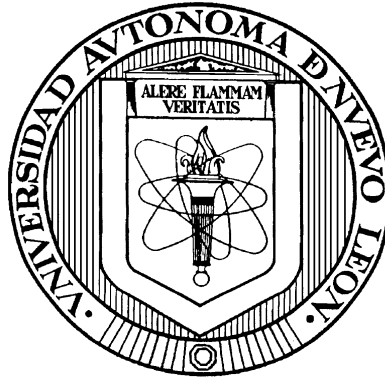


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES  
DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO ANIMAL DE  
LESIÓN DEL TENDÓN DE AQUILES**

**Por:**


**DR. ÁNGEL ARNAUD FRANCO**

**Como requisito para obtener el grado de DOCTORADO EN MEDICINA**

**Febrero 2023**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES  
DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSEO EN UN MODELO ANIMAL DE  
LESIÓN DEL TENDÓN DE AQUILES**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. en C. Jorge Lara Arias  
Director de la Tesis**

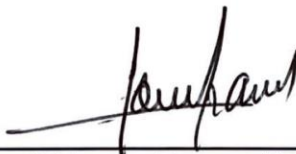


---

**Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez  
Comisión de Tesis**

---

**Dr. med. Carlos Alberto Acosta Olivo  
Comisión de Tesis**



---

**Dr. med. Tomás Ramos Morales  
Comisión de Tesis**



---

**Dr. med. Santiago de la Garza Castro  
Comisión de Tesis**



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Sub-Director de Estudios de Postgrado**

**El presente trabajo se realizó en el Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Área de Cirugía Experimental del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. en C. Jorge Lara Arias y la co-dirección del Dr. Med. Víctor Manuel Peña Martínez.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento a todo el personal de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que ha sido mi segunda casa, a todos mis compañeros médicos, enfermería, personal de apoyo que siempre los he considerado mis amigos, son una gran felicidad el verlos a diario.

Muchas Gracias a mis compañeros del Servicio de Traumatología y Ortopedia de quién tengo a diario sus enseñanzas y ejemplos.

Al Dr. Víctor Peña, nuestro Jefe, quién me ha brindado todas la facilidades para poder llevar a cabo éste trabajo de investigación y ha sido siempre un amigo y aliado en la labor de la enseñanza.

A todos mis alumnos, de Postgrado y pregrado que a diario me hacen recordar que el maestro aprende a través de sus alumnos.

Especialmente al Dr Jorge Lara por su labor incansable en todo el proceso de investigación para poder culminar exitosamente esta Tesis Doctoral.

A mis amigos, compadres, familiares, y todos aquellos que con su ejemplo son el motor para seguir estudiando y superarme en todos los aspectos de la vida.

## DEDICATORIA

Margarita, mi querida esposa, te agradezco la gran paciencia, el ánimo, y el gran estímulo que me ha brindado en todos los aspectos de mi vida, Agradecerte la felicidad que me ha dado desde que te conocí y sobre todo impulsarme para realizar esta Tesis.

Andrea, Alejandra y Eugenia, mis queridas hijas, que con sus ejemplares vidas las llevo siempre en mi corazón, son mi motivación y fuente de inspiración, les quiero agradecer la felicidad que me han dado desde su nacimiento y le han dado sentido a mi vida.

Santiago y María, mis adorables nietos, el mejor regalo que Dios me ha dado, con su dinamismo me incitan a trabajar, estudiar, actualizarme, reír, disfrutar su compañía, deseo que esta tesis sea fuente de inspiración para que siempre continúen superándose en sus estudios y en sus vidas.

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>ii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>iii</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.1. El Tendón de Aquiles</b>	<b>1</b>
<b>2.1.1 Anatomía y generalidades</b>	<b>1</b>
<b>2.1.2 Histología</b>	<b>2</b>
<b>2.1.3 Función y biomecánica</b>	<b>3</b>
<b>2.1.4 Lesión del tendón de Aquiles</b>	<b>3</b>
<b>2.1.5 Secuelas de la lesión del tendón de Aquiles</b>	<b>6</b>
<b>2.1.6 Tendón de Aquiles en conejos y anatomía comparada</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Tratamiento</b>	<b>8</b>
<b>2.2.1 Tratamiento conservador</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Cirugía percutánea</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3 Cirugía abierta</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Tratamientos biológicos</b>	<b>13</b>
<b>2.3.1 Plasma rico en plaquetas (PRP)</b>	<b>13</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
2.3.2 Células madre mesenquimales	14
2.3.3 Otras terapias	16
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	18
<b>CAPÍTULO IV</b>	
4.1. HIPÓTESIS	19
4.2. HIPÓTESIS NULA	19
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>OBJETIVOS</b>	20
5.1. Objetivo General	20
5.2. Objetivos Específicos	20
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
6.1. Diseño del Estudio	21
6.2. Modelo Experimental	21
6.3. Grupos de Estudio	21
6.4. Lugar del Estudio	22
6.5. Recursos Materiales	22
6.6. Extracción de CMDTA de los conejos donadores	22
6.7. Caracterización por citometría de flujo	23
6.8. Tenotomía Percutánea	24
6.9. Análisis Histopatológico	25
6.10. Escalas de puntuación histológica para evaluar la reparación del tendón de Aquiles	25

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
6.11. Análisis estadístico	26
6.12. Análisis molecular	26
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1. Cultivo de CMDTA	28
7.2. Caracterización celular por citometría de flujo	28
7.3. Análisis histopatológico y escala de puntuación	29
7.4. Análisis molecular	32
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO IX</b>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO X</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>41</b>
<b>APÉNDICE A</b>	
<b>TÉCNICAS HISTOLÓGICAS</b>	<b>54</b>
A.1. Preparación de la Muestra	54
A.2. Técnica de Tinción con Hematoxilina y Eosina	54
A.3. Técnica de Tinción con el Método Tricrómico de Massón	54
<b>APÉNDICE B</b>	
<b>PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES</b>	<b>56</b>
B.1. Solución de Formalina al 10%	56
B.2. PBS 10x	56
B.3. PBS 1x	56



<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>B.4. Hematoxilina de Gill</b>	<b>56</b>
<b>B.5. Eosina</b>	<b>57</b>
<b>B.6. Solución de Alcohol-ácido</b>	<b>57</b>
<b>B.7. Solución de Agua Amoniacal</b>	<b>57</b>
<b>B.8. Hematoxilina Férrica de Weigert</b>	<b>57</b>
<b>B.9. Solución de Fuscina Ácida y Escarlata de Briebich</b>	<b>58</b>
<b>B.10. Solución Ácida Fosfomolíbdica y Fosfotúngstica</b>	<b>58</b>
<b>B.11. Solución de Azul de Anilina</b>	<b>58</b>
<b>B.12. Solución Acuosa de Ácido Acético al 10%</b>	<b>58</b>
<b>B.13. Solución Fijadora de Bouin</b>	<b>58</b>
<b>B.14. Solución Enjuagadora Sulfurosa</b>	<b>58</b>
<b>B.15. Solución Metabisulfito de Sodio al 10%</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1. Marcadores empleados para la inmunofenotipificación</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 2. Puntaje de correlación biomecánica histológica (GHBCS)</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 3. Evaluación microscópica de los tendones por los observadores ciegos al estudio</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 4. Análisis estadístico para la evaluación microscópica</b>	<b>31</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1. Histogramas del inmunofenotipo de CMMs</b>	<b>28</b>
<b>Figura 2. Tinción con Hematoxilina y Eosina</b>	<b>30</b>
<b>Figura 3. Tinción con Tricrómico de Masson</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. Análisis molecular</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Análisis molecular para la expresión del colágeno tipo I</b>	<b>33</b>
<b>Figura 6. Análisis molecular para la expresión del colágeno tipo III</b>	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

<b>β</b>	<b>Beta</b>
<b>&gt;</b>	<b>Mayor que</b>
<b>&lt;</b>	<b>Menor que</b>
<b>μL</b>	<b>Microlitros</b>
<b>μm</b>	<b>Micrómetro</b>
<b>%</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>®</b>	<b>Registrado</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Centígrados</b>
<b>°</b>	<b>Grados</b>
<b>&amp;</b>	<b>Y</b>
<b>Ac</b>	<b>Ácido</b>
<b>ADMSC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales del Tejido Adiposo</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido Desoxirribonucleico</b>
<b>BMMSC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales de Médula Ósea</b>
<b>BMPs</b>	<b>Proteínas Morfogenéticas de Hueso</b>
<b>CD14</b>	<b>Cúmulo de Diferenciación 14</b>
<b>CD34</b>	<b>Cúmulo de Diferenciación 34</b>
<b>CD44</b>	<b>Cúmulo de Diferenciación 44</b>
<b>CD73</b>	<b>Cúmulo de Diferenciación 73</b>
<b>CD105</b>	<b>Cúmulo de Diferenciación 105</b>
<b>CICUAL</b>	<b>Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio</b>
<b>Col I</b>	<b>Colágeno Tipo 1</b>
<b>Col III</b>	<b>Colágeno Tipo 3</b>

<b>cm</b>	<b>Centímetros</b>
<b>CMDTA</b>	<b>Células Madre Derivadas del Tejido Adiposo</b>
<b>CMMs</b>	<b>Células Madre Mesenquimales</b>
<b>Cols</b>	<b>Colaboradores</b>
<b>c/u</b>	<b>Cada uno</b>
<b>Dr.</b>	<b>Doctor</b>
<b>EGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Endotelial</b>
<b>ej.</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>etc.</b>	<b>Etcétera</b>
<b>FGF</b>	<b>Factor de Crecimiento de Fibroblastos</b>
<b>FITC</b>	<b>Isotiocianato de Fluoresceína</b>
<b>G/H</b>	<b>GAPDH/Hembra</b>
<b>G/M</b>	<b>GAPDH/Macho</b>
<b>GAPDH</b>	<b>Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa</b>
<b>GHBCS</b>	<b>Puntaje de Correlación Biomecánica Histológica</b>
<b>Gr</b>	<b>Gramos</b>
<b>HCL</b>	<b>Ácido Clorhídrico</b>
<b>HGF</b>	<b>Factor de Crecimiento de Hepatocitos</b>
<b>Hrs</b>	<b>Horas</b>
<b>H&amp;E</b>	<b>Hematoxilina y Eosina</b>
<b>IGF1</b>	<b>Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>IgG1</b>	<b>Inmunoglobulina G1</b>
<b>IgG2</b>	<b>Inmunoglobulina G2</b>

<b>IL10</b>	<b>Interleucina 10</b>
<b>Kg</b>	<b>Kilogramos</b>
<b>kN</b>	<b>Kilonewton</b>
<b>MDCs</b>	<b>Células Derivadas de Músculo</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>mg/kg</b>	<b>Miligramos por Kilogramo</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitros</b>
<b>mRNA</b>	<b>Ácido Ribonucleico Mensajero</b>
<b>MSCs</b>	<b>Células Madre Mesenquimales</b>
<b>N</b>	<b>Normal</b>
<b>LR-PRP</b>	<b>Plasma Rico en Plaquetas Rico en Leucocitos</b>
<b>LP-PRP</b>	<b>Plasma Rico en Plaquetas Bajo en Leucocitos</b>
<b>p</b>	<b>Valor de Probabilidad</b>
<b>PBS</b>	<b>Amortiguador Salino de Fosfatos</b>
<b>PDGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas</b>
<b>PDGFaa</b>	<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas alfa/alfa</b>
<b>PDGFab</b>	<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas alfa/beta</b>
<b>PDGFbb</b>	<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas beta/beta</b>
<b>PE</b>	<b>Anticuerpo PE</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de Hidrógeno</b>
<b>PRP</b>	<b>Plasma Rico en Plaquetas</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la</b>

## **Polimerasa en Tiempo Real**

<b>SDF 1</b>	<b>Factor 1 Derivado de Células del Estroma</b>
<b>Seg</b>	<b>Segundos</b>
<b>SRY</b>	<b>Sex-Determining Region Y</b>
<b>TD</b>	<b>Tendón Derecho</b>
<b>TI</b>	<b>Tendón Izquierdo</b>
<b>TGF <math>\beta</math>1</b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante beta Tipo 1</b>
<b>TGF <math>\beta</math>3</b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante beta Tipo 3</b>
<b>TGF 1</b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante Tipo 1</b>
<b>TGF 2</b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante Tipo 2</b>
<b>UCMSC</b>	<b>Células Madre Mesenquimales del Cordón Umbilical</b>
<b>USA</b>	<b>United States of America</b>
<b>VEGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Endotelial Vascular</b>
<b>VISA-A</b>	<b>Escala Victorian Institute Sports Assessment para Tendinopatías del Tendón de Aquiles</b>

# CAPÍTULO I

## RESUMEN

Ángel Arnaud Franco

Fecha de Graduación: Febrero, 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina


**Título del Estudio: EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO ANIMAL DE LESIÓN DEL TENDÓN DE AQUILES**

**Número de Páginas: 58      Área de Estudio: Ortopedia y Traumatología**

**Introducción:** Las lesiones en el tendón de Aquiles van desde roturas agudas traumáticas hasta tendinopatías crónicas, la cirugía para su reparación continúa siendo la mejor alternativa. Sin embargo, la evolución clínica y el arreglo de las fibras tendinosas tras la cicatrización es muy variable. **Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue demostrar la eficacia de la aplicación de células madre para la aceleración del proceso de cicatrización en rupturas del tendón de Aquiles en un modelo animal.

**Material y Métodos:** Se cultivaron células mesenquimales del tejido adiposo a partir de 2 conejos machos. Se caracterizaron mediante citometría de flujo y posteriormente, se realizaron tenotomías en 8 conejos hembras para formar 2 grupos de 4 individuos cada uno. **Resultados:** Al grupo 1, se les administró en la zona de la lesión  $1 \times 10^6$  células y el grupo 2 no recibió tratamiento. A las 12 semanas se realizó el sacrificio y se tomaron biopsias. Se identificó el gen SRY proveniente de las células de los conejos machos en las áreas del tendón de Aquiles de las hembras sujetas de estudio.

**Conclusiones:** La aplicación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en lesiones por un corte transversal del tendón de Aquiles, pueden favorecer a la reparación estructural de este importante tejido con una síntesis más rica en colágenos y con un mejor arreglo entre las fibras. Sin embargo, se requiere de tiempos más prolongados que permitan determinar la reparación completa, así como estudios que analicen el módulo de tensión para poder estimar si los hallazgos patológicos son congruentes con la resistencia a la biomecánica normal del modelo animal utilizado.



---

**Dr. en C. Jorge Lara Arias**

Director de Tesis



## **CAPÍTULO II**

### **INTRODUCCIÓN**

#### 2.1 El tendón de Aquiles

##### 2.1.1 Anatomía y generalidades

Anatómica y funcionalmente, el tendón de Aquiles, también llamado tendón calcáneo, es el más grueso y grande en el cuerpo humano, midiendo en promedio 15 cm de largo, variando entre poblaciones entre los 11 y 26 cm (1). Proximalmente, el tendón se fusiona con el músculo gastrocnemios, del cual emerge como un tendón plano, mientras que distal a dicho origen, adquiere una superficie redondeada y recibe fibras del músculo sóleo, además de una pequeña contribución del músculo plantar superficial. Distalmente se inserta en la superficie posterior del hueso calcáneo. A nivel de su inserción en el hueso calcáneo, el tendón se ensancha y adquiere una textura cartilaginosa y plana, frecuentemente descrita como “forma deltoidea” (2). El porcentaje de contribución del gastrocnemios y el sóleo al tendón de Aquiles varía entre individuos (3). Sin embargo, suele encontrarse principalmente entre el 52% y el 48% respectivamente. Las fibras del tendón se disponen en una espiral de 90°, aliviando parte del estrés biomecánico producto de la constante elongación del tejido. El tendón recibe su irrigación de manera segmentada, a través de un paratenon altamente vascularizado. En el punto de inserción y hasta 1 cm después, recibe flujo sanguíneo de la arteria tibial posterior. A los 4 cm desde su inserción, el tendón está pobremente vascularizado por la arteria peronea, lo que hace a esta zona vulnerable a la rotura y degeneración. Proximalmente, entre los 7 y 10 cm

desde su inserción, así como a nivel de la aponeurosis, recibe vascularización de la arteria tibial posterior (4). La inervación del tendón de Aquiles es mayormente aferente, proveniente principalmente del nervio sural con contribuciones menores de algunas ramas del nervio tibial (5).

### 2.1.2 Histología

Desde el punto de vista histológico, el tendón de Aquiles posee una matriz extracelular (MEC) rica en colágeno y células especializadas denominados tenocitos. El colágeno tipo 1 es particularmente abundante en el tendón de Aquiles organizado en haces de fibras, fascículos y fibrillas. El colágeno tipo 3, representa el segundo en abundancia, seguido del tipo 5, 10 y 6. Interesantemente, el 80% de la masa desprovista de agua del tendón de Aquiles es dada por el colágeno (6), mientras que la elastina, la cual contribuye también a las propiedades mecánicas del tendón, representa solo el 1% del peso húmedo del tejido (7). Los proteoglicanos y otras glicoproteínas forman parte igualmente de la matriz extracelular del tendón. Por otro lado, los tenocitos y tenoblastos constituyen el 90-95% de las células del tejido. El restante 5% es constituido por células sinoviales, condrocitos y células vasculares (1). La organización jerárquica del colágeno en el tendón de Aquiles comprende el agrupamiento de fibras de colágeno en haces denominados fascículos, los cuales a su vez son rodeados por el endoténon, el cual a su vez se agrupa para formar el tendón. El tendón está recubierto por el epiténon, que a su vez es envuelto por el paraténon, una

sustancia compuesta por tejido conectivo laxo a través del cual pasan los vasos de mayor calibre que irrigan el tendón desde su porción externa (8).

### 2.1.3 Función y biomecánica

El tendón de Aquiles está involucrado en el movimiento de tres articulaciones, los cuales son, flexión de la rodilla, flexión plantar e inversión del retropié. La función primordial del tendón de Aquiles es servir como estructura de inserción entre el sistema esquelético y muscular. Debido a su anatomía y localización entre el calcáneo y los músculos de la pantorrilla en la extremidad inferior, el tendón debe ser capaz de soportar altas cargas de tensión ocasionadas por la tracción de los músculos sobre el talón. Para cumplir dicha función, a nivel celular y molecular, los tenocitos poseen proteínas motoras como la actina y la miosina (9), las cuales permiten que el tejido tendinoso posea propiedades de transmisibilidad motora, además de resistencia a altas fuerzas ténsiles. Se estima que los tendones tienen la capacidad de estirarse hasta un 4% de su longitud antes de dañarse (10), siendo el tendón de Aquiles capaz de soportar una fuerza ténsil de más de 3kN (11).

### 2.1.4 Lesión del tendón de Aquiles

Las lesiones del tendón de Aquiles incluyen las patologías inflamatorias como la tendinitis, hasta la rotura del tejido y pueden clasificarse de manera amplia en lesiones agudas y lesiones crónicas, así como en tendinopatías insercionales y no insercionales. La incidencia de la tendinosis de Aquiles es

en general desconocida, sin embargo, se reporta una incidencia de 7% a 18% en corredores, 9% en bailarines, 5% en gimnastas, 2% en jugadores de tenis y menos del 1% en jugadores de futbol americano (12). Se estima que alrededor de 1 millón de atletas sufren de una lesión de dicho tendón al año (13). La sintomatología general de la tendinopatía incluye dolor, sensibilidad en la región del talón, así como presencia de edema, cambios en la temperatura y coloración de la piel sobre la zona afectada cuando la lesión es de origen inflamatorio (tendinitis). La incidencia de lesiones del tendón está en aumento, sin embargo, el avance en las terapias conservadoras ha hecho que las intervenciones quirúrgicas vayan en decremento (14). Dichas lesiones suelen ser multifactoriales y son altamente prevalentes en atletas (cita). Existen ciertos factores extrínsecos que pueden contribuir al debilitamiento del tendón, como lo son los fármacos (Esteroides y Fluoroquinolonas) (15), así como factores intrínsecos como la edad, el género y la obesidad (16). Existen 2 teorías principales para explicar la lesión aguda del tendón de Aquiles. La primera es la teoría de la lesión por degeneración del tejido tendinoso, la cual postula que una disminución del riego sanguíneo y la consecuente hipoxia y alteración del metabolismo, pudieran estar involucradas en el proceso (17). En esta teoría, una carga insuficiente para suponer un estrés considerable para el tendón puede ocasionar su rotura. La segunda teoría es llamada la teoría mecánica, en la cual, tensiones en distintas determinadas direcciones, pueden suponer tensiones excesivas sobre el tendón, como se ha sugerido sobre cargas en direcciones oblicuas en un estado de máxima contracción muscular (18). De

manera general, las lesiones agudas del tendón poseen un infiltrado inflamatorio en la histopatología, en contraste con las tendinopatías crónicas. La tendinopatía crónica suele ocurrir en corredores masculinos de mediana edad por ejercicios que demandan el uso repetitivo y prolongado del tendón (14). Sin embargo, como es de esperarse en una patología multifactorial, otros factores independientes del mencionado anteriormente contribuyen a la manifestación de la lesión, sobre todo aquellos relacionados al metabolismo y a la vasculatura del tendón (19). Se postula que la tendinopatía crónica es un proceso de origen degenerativo, evidenciado por el patrón desorganizado de las fibras de colágeno (20) y que en general suele carecer de un infiltrado inflamatorio en la histopatología.

La tendinopatía no insercional del talón de Aquiles se debe principalmente a un compromiso de la circulación de origen inflamatorio que suele acompañarse de edema y que se manifiesta con dolor al iniciar el ejercicio y a la palpación, aproximadamente 2-6 cm por arriba del sitio de inserción (21) y que, en caso de hacerse crónico, puede presentar adhesiones y fibrosis (22).

Por otro lado, la tendinopatía insercional es debida a un proceso degenerativo a nivel de la inserción del tendón en el hueso calcáneo. Las causas de dicha degeneración suelen deberse a la edad, obesidad, uso prolongado de esteroides, enfermedades crónico-degenerativas como diabetes y artropatías de origen inflamatorio como las espondiloartropatías, característicamente asociadas a entesitis del tendón de Aquiles (23). Se acompaña de dolor por la mañana, así como posterior al ejercicio, localizado

en el calcáneo (24). La deformación o calcificación de la tuberosidad calcánea se asocian significativamente a la tendinopatía insercional (ej. deformidad de Haglund) (25).

Como ha sido mencionado anteriormente, el tendón de Aquiles representa el más grande y grueso del cuerpo humano, empero la rotura aguda del tendón de Aquiles representa la rotura de tendón más común (20% de todas las roturas) (26). La rotura del tendón de Aquiles se ha asociado a enfermedades inflamatorias y autoinmunes (27), colagenopatías, enfermedades infecciosas e hiperlipidemia. El padecimiento suele acompañarse de un chasquido, seguido inmediatamente de un dolor incapacitante que impide la deambulación (28).

#### 2.1.5 Secuelas de la lesión del tendón de Aquiles

Las lesiones del tendón de Aquiles que no involucran su rotura suelen tener un pronóstico y recuperación favorable con el correcto manejo fisioterapéutico y dado el caso, de la enfermedad de base en aquellas que se relacionan con enfermedades reumáticas (ej. entesitis por espondiloartropatías). Sin embargo, la rotura total o parcial del tendón suele traer consigo secuelas que repercuten en la calidad de vida del paciente, en particular la pérdida de la movilidad y la fuerza.

En 63 pacientes con rotura del tendón de Aquiles intervenidos quirúrgicamente en promedio  $10.8 \pm 3.4$  años antes de enrolarse en el estudio y con 6 semanas de inmovilización tras la cirugía, la morfología y la función del complejo gastrocnemios-sóleo no regresaron a los valores

medidos en la extremidad contralateral tras evaluar fuerza, resistencia y actividad muscular mediante dinamómetro y electromiografía (29).

Dichos resultados podrían explicarse por la atrofia muscular observada tras la reparación de una rotura aguda de un tendón (30).

La evidencia actual parece indicar que, tras la rotura aguda del tendón, la longitud del tendón tras la reparación es un factor importante que impacta en la recuperación de la función. Un estudio en el cual se midió la altura de levantamiento de talones en 8 pacientes que habían sufrido rotura aguda del tendón, encontró una correlación negativa entre la altura a la cual se podía levantar el talón de la extremidad afectada, con la longitud del tendón intervenido quirúrgicamente (31).

#### 2.1.6 Tendón de Aquiles en conejos y anatomía comparada

Los estudios preclínicos para el tratamiento de la lesión, cirugía y/o reparación del tendón de Aquiles han sido realizados en modelos animales, entre los cuales se encuentran las ratas (32), los perros (33), los gatos (34) y los conejos (35). Particular interés se ha prestado a dichos estudios en conejos debido a las características anatómicas del tendón en dichos animales, destacándose su tamaño, lo cual facilita los estudios histológicos y biomecánicos (36).

La anatomía macroscópica e imagenológica del tendón de Aquiles del conejo difiere de los del tendón humano. Se ha observado que las fibras laterales y mediales del tendón del gastrocnemio se fusionan mucho más distales en el conejo que en el humano, mientras que la contribución del sóleo al tendón de

Aquiles es insignificante en el conejo. Además, en este último, el tendón del flexor largo de los dedos que pasa a formar parte de la vaina del tendón de Aquiles, rota dorsolateralmente y corre posterior a la inserción del tendón de Aquiles en el calcáneo (37)

A pesar de dichas diferencias, tomando las reservas necesarias, el conejo como modelo animal para la investigación de las lesiones del tendón de Aquiles, sigue siendo ampliamente utilizado y aceptado para la extrapolación de resultados a pacientes humanos.



## 2.2 Tratamiento

### 2.2.1 Tratamiento conservador

En el algoritmo terapéutico de la rotura del tendón de Aquiles, existe aún controversia sobre los grados de lesión que deberían corresponder a un tratamiento conservador y los que deberían ser indicación de tratamiento quirúrgico. En general, el tratamiento conservador comprende un periodo de inmovilización de 6 a 8 semanas, con el apoyo de férulas, con el pie en flexión plantar por las primeras 4 semanas y el resto en posición neutra (38). Como es de esperarse, los periodos largos de inmovilización de la extremidad traen consigo un deterioro de la masa muscular y una mayor probabilidad de secuelas. Un metaanálisis que incluyó 12 estudios determinó que la cirugía abierta se asoció a un riesgo disminuido de re-rotura, en comparación con el tratamiento conservador (riesgo relativo de 0.27, 95% de intervalo de confianza, 0.11 a 0.64), aunado a un aumento en la tasa de infecciones, adhesiones y alteraciones en la sensibilidad de la piel (39). Sin embargo, estudios recientes, han sugerido que el riesgo de re-rotura en el tratamiento conservador, puede disminuirse mediante la rehabilitación funcional temprana del paciente, es decir, disminuyendo el tiempo de inmovilización con férula (40). Dichos resultados, aunque controversiales, apuntan a que la rehabilitación debe ser parte integral no solo del tratamiento quirúrgico, si no del conservador igualmente.

### 2.2.2 Cirugía percutánea

La cirugía percutánea se destaca como una estrategia terapéutica que busca reducir el riesgo de re-rotura comúnmente asociado al tratamiento conservador, mientras que reduce el riesgo de lesión del nervio sural, comúnmente asociado a cirugía abierta del tendón de Aquiles. La primera técnica de cirugía percutánea fue publicada por Ma & Griffith en 1977 (41), la cual paradójicamente tuvo como desventaja la prevalencia de la lesión del nervio sural (42). En dicha técnica, se realiza una sutura de Bunnel en la región proximal del tendón y una sutura de caja distalmente en el muñón, la cual se inserta a través de 6 incisiones paratendinosas.

En 1992 Delponte describió una técnica utilizando Tenolig®. En la técnica de Delponte, se hacen pasar dos suturas con agujas precargadas en las que se incrustan pequeños arpones. Los puntos de entrada se encuentran aproximadamente a 6 cm proximales al desgarró en el lado posterolateral del tendón lesionado. Los puntos de salida están en el lado posterolateral del tendón sobre el espacio retromaleolar, 4 a 5 cm por debajo del desgarró. En el procedimiento se pasan las dos agujas percutáneamente de proximal a distal, a través del tendón roto.

Los arpones se adhieren a la parte superior del tendón. Las suturas se tiran hacia abajo para unir los dos extremos del tendón roto y luego se bloquean con discos de polietileno contra la piel. Las suturas pueden retirarse aproximadamente 6 semanas después (43).

En 1999, Webb y Bannister idearon una técnica en la cual se colocan las suturas en la línea media en lugar del costado cercano al nervio sural, esto

con el fin de evitar el riesgo de lesión iatrogénica de dicho nervio. En esta técnica, se insertan dos puntos de sutura de nailon a través de tres incisiones punzantes. Los autores evaluaron series de pacientes durante 35 meses de observación post-cirugía, para constatar la tasa de re-rotura, tiempo de rehabilitación y lesión iatrogénica del nervio sural, reportando un regreso al trabajo cotidiano a las 4 semanas y a actividades deportivas a los 4 meses post-intervención, sin lesiones del nervio sural ni re-roturas durante el tiempo de observación previamente mencionado (44).

McClelland describió otra modificación de la técnica de Ma & Griffiths (45), la cual fue modificada posteriormente. La versión actual consiste en una reparación de 8 hilos de Maxon número 1 insertados con una aguja de Mayo de 9 cm. La aguja se pasa a través de incisiones paratendinosas tipo Bunnel que emergen a través de una punción central en el sitio de rotura. Las incisiones punzantes tienden a evitar el trayecto del nervio sural debido al gran radio de curvatura de la aguja (46)

Para proteger el nervio sural durante la cirugía, se han desarrollado plantillas como la denominada, plantilla Achillon® (Integra Life Sciences Corporation), las cuales se colocan dentro del paraténon a través de una incisión a nivel de la rotura del tendón de Aquiles. Esto permite que las suturas puedan ser pasadas con seguridad a través del tendón, disminuyendo la tasa de lesiones del nervio sural y re-rotura en comparación con otras técnicas percutáneas (47).

### 2.2.3 Cirugía abierta

La cirugía abierta suele asociarse a una tasa considerablemente menor de re-rotura en comparación con el tratamiento conservador, sin embargo, plantea la desventaja del riesgo de lesión iatrogénica del nervio sural.

En la técnica de reparación extremo con extremo, se realiza una incisión longitudinal de 6 a 8 cm, la cual generalmente sigue el borde medial del tendón de Aquiles. Dicha incisión medial evita el nervio sural, facilita el acceso al *plantaris* y minimiza la lesión postoperatoria de la piel. Acto seguido, se produce una flexión plantar del tobillo para exponer y aproximar los extremos del tendón lesionado. De esta forma, los extremos de los tendones pueden aproximarse sin desbridamiento. La reparación final se refuerza con puntos interrumpidos (48).

Un metaanálisis recientemente realizado apunta a que el tratamiento quirúrgico mostró una tasa de re-rotura del 3.63%, mientras que el grupo no quirúrgico tuvo una tasa de re-rotura del 10.1% (49). A pesar de dichos resultados, un metaanálisis de 2012 sugiera que el grupo quirúrgico y el no quirúrgico presentaron tasas de re-rotura equivalentes, por lo que no se encontraron diferencias significativas entre grupos (50).

Por otro lado, la cirugía abierta presenta mayor riesgo de infección y adhesiones. El metaanálisis de Reda y cols. encontró una incidencia del 4.2% de lesión de nervio sural en el grupo tratado quirúrgicamente, confirmando este fenómeno como una de las principales desventajas de este procedimiento (49).

## 2.3 Tratamientos biológicos

### 2.3.1 Plasma rico en plaquetas (PRP)

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un concentrado que contiene niveles altos de diversas proteínas, incluidos factores de crecimiento, citosinas, proteínas de adhesión entre otros. Entre los factores de crecimiento encontrados en el PRP se encuentran los isómeros del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), a saber, PDGFaa, PDGFbb y PDGFab, los factores de crecimiento transformantes 1 y 2 (TGF1 y TGF2), el factor vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento epitelial (EGF) (51). La aplicación de PRP se ha colocado como una de las estrategias no quirúrgicas más frecuentes para el tratamiento de las tendinopatías. Se estima que el mecanismo de acción del PRP es la activación de la cascada de coagulación, estimulación de secreción de diversos factores de crecimiento además de los ya concentrados en el PRP. Los factores quimiotácticos atraerían leucocitos y células madre, facilitando la reparación del tejido (52). El PRP se ha administrado de manera autóloga para el tratamiento de tendinopatías (53), ya sea rico en leucocitos (LR-PRP) o pobre en leucocitos (LP-PRP) (54, 55).

Los estudios hasta ahora han puesto en duda la verdadera eficiencia del tratamiento con PRP, encontrándose solo un ligero aumento del grosor del tendón dañado después de 3 meses de seguimiento (56).

Sin embargo, algunos reportes con un mayor tiempo de seguimiento han demostrado beneficio al considerar el puntaje VISA-A (57).

Un metaanálisis hecho recientemente, sugiere que el PRP es beneficioso en el tratamiento de la rotura del tendón de Aquiles, al encontrarse una mejora en el ángulo de dorsiflexión del tobillo, la fuerza de extensión dorsal del tobillo y la circunferencia de la pantorrilla en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, en dicho metaanálisis, no se logra demostrar que el PRP produzca una mejora significativa en el ángulo de flexión plantar del tobillo, la fuerza de flexión plantar del tobillo y el dolor (58).

Es por estos resultados que el hecho de que el LR-PRP estimule mejor la proliferación de los tenocitos comparado con el LP-PRP, no representa necesariamente una observación significativa clínicamente (55).

Por lo mencionado anteriormente, el uso de PRP para el tratamiento de la lesión del tendón de Aquiles sigue siendo controversial y es probable que, si su uso se extiende en la práctica médica, este sea en combinación con otros tratamientos, como el tratamiento quirúrgico mencionado anteriormente.

### 2.3.2 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes no hematopoyéticas del estroma, que poseen propiedades como migración, localización, inmunomodulación y reparación de tejidos. Más aún, las MSCs son fáciles de diferenciar en varios tipos de células, manteniendo también su capacidad proliferativa in vitro. Debido a esto, las MSCs son muy atractivas para la medicina regenerativa.

Las MSCs se localizan en todo el tejido regenerativo cercano a los vasos como nichos perivasculares (59) y pueden aislarse de la médula ósea

(BMMSC), el cordón umbilical (UCMSC), el torrente sanguíneo y el tejido adiposo (ADMSC) con facilidad (60).

La inflamación es capaz de contrarrestar patógenos de manera eficiente, sin embargo, la inflamación crónica o descontrolada es capaz de causar un severo daño tisular mediante la secreción de moléculas bioactivas que comprometen la viabilidad celular, reparación y curación del tejido. La necrosis conduce a un proceso inflamatorio por la liberación de moléculas intracelulares tras una agresión aguda o un daño tisular producido por un factor externo.

Las MSCs usan sus propiedades antiinflamatorias para restaurar el tejido dañado mediante su capacidad de migración y secreción de moléculas inmunomoduladoras como la indolamina 2,3-dioxigenasa, prostaglandina E2, óxido nítrico, TGF $\beta$ 1 e IL10 entre varios otros. Así mismo inducen la secreción de estos últimos por células vecinas de manera parácrina, y participan en la secreción de factores de crecimiento como TGF $\beta$ , HGF, EGF, FGF, VEGF, PDGF, IGF1 and SDF-1 (61).

En estudios preclínicos, las MSCs han demostrado ser útiles en el manejo de tendinitis en caballos (62), además, el tratamiento con BMMSC ha demostrado ser superior en el tratamiento de la rotura tendón de Aquiles en comparación con el PRP en ratas en relación con parámetros histológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos (63).

Un metaanálisis publicado recientemente, sugiere que la terapia con MSCs puede mejorar el dolor, la función, los parámetros radiológicos y artroscópicos en pacientes con tendinopatía, sin embargo, es necesario

realizar más estudios aleatorizados, controlados y con grandes números de pacientes para confirmar la mejora funcional a largo plazo y los efectos adversos de las terapias con MSCs (64).

### 2.3.3 Otras terapias

Existen en la literatura otras estrategias que buscan funcionar por si solos o como adyuvantes de algunos de los tratamientos previamente mencionados.

La terapia génica es una aproximación que busca, sobre todo, mejorar la capacidad ténsil de los tenocitos. Entre dichas estrategias, destaca la transducción del gen BMP-14 en tendones previamente lesionados. Dicha metodología fue evaluada en ratas, modelos en los cuales se mejoró de manera significativa la capacidad de sanación del tejido previamente dañado mediante el uso de un vector adenoviral (65).

El suministro de factores de crecimiento individuales y en combinación se ha explorado igualmente para el tratamiento de la lesión del tendón de Aquiles. Entre los factores utilizados se encuentran IGF-1, PDGF, VEGF, FGF, BMPs y el TGF $\beta$  (66).

Entre ellos, el VEGF ha demostrado incrementar la vascularización de los tejidos, lo cual puede ser beneficioso para la reparación del tendón lesionado al estimular la proliferación de las células endoteliales y por tanto favorecer la irrigación en las fases tempranas de la reparación del tendón (67).

Algunos estudios han sugerido que el PDGF puede favorecer la reparación del tendón al mejorar las capacidades biomecánicas de dicho tejido en combinación con la suplementación del colágeno tipo I (68).



El TGF- $\beta$ 3 también ha demostrado ser un candidato como un factor de crecimiento capaz de estimular la reparación del tejido tendinoso al suplementarse mediante un sistema de administración basado en heparina/fibrina, aumentando las capacidades estructurales y biomecánicas (69).

Finalmente, el uso de biomateriales para la administración de agentes mediante sistemas implantables o inyectables es un campo nuevo de investigación que podría abrir nuevas posibilidades para el tratamiento de la lesión del tendón de Aquiles.

El uso de hidrogeles como un agente inyectable se ha usado para administrar agentes como el PRP y MSCs derivadas de la grasa, aumentando la fuerza y restauración funcional temprana (70).

El colágeno y el quitosano se han utilizado ampliamente como andamios de biomateriales para el suministro de células y proteínas mediante implantes (71). Así mismo, los polímeros sintéticos también se han investigado para la reparación de lesiones en los tendones. Se ha usado ácido poliglicólico sembrado con células derivadas de músculo (MDCs) para promover la formación de un neotendón, favoreciendo la exhibición de propiedades biomecánicas más fuertes en el tejido mediante el uso de dichas células (72).

En general, la evidencia parece indicar que la combinación de diversos abordajes podría producir una eficacia mayor, por lo que actualmente, la investigación se ha centrado en el uso de biológicos apoyados por biomateriales, como se mencionó anteriormente (70).

## **CAPÍTULO III**

### **JUSTIFICACION**

Debido a que los reportes de la aplicación de células madre derivadas del tejido adiposo (ADMSC) son más comunes en modelos animales de menor escala filogenética, el presente trabajo pretende evaluar el efecto de la administración de ADMSC en dos tipos de lesiones provocadas en el tendón de Aquiles de conejos de la raza Nueva Zelanda para proponer nuevas técnicas de curación del tejido.

## **CAPÍTULO IV**

### **HIPÓTESIS**

#### **4.1. HIPOTESIS**

Las células madre de médula ósea favorecen el proceso de curación en las roturas traumáticas del tendón de Aquiles.

#### **4.2. HIPOTESIS NULA**

Las células madre de médula ósea no favorecen el proceso de curación en las lesiones traumáticas del tendón de Aquiles

## **CAPÍTULO V**

### **OBJETIVOS**

#### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la eficacia de la aplicación de células madre para la aceleración del proceso de cicatrización en roturas del tendón de Aquiles sin ningún otro manejo en un modelo animal

#### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Extraer y cultivar las células madre derivadas del tejido adiposo provenientes de conejos donadores.
2. Establecer el modelo de lesión traumática por medio de tenotomías percutáneas en el tendón de Aquiles en conejos de la raza Nueva Zelanda.
3. Caracterizar las células derivadas del tejido adiposo mediante citometría de flujo.
4. Analizar la zona de lesión a las 12 semanas post inoculación celular mediante tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.
5. Analizar la expresión de colágenos I y III mediante RT-qPCR.

## **CAPÍTULO VI**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **6.1. Diseño del Estudio**

Previa aprobación del Comité de Ética, CICUAL y Bioseguridad de nuestra institución con el número de registro **OR14-001**, se utilizaron en el presente estudio, 10 conejos sanos adultos masculinos de 3 meses de edad y de 2.5 kg en promedio, 2 de los cuales, fueron los donadores de tejido adiposo.

#### **6.2. Modelo Experimental**

El presente trabajo es un estudio experimental en modelo animal, transversal, comparativo, prospectivo y ciego respecto al evaluador.

#### **6.3. Grupos de Estudio**

Se dividieron en dos grupos.

Grupo 1.- Tratamiento celular. A 4 conejos se les realizó tenotomía percutánea del tendón de Aquiles con fijación en ambos extremos. Se les aplicó  $1 \times 10^6$  células en la zona de la lesión.

Grupo 2.- Control de lesión. A 4 conejos se les realizó tenotomía percutánea del tendón de Aquiles con fijación en ambos extremos.

Durante todo el ensayo, se aseguró que los conejos se pudieran mover libremente al interior de la jaula. Se mantuvieron con comida y agua limpia.

Para poder realizar las tenotomías, a todos los conejos se les administró analgesia y antibioticoterapia.

#### **6.4. Lