$ ) and NFAH (100%,  $p = 85373$ ) (Figure 3). However, the WST-1 values obtained with the  
19 cells cultured on top of GP-NFAH (73%) were significantly lower than the positive technical control  
20 ( $p = 0.00203$ ) and MatriDerm® ( $p = 0.00009$ ) and marginally significant as compared to the NFAH  
21 ( $p = 0.01103$ ) (Figure 3).  
22

23  
24 The spectrophotometric analysis of the released DNA revealed the irreversible nuclear  
25 membrane damage (Figure 3). DNA was not released into the culture media (0%) in the 2D positive  
26 controls, while 100% of DNA was released into the culture media in the 2D negative control group  
27 where cell cultures were treated with 2% Triton X-100. In this study, Kruskal-Wallis test revealed  
28 significant differences ( $p < 0.00001$ ). Cells cultured within the biomaterials and in 2D (positive technical  
29 control) released less than 1% of the DNA content as compared to the technical negative control being  
30 these differences statistically significant ( $p < 0.00001$ ) (Figure 3). In addition, biomaterials showed  
31 higher values as compared to the positive control group, these differences were statistically significant  
32 for MatriDerm® ( $p = 0.00012$ ), marginally significant for GP-NFAH ( $p = 0.01072$ ) and not significant for  
33 NFAH ( $p = 0.37235$ ) (Figure 3). Interestingly, DNA normalized values were higher in MatriDerm® and GP-  
34 NFAH than the use of NFAH, being these differences statistically significant for MatriDerm®  
35 ( $p = 0.00002$ ) and marginally significant for GP-NFAH ( $p = 0.01702$ ). Finally, no statistically significant  
36 differences were found between MatriDerm® and GP-NFAH ( $p = 0.18412$ ) (Figure 3).  
37

### 3.2 In vivo results

#### 3.2.1 Functional results

38  
39 The clinical evaluation of animals subjected to tendon repair revealed a correct wound closure  
40 without any complications. In addition, there was no limitation of movements in their cages and the  
41 operated legs were fully loaded with normal sensitivity. Furthermore, the AFI showed no functional  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 affection in all operated animals, which were closely comparable to healthy animals used as control  
4 group (data not shown).  
5

### 6 **3.2.2 Macroscopy**

7  
8 The general appearance of the harvested tendons showed a loss of their brightness which is  
9 characteristic in native condition. In addition, all repaired tendons showed slight signs of connective  
10 tissue edema, although some of them were found with minor adhesions to the surrounding tissues  
11 (skin) and we did not observe any signs of tissue necrosis, inflammation, tendon rupture or  
12 deformation during the analyzed period.  
13  
14

15  
16 Regarding their shape and dimensions, repaired tendons were slightly elongated and thicker  
17 (Figure 4). The macroscopic analysis showed that all biomaterials used were integrated or reabsorbed  
18 after 4 and specially 8 weeks after surgery.  
19

### 20 **3.2.3 Histology**

21  
22 The histological analysis carried out with H&E staining at 4 and 8 weeks revealed an active  
23 tissue regeneration process as well as increase in cellularity in the repaired tendons as compared to  
24 native condition (Figure 5). After 4 weeks, some inflammatory elements were observed in the repaired  
25 zone, especially in control and MatriDerm® groups (Figure 5). In addition, a loss of tissue alignment  
26 and an increase of blood vessels in the repaired zone of all operated animals was observed (Figure 5).  
27 The analyses at 8 weeks showed a decrease of the cell content and a considerable improvement of  
28 tissue alignment and vascularization. Finally, no histopathological changes, such as foreign body  
29 reaction, chronic inflammation or necrosis, were observed during the 8 weeks studied in all  
30 experimental conditions (Figure 5).  
31  
32

33  
34 The quantitative histological evaluation of cellularity, conducted in H&E stained sections,  
35 confirmed the histological findings described above, meaning higher cellularity in operated tendons,  
36 at 4 and 8 weeks, than native condition. The Kruskal-Wallis test showed marginally significant  
37 differences at 4 (p=0.00822) and 8 (p=0.01897) weeks after tendon repair. The increase of the cell  
38 content observed after 4 weeks in all repaired tendons as compared to native group was marginally  
39 significant (Figure 6). In addition, a clear decrease in the amount of cells was observed between the  
40 4<sup>th</sup> and the 8<sup>th</sup> week. In all repaired tendons, all differences were marginally significant (Figure 6). The  
41 analysis conducted at 4 weeks showed higher cell content values in CTR group (26.31 ± 5.62), followed  
42 by NFAH (16.55 ± 2.25), MatriDerm® (14.83 ± 0.91) and GP-NFAH (13.80 ± 3.80) groups, being all these  
43 differences marginally significant (Figure 6). The analysis performed at 8 weeks showed that cellularity  
44 was comparable between all operated conditions without significant statistical differences (p>0.05)  
45 (Figure 6) except for MatriDerm® (8.59 ± 1.89) and GP-NFAH (5.82 ± 0.36) groups, whose differences  
46 were marginally significant (Figure 6).  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 The histochemical evaluation of acid proteoglycans by Alcian blue staining revealed an  
4 important increase of the no fibrillar ECM molecules during tendon healing without differences  
5 between experimental conditions at 4 weeks (Figure 7). After 8 weeks, it was possible to observe a  
6 considerable decrease of these components in some areas of the healing tendons, especially when GP-  
7 NFAH augments were used (Figure 7).  
8  
9

10  
11 The histochemical analysis of fibrillar collagens conducted by Picrosirius and Masson's  
12 trichrome stainings confirmed the formation of collagens during tendon healing in all groups (Figure  
13 8). Collagen histochemistry demonstrated a progressive synthesis and organization (Picrosirius  
14 polarized light microscopy) in all *in vivo* experimental conditions between 4 to 8 weeks, especially  
15 when GP-NFAH augments were used. However, native tendon patterns were not obtained in any of  
16 the experimental conditions analyzed during the study period.  
17  
18

19  
20 The immunohistochemical identification of CD45 confirmed the presence of few and localized  
21 leukocytes, especially lymphocytes, within the repairing tendons (Figure 8). In this sense, lymphoid  
22 cells were mostly observed in the connective tissue surrounding the blood supply and especially  
23 associated to the suture material. These cells were less abundant in NFAH and GP-NFAH than in  
24 MatriDerm® and Control groups respectively, being these results in agreement with conventional  
25 histological analyses described above (Figure 8).  
26  
27

28  
29 The histological and histochemical findings were in accordance with the results obtained with  
30 the histological score system used (Figure 9). Indeed, marginally significant differences at 4 weeks  
31 ( $p=0.01495$ ) and statistically significant at 8 weeks ( $p=0.00027$ ) were obtained with the Kruskal-Wallis  
32 test. Moreover, this score system showed that none of the operated conditions, in both time periods.  
33 Reached to native tissue score ( $18 \pm 0$ ), being all these differences statistically significant (Figure 9).  
34 The analysis conducted at 4 weeks showed higher score values in GP-NFAH group ( $14.22 \pm 1.99$ ) and  
35 NFAH group ( $12.00 \pm 1.94$ ), while the score values in control ( $11.33 \pm 1.12$ ) and MatriDerm® ( $11.00 \pm$   
36  $1.73$ ) groups were lower. The differences between GP-NFAH group and the other experimental  
37 conditions were marginally significant, and no statistically significant were observed between the  
38 other experimental conditions (Figure 9). Although the values obtained at 8 weeks did not reach the  
39 native score values, an increase was observed in the GP-NFAH ( $15.78 \pm 1.39$ ), NFAH ( $14.33 \pm 2.24$ ) and  
40 control ( $14.33 \pm 0.71$ ) groups, but not in MatriDerm® group ( $11.78 \pm 1.30$ ), whose values remained the  
41 lowest (Figure 9). Differences at 8 weeks were statistically significant between GP-NFAH and  
42 MatriDerm® group ( $p=0.00031$ ) and marginally significant between NFAH and MatriDerm®  
43 ( $p=0.01353$ ) and GP-NFAH ( $p=0.02454$ ) groups (Figure 9).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### 4. Discussion

1  
2  
3 The aim of this study was to characterize and evaluate a fibrin-agarose based hydrogel that  
4 could be used to improve the repair of ruptured tendons. In this context, the use of fibrin-agarose  
5 based hydrogels could help to decrease the cellularity and inflammatory host response in repaired  
6 tendons and encourage tissue alignment and organization without clinical complications.  
7  
8

9  
10 The tensile analysis of the studied biomaterials demonstrated their biomechanical capability  
11 to be surgically manipulated and wrapped-up in the repaired site. Although these substitutes have not  
12 the biomechanical properties of the Achilles tendon, we demonstrate that these biomaterials have  
13 enough biomechanical stability, deformation and resistance capability to be used in tendon repairs,  
14 especially the use of fibrin-agarose based hydrogels.  
15  
16

17  
18 In recent years, tissue engineering has emerged as a potential solution to many medical  
19 conditions <sup>24</sup>. In orthopedics, this discipline has provided solutions to orthopedic surgeons against  
20 tendon injuries by applying growth factors, stem cells, and natural or synthetic biomaterials <sup>25–27</sup>. In  
21 addition, tendon injuries may also benefit from the application of nanotechnology in orthopedic  
22 surgery <sup>22,28</sup>. Furthermore, in a recent meta-analysis of the different biomaterials used for the  
23 treatment of tendon injuries in animal models, it was demonstrated that different tissue engineering  
24 strategies can accelerate the healing process and produce a biomechanical behavior of repaired  
25 tendons comparable to native ones <sup>29</sup>.  
26  
27

28  
29 The use of hydrogels for tendon injuries has been previously described <sup>30</sup>. An injectable  
30 tendon-derived hydrogel has been used in the surgical repair of sectioned tendons in animal models,  
31 showing an improvement of the collagen organization and biomechanical results <sup>31</sup>. Moreover, another  
32 thermo-responsive in-situ forming hydrogel was used in an animal tendon injury model and prevented  
33 post-operative adhesions <sup>32</sup>. In another report, a new tendon-derived hydrogel supplemented with  
34 platelet-rich plasma resulted in an improved of the adipose mesenchymal stem cells migration *in vitro*  
35 <sup>33</sup>.  
36  
37

38  
39 In the present study, we used NFAH for tendon repair. This biomaterial was successfully used  
40 in several biomedical applications (such as skin, cornea, cartilage, sclera and nerve tissue engineering)  
41 which confirmed their high biocompatibility and pro regenerative properties *ex vivo* and *in vivo*  
42 <sup>13,14,16,22,34</sup>. In our study, tendon-derived fibroblasts showed an active cell adhesion, high metabolic  
43 activity and low DNA-release in all the analyzed experimental conditions which were compared with  
44 the control groups. These new results are in line with our previous study in which NFAH and GP-NFAH  
45 supported fibroblast function and proliferation *ex vivo* <sup>16</sup>. From the biomechanical point of view, the  
46 cross-linking with GP significantly improved the biomechanical properties of NFAH, which is in  
47 concordance with previous reports <sup>35</sup>. In addition, it was demonstrated that GP-NFAH *ex vivo*  
48 cytocompatibility values were also superior than the results observed with fibroblast cultured within  
49 NFAH cross-linked with glutaraldehyde, being in agreement with previous studies <sup>36</sup>. Indeed, the use  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 of GP concentrations between 0.1-0.5% showed an improvement of the FAH and NFAH overall  
4 biomechanical properties, with an acceptable degree of *in vitro* cytocompatibility. In this sense, the  
5 high tendon-derived fibroblast viability and functionality observed with GP-NFAH is in line with our  
6 previous studies. Overall results and previous studies demonstrating that GP is closely comparable to  
7 the cytocompatibility of NFAH and MatriDerm® or similar biomaterials, supporting that GP-NFAH could  
8 be an adequate option to achieve tendon healing<sup>37</sup>.  
9

10  
11  
12  
13 It is well known that the disruption of tendon architecture, due to injury or repair, could lead  
14 to the invasion of the surrounding connective tissue resulting in the formation of adhesions, thus  
15 decreasing its biomechanical response<sup>38</sup>. In this regard, this *in vivo* study confirmed that the use of  
16 biomaterials, especially GP-NFAH, helped to efficiently reduce connective tissue infiltration.  
17 Furthermore, a clear improvement of the tissue regeneration and alignment was obtained when these  
18 biomaterials were used. Histologically, the analysis of the ECM revealed the active synthesis and  
19 reorganization of fibrillar collagen fibers and proteoglycans. The increase in proteoglycan  
20 concentrations observed in all repaired tendons confirmed an active but immature tendon healing  
21 process during the analyzed period. In fact, proteoglycans are crucial for the progressive 3D  
22 organization of collagens during tissue maturation and the tendon healing process<sup>39,40</sup>. Interestingly,  
23 a proteoglycan decrease occurred when GP-NFAH were used, suggesting that this biomaterial could  
24 promote a faster tissue regeneration, collagen alignment and stabilization. Our results are supported  
25 by the use of biomimetic scaffolds which showed comparable cell density, fibers alignment and  
26 biomechanical properties to native tendons<sup>41,42</sup>. Finally, our results demonstrate that the use of NFAH  
27 or GP-NFAH could be a safe alternative in the repair of tendon injuries. These biomaterials probably  
28 provide a close and controlled regenerative microenvironment with an adequate biodegradation rate  
29 that supports intrinsic tissue regeneration. In addition, only a local and transitory slight inflammatory  
30 reaction was observed by conventional histology and immunohistochemistry (CD45 positive cells)  
31 without any signs of foreign body reaction to the implanted NFAH or GP-NFAH. This reaction was  
32 observed in all operated animals being less abundant in tendons repaired with biomaterials, especially  
33 NFAH and GP-NFAH. These histological results confirm the high *in vivo* biocompatibility and  
34 biodegradability of NFAH and GP-NFAH in tendon repair being in line with the host tissue response  
35 observed with the use of NFAH in scleral repair and other biopolymers<sup>43-45</sup>.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 Despite the current advances in tendon healing research and tissue engineering, the optimal  
53 treatment of a tendon rupture remains controversial<sup>46</sup>, and an efficient alternative for these patients  
54 is still needed. Current research suggests that biomaterials could also play an important role in tendon  
55 gap bridging in chronic ruptures<sup>47</sup>. However, these strategies are currently at an early stage of  
56 development, because the treatment response may differ significantly between different species  
57 making it difficult to extrapolate the experimental results to the humans<sup>29,48</sup>.  
58  
59  
60

1  
2  
3 To the best of our knowledge, this is the first study that reports the potential value of fibrin-  
4 agarose based hydrogels as surgical augments in tendon repairs. In addition, the biocompatibility of  
5 these hydrogels was evaluated *ex vivo* and *in vivo*. This strategy offers the possibility to create  
6 autologous and customized biomaterials for tendon repair by using a biomaterial approved for clinical  
7 use by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (AEMPS). The fibrin hydrogels can be  
8 easily obtained from a small volume of blood and supplemented with a very low concentration of  
9 agarose just prior to surgery, this being a clear advantage as compared with synthetic and predefined  
10 polymer-based scaffolds, commonly used in regenerative medicine.

11  
12 Nevertheless, the present study had some limitations. First, the observation period was  
13 relatively short and a partial tendon regeneration was obtained, being these results confirmed by the  
14 histological score system used. In this sense, future studies are necessary to determine the time  
15 needed to obtain a complete tendon healing by using the fibrin-agarose based hydrogels. Secondly, an  
16 additional limitation of this study is the number of animals used, in fact more clear significant  
17 differences could be obtained with a higher number of animals. Concerning the animal model, the  
18 anatomy (dimensions) and regenerative properties of the rats Achilles tendon are not comparable to  
19 the most frequently injured tendons in humans, and therefore large animals should be explored. In  
20 addition, future studies are needed to elucidate the molecular processes involved in the differences  
21 observed between the different biomaterials used.

22  
23 In conclusion, this study demonstrates that the use of NFAH or GP-NFAH in tendon repairs  
24 could improve tendon healing at the histological level reducing the initial cellularity, supporting tissue  
25 regeneration, and accelerating ECM maturation without clinical complications. All these results  
26 suggest that these nanostructured biomaterials could be potentially used to improve tendon repairs.  
27 However, further studies are still required to determine the potential clinical usefulness of NFAH or  
28 GP-NFAH in the human tendon repair.

#### 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 **Take Home Message:**

- 48 - Our findings indicate that fibrin-agarose based hydrogels improve tendon healing and could  
49 be used to augment tendon repairs.
- 50 - No signs of clinical complications or adverse effects were observed.

#### 51 52 53 54 55 56 57 **References**

- 58 1. **Thorpe CT, Screen HRC.** Tendon Structure and Composition. In: Ackermann PW, Hart  
59 DA, eds. *Metabolic Influences on Risk for Tendon Disorders*. Cham: Springer International  
60

1  
2  
3 Publishing, 2016

- 4 2. **Dakin SG, Newton J, Martinez FO, Hedley R, Gwilym S, Jones N, et al.** Chronic  
5 inflammation is a feature of Achilles tendinopathy and rupture. *Br J Sports Med* 2017;bjsports-  
6 2017-098161.
- 7 3. **Cooper MT.** Acute Achilles Tendon Ruptures. *Clin Sports Med* 2015;34(4):595–606.
- 8 4. **Maffulli N, Wong J.** Rupture of the Achilles and patellar tendons. *Clin Sports Med*  
9 2003;22(4):761–776.
- 10 5. **Lantto I, Heikkinen J, Flinkkilä T, Ohtonen P, Leppilahti J.** Epidemiology of Achilles  
11 tendon ruptures: Increasing incidence over a 33-year period: Clinical relevance level IV. *Scand*  
12 *J Med Sci Sports* 2015;25(1):e133–e138.
- 13 6. **Noback PC, Jang ES, Cuellar DO, Seetharaman M, Malagoli E, Greisberg JK, et al.** Risk  
14 factors for achilles tendon rupture: A matched case control study. *Injury* 2017;48(10):2342–  
15 2347.
- 16 7. **Holm C, Kjaer M, Eliasson P.** Achilles tendon rupture - treatment and complications: A  
17 systematic review: Treatment of Achilles tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports*  
18 2015;25(1):e1–e10.
- 19 8. **Kadakia AR, Dekker RG, Ho BS.** Acute Achilles Tendon Ruptures: An Update on  
20 Treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 2017;25(1):23–31.
- 21 9. **Movin T, Ryberg Å, McBride DJ, Maffulli N.** Acute Rupture of the Achilles Tendon. *Foot*  
22 *Ankle Clin* 2005;10(2):331–356.
- 23 10. **Thevendran G, Sarraf KM, Patel NK, Sadri A, Rosenfeld P.** The ruptured Achilles  
24 tendon: a current overview from biology of rupture to treatment. *Musculoskelet Surg*  
25 2013;97(1):9–20.
- 26 11. **Hogan MV, Bagayoko N, James R, Starnes T, Katz A, Chhabra BA.** Tissue engineering  
27 solutions for tendon repair. *J Am Acad Orthop Surg* 2011;19(3):134–142.
- 28 12. **Alaminos M, Sánchez-Quevedo MDC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S,**  
29 **Carreras I, et al.** Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose  
30 Scaffold. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2006;47(8):3311.
- 31 13. **Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, et al.** *In vitro*  
32 characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute:  
33 Nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med*  
34 2017;11(5):1412–1426.
- 35 14. **García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, Sánchez-Quevedo MDC, Garzón I,**  
36 **Alaminos M, et al.** Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in  
37 nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol* 2017;147(1):83-95.
- 38 15. **Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, Durán JDG, López-López MT,**  
39 **Alaminos M, et al.** *Ex vivo* characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose  
40 hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater* 2016;11(5):055004.
- 41 16. **Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaino G, Rodriguez IA, Duran-Herrera D, López-**  
42 **López MT, et al.** Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models  
43 for tissue engineering applications. *Biomed Mater* 2018;13(2):025021.
- 44 17. **Wetzig T, Gebhardt C, Simon JC.** New Indications for Artificial Collagen-Elastin  
45 Matrices? Covering Exposed Tendons. *Dermatology* 2009;219(3):272–273.
- 46 18. **Carriel V, Garzón I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M.** Differential expression of  
47 GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial  
48 conduits: GAP-43 and neurofilament during nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*  
49 2017;11(2):553–563.
- 50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

19. **Battaglia TC, Clark RT, Chhabra A, Gaschen V, Hunziker EB, Mikic B.** Ultrastructural determinants of murine achilles tendon strength during healing. *Connect Tissue Res* 2003;44(5):218–24.
20. **Murrell GAC, Lilly EG, Davies H, Best TM, Goldner RD, Seaber AV.** The achilles functional index. *J Orthop Res* 1992;10(3):398–404.
21. **Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona J de la C, González-Andrades M, et al.** Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. Connon CJ, ed. *PLoS ONE* 2013;8(6):e66538.
22. **Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno JA, et al.** Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng* 2013;10(2):026022.
23. **Stoll C, John T, Conrad C, Lohan A, Hondke S, Ertel W, et al.** Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation. *Biomaterials* Elsevier Ltd, 2011;32(21):4806–4815.
24. **Lui H, Vaquette C, Bindra R.** Tissue Engineering in Hand Surgery: A Technology Update. *J Hand Surg* 2017;42(9):727–735.
25. **Devana SK, Kelley BV, McBride OJ, Kabir N, Jensen AR, Park SJ, et al.** Adipose-derived Human Perivascular Stem Cells May Improve Achilles Tendon Healing in Rats: *Clin Orthop* 2018;476(10):2091–2100.
26. **Ho JO, Sawadkar P, Mudera V.** A review on the use of cell therapy in the treatment of tendon disease and injuries. *J Tissue Eng* 2014;5:204173141454967.
27. **Wu F, Nerlich M, Docheva D.** Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. *EFORT Open Rev* 2017;2(7):332–342.
28. **Sullivan MP, McHale KJ, Parvizi J, Mehta S.** Nanotechnology: current concepts in orthopaedic surgery and future directions. *Bone Jt J* 2014;96-B(5):569–573.
29. **González-Quevedo D, Martínez-Medina I, Campos A, Campos F, Carriel V.** Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries: a systematic review and meta-analysis of animal models. *Bone Jt Res* 2018;7(4):318–324.
30. **Gonçalves AI, Rodrigues MT, Gomes ME.** Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration. *Acta Biomater* 2017;63:110–122.
31. **Kim MY, Farnebo S, Woon CYL, Schmitt T, Pham H, Chang J.** Augmentation of Tendon Healing with an Injectable Tendon Hydrogel in a Rat Achilles Tendon Model: *Plast Reconstr Surg* 2014;133(5):645e–653e.
32. **Chou P-Y, Chen S-H, Chen C-H, Chen S-H, Fong YT, Chen J-P.** Thermo-responsive in-situ forming hydrogels as barriers to prevent post-operative peritendinous adhesion. *Acta Biomater* 2017;63:85–95.
33. **Crowe CS, Chiou G, McGoldrick R, Hui K, Pham H, Chang J.** Tendon Regeneration with a Novel Tendon Hydrogel: In Vitro Effects of Platelet-Rich Plasma on Rat Adipose-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2015;135(6):981e–989e.
34. **Carriel V, Garzón I, Jiménez J-M, Oliveira C-X, Arias-Santiago S, Campos A, et al.** Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials. *Cells Tissues Organs* 2012;196(1):1-12.
35. **Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI.** Genipin-induced changes in collagen gels: Correlation of mechanical properties to fluorescence. *J Biomed Mater Res A* 2008;87A(2):308–320.
36. **Alfredo Uquillas J, Kishore V, Akkus O.** Genipin crosslinking elevates the strength of electrochemically aligned collagen to the level of tendons. *J Mech Behav Biomed Mater*



2012;15:176–189.

37. **Fessel G, Cadby J, Wunderli S, Weeren R van, Snedeker JG.** Dose- and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics – Toward clinical application for tendon repair. *Acta Biomater* 2014;10(5):1897–1906.

38. **Maffulli N, Longo UG, Sharma P, Denaro V.** Tendon injury and repair mechanics. In: Archer C, Ralphs J, eds. *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues*. Elsevier, 2010.

39. **Stocum DL.** Regeneration of Musculoskeletal Tissues. In: Stocum DL, ed. *Regenerative Biology and Medicine*. Elsevier, 2012.

40. **Iozzo RV, Schaefer L.** Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* 2015;42:11–55.

41. **Chen E, Yang L, Ye C, Zhang W, Ran J, Xue D, et al.** An asymmetric chitosan scaffold for tendon tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation with rat tendon stem/progenitor cells. *Acta Biomater* 2018;73:377–387.

42. **Lin J, Zhou W, Han S, Bunpetch V, Zhao K, Liu C, et al.** Cell-material interactions in tendon tissue engineering. *Acta Biomater* 2018;70:1–11.

43. **Webb WR, Dale TP, Lomas AJ, Zeng G, Wimpenny I, El Haj AJ, et al.** The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model. *Biomaterials* 2013;34(28):6683–6694.

44. **Carriel V, Vizcaíno-López G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, et al.** Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits. *Exp Eye Res* 2019;186:107717.

45. **Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralles E, Durand-Herrera D, Sáez-Moreno JA, et al.** In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front Cell Neurosci* 2018;12:501.

46. **Yang X, Meng H, Quan Q, Peng J, Lu S, Wang A.** Management of acute Achilles tendon ruptures: A review. *Bone Jt Res* 2018;7(10):561–569.

47. **Malagelada F, Clark C, Dega R.** Management of chronic Achilles tendon ruptures—A review. *The Foot* 2016;28:54–60.

48. **Albornoz PM de, Aicale R, Forriol F, Maffulli N.** Cell Therapies in Tendon, Ligament, and Musculoskeletal System Repair: *Sports Med Arthrosc Rev* 2018;26(2):48–58.

## Tables:

Table 1: Histological scoring system

	pt
<i>Collagen fibers / ECM organization</i>	
Normal (wavy, compact, parallel)	3
Mild	2
Moderate	1
Abnormal	0
<i>Cell alignment and distribution</i>	
Normal (uniaxial and homogeneous)	3
Mild	2
Moderate	1
Abnormal	0
<i>Cell nucleus morphology</i>	
Normal (tenocytes)	3
Mild	2
Moderate	1
Abnormal (larger, polymorph...)	0
<i>Degenerative changes/tissue metaplasia</i>	
Normal	3
Mild	2
Moderate	1
Severe	0
<i>Vascularization (angiogenesis)</i>	
Normal	3
Mild	2
Moderate	1
Severe	0
<i>Inflammation</i>	
Normal	3
Mild	2
Moderate	1
Severe	0
<i>Native Tendon</i>	<b>18</b>



**Table 2: Tensile mechanical results and statistical analysis.**

Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) values. Exact *p*-values for Mann-Whitney non-parametric test are presented for each comparison. \* marginally significant *p*-values \*\* statistically significant *p*-values.

		MatriDerm®	NFAH	GP-NFAH
Young's modulus (MPa)	Mean $\pm$ SD	1.54 $\pm$ 0.56	0.26 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.13
	vs. MatriDerm®		0.00902*	0.00902*
	vs. NFAH			0.01629*
Stress at fracture ( $\sigma$ break, MPa)	Mean $\pm$ SD	0.34 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.09	0.26 $\pm$ 0.08
	vs. MatriDerm®		0.04720*	0.25059
	vs. NFAH			0.00902*
Strain at fracture ( $\epsilon$ break, %)	Mean $\pm$ SD	57.38 $\pm$ 8.88	315.00 $\pm$ 59.10	76.43 $\pm$ 9.48
	vs. MatriDerm®		0.00902*	0.02828*
	vs. NFAH			0.00902*

Title and explanation of figures:

**Figure 1: Summary of experimental groups.**

**Figure 2: Tendon-derived fibroblasts behavior in biomaterials surface.** *Fluorescent microscopy of Live/Dead cell viability assay showing viable cells (green) and dead cells (red) in technical controls (2D Pos. CTR and 2D Neg. CTR) and within the biomaterials. Scale bar = 100  $\mu$ m.*

**Figure 3: WST-1 and DNA quantitative and statistical results.** *Graphic and numeric representation of normalized valued for the WST-1 assay and DNA released for each of the 2D controls (CTR+ and CTR-), MatriDerm®, NFAH and GP-NFAH. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) values. Exact *p*-values for Mann-Whitney non-parametric test are presented for each comparison. \* marginally significant *p*-values \*\* statistically significant *p*-values.*

**Figure 4: Macroscopic findings of tendon harvested from native and experimental groups.** *There is a loss of the characteristic brightness of native tendons. Moreover, all repaired tendons showed signs of connective tissue edema with mild elongation. All biomaterials were integrated or reabsorbed without macroscopic adverse effects.*

1  
2  
3 **Figure 5: Hematoxylin and Eosin staining of explanted tendons.** Note the increase of cells in  
4 all experimental conditions. After 4 weeks, inflammatory cells (I) and vessels (V) can be  
5 identified as well as the loss of tissue alignment. After 8 weeks, there is a decrease of the cell  
6 content with an improvement of the tissue alignment which was not comparable to the well-  
7 aligned and organized histological pattern of native tendons. No histopathological adverse  
8 effects were observed. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  (10x) and 100  $\mu\text{m}$  (20x).  
9

10  
11 **Figure 6: Graphic and numeric representation of the cellularity of native and repaired**  
12 **tendons.** Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) values of the percentage  
13 represented by cell nuclei/histological (area fraction) at 4 and 8 weeks. Exact p-values for  
14 Mann-Whitney non-parametric test are presented for each comparison. \* marginally  
15 significant p-values \*\* statistically significant p-values.  
16  
17

18  
19 **Figure 7: Alcian blue, Masson's Trichrome and Picrosirius Red staining of explanted tendons**  
20 **staining of explanted tendons.** Alcian blue staining revealed an increase of non-fibrillar ECM  
21 molecules and proteoglycans (P) during tendon healing without differences between groups.  
22 Observe that a decrease of these components occurred at 8 weeks. Masson's Trichrome and  
23 Picrosirius Red staining (polarized microscopy) confirmed the formation of collagen (C) in all  
24 experimental conditions with a better alignment when biomaterials were used as  
25 augmentation strategy, especially at 8 weeks. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .  
26  
27

28  
29 **Figure 8: CD45 expression in repaired tendons.** In brown, it is possible to observe the presence  
30 and the tissue distribution of some leukocytes (L), especially lymphocytes which were found  
31 within the vascular connective tissue (V) and surrounding the suture material (S). Scale bar =  
32 200  $\mu\text{m}$ .  
33  
34

35  
36 **Figure 9: Graphic and numeric representation of the histological score in native and repaired**  
37 **tendons.** Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation (SD) values. Exact p-values for  
38 Mann-Whitney non-parametric test are presented for each comparison. \* marginally  
39 significant p-values \*\* statistically significant p-values.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

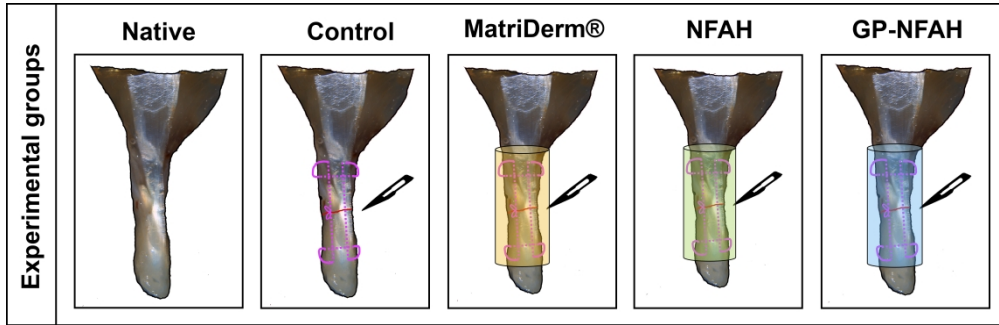


Figure 01

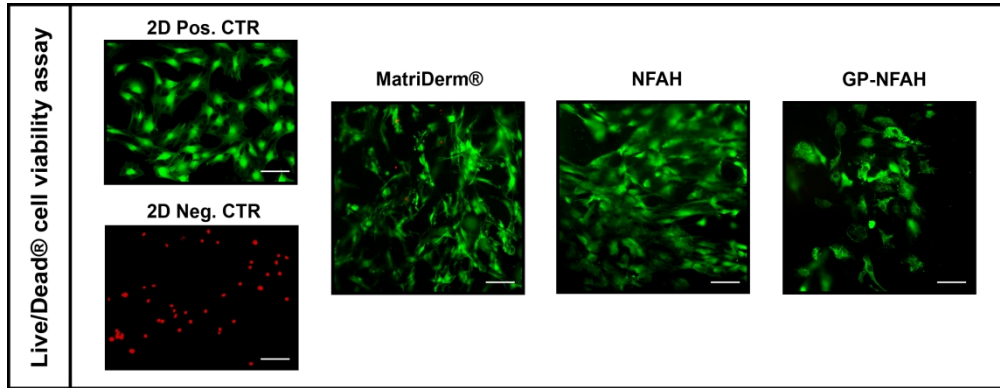
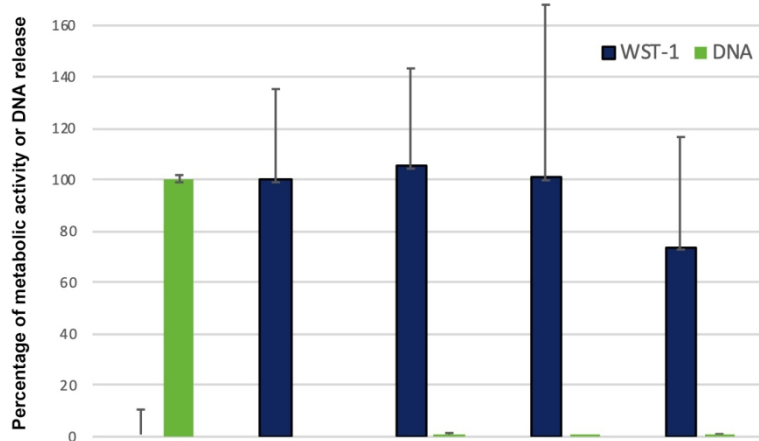


Figure 02

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



		CTR-	CTR+	MatriDerm®	NFAH	GP-NFAH
<b>WST-1</b>	<b>Mean ± SD</b>	<b>0.00 ± 10.57</b>	<b>100.00 ± 35.27</b>	<b>105.31 ± 37.99</b>	<b>100.77 ± 67.31</b>	<b>73.83 ± 42.79</b>
<b>p-values</b>	vs. CTR-		<0.00001**	<0.000001**	<0.00001**	<0.00001**
	vs. CTR+			1.00000	0.85373	0.00203**
	vs. MatriDerm®				0.90732	0.00009**
	vs. NFAH					0.01103*
<b>DNA</b>	<b>Mean ± SD</b>	<b>100.00 ± 1.81</b>	<b>0.00 ± 0.35</b>	<b>0.87 ± 0.57</b>	<b>0.05 ± 0.29</b>	<b>0.48 ± 0.54</b>
<b>p-values</b>	vs. CTR-		<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**	<0.00001**
	vs. CTR+			0.00012**	0.37235	0.01072*
	vs. MatriDerm®				0.00002**	0.18412
	vs. NFAH					0.01702*

Figure 03

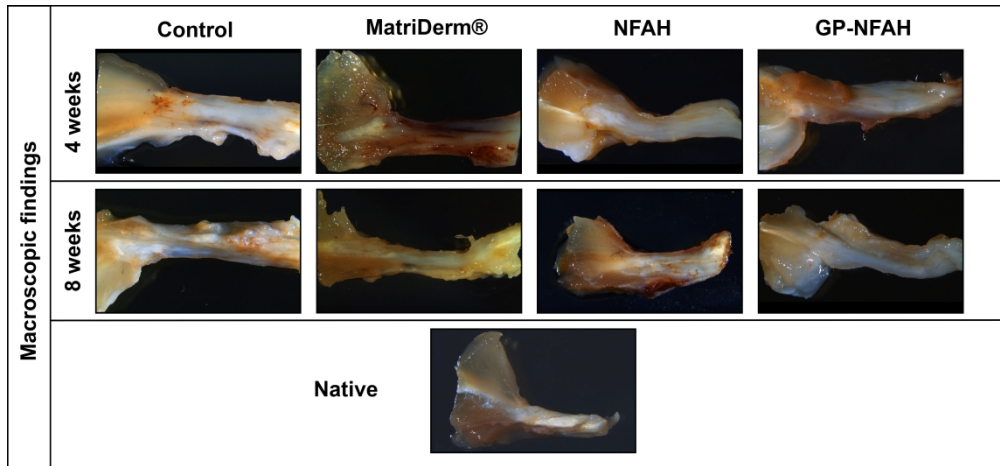


Figure 04

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

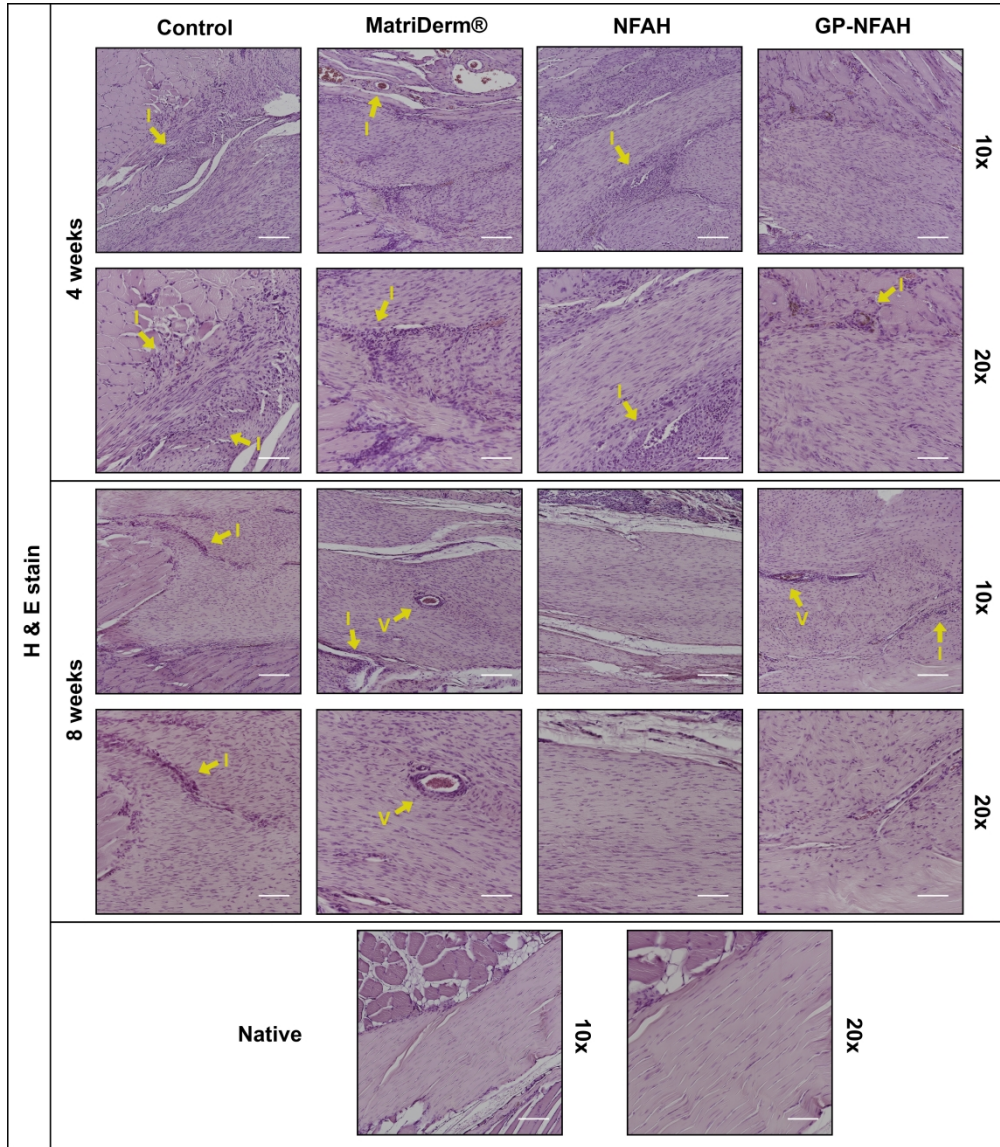
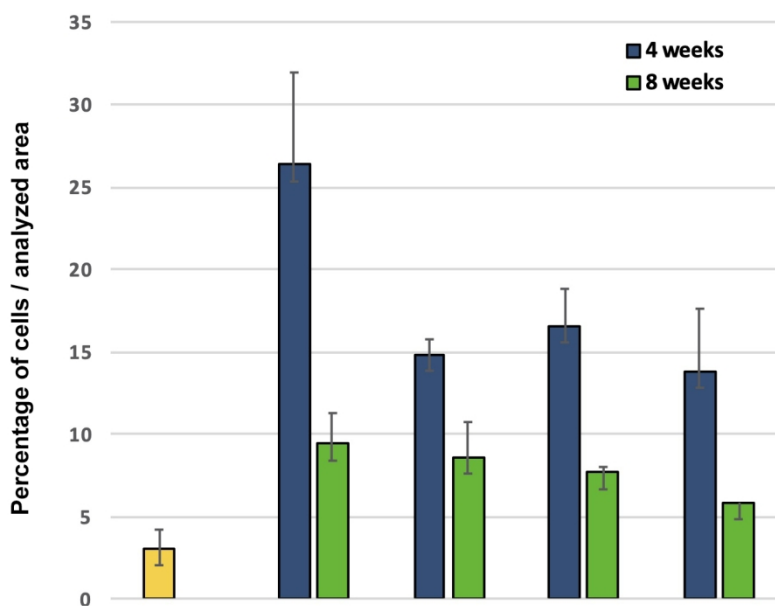


Figure 05

423x485mm (300 x 300 DPI)





Mean ± SD	4 weeks	Native	CTR	MatriDerm®	NFAH	GP-NFAH
	8 weeks	3.03 ± 1.16	26.31 ± 5.62	14.83 ± 0.91	16.55 ± 2.25	13.80 ± 3.80
<b>4 w vs. 8 w in each</b>			0.04954*	0.04953*	0.04954*	0.04954*
<b>4 weeks p-values</b>	vs. Native		0.02538*	0.02535*	0.02534*	0.02535*
	vs. CTR			0.04954*	0.04954*	0.04954*
	vs. MatriDerm®				0.27523	0.51269
	vs. NFAH					0.27523
<b>8 weeks p-values</b>	vs. Native		0.02535*	0.025347*	0.025347*	0.02535*
	vs. CTR			0.82726	0.27523	0.51269
	vs. MatriDerm®				0.27523	0.04954*
	vs. NFAH					0.51269

Figure 06



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

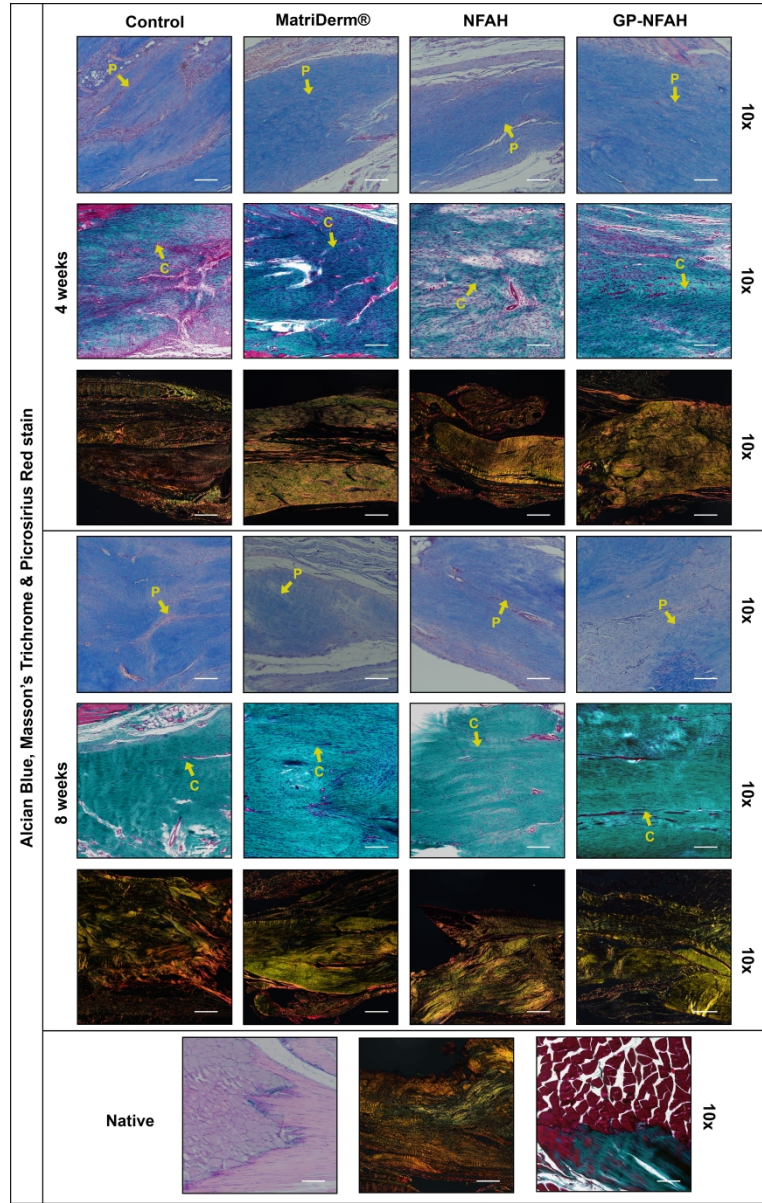


Figure 07

423x672mm (300 x 300 DPI)

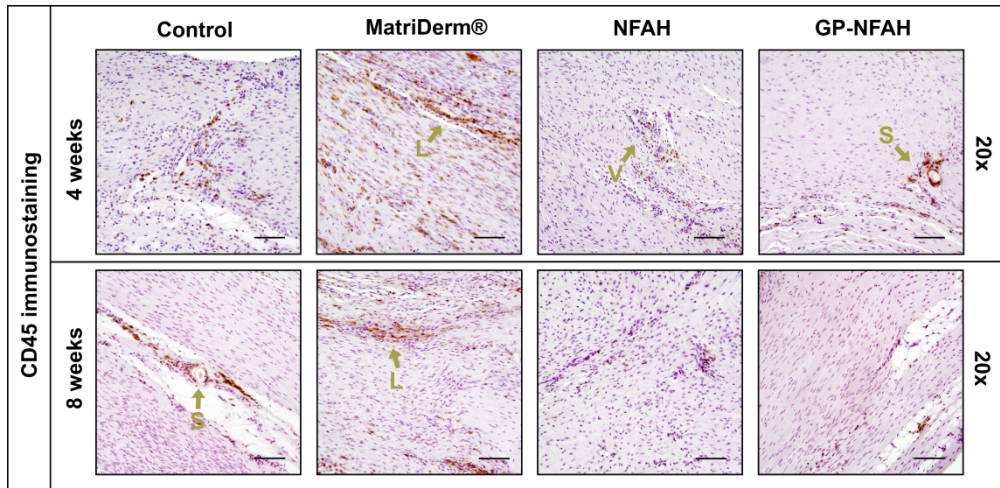
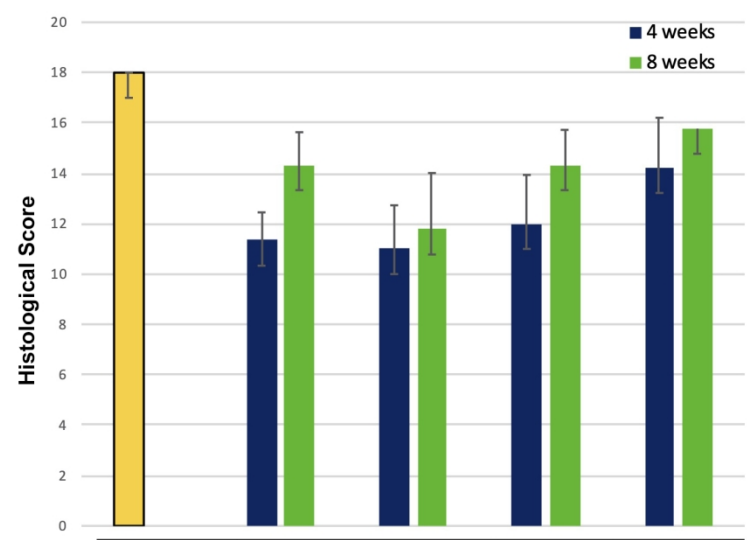


Figure 08

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Mean ± SD		Native	CTR	MatriDerm <sup>®</sup>	NFAH	GP-NFAH
		4 w	18.00 ± 0.00	11.33 ± 1.12	11.00 ± 1.73	12.00 ± 1.94
	8 w	18.00 ± 0.00	14.33 ± 0.71	11.78 ± 1.30	14.33 ± 2.24	15.78 ± 1.39
<b>4 w vs. 8 w in each</b>			0.00023**	0.38798	0.05187	0.13611
<b>4 weeks p-values</b>	vs. Native		0.00009**	0.00012**	0.00013**	0.00012**
	vs. CTR			0.85420	0.71368	0.00931*
	vs. MatriDerm <sup>®</sup>				0.24053	0.00844*
	vs. NFAH					0.02855*
<b>8 weeks p-values</b>	vs. Native		0.00011**	0.00012**	0.00012**	0.00047**
	vs. CTR			0.00045**	0.30697	0.02454*
	vs. MatriDerm <sup>®</sup>				0.01353*	0.00031**
	vs. NFAH					0.13632

Figure 09



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Histología**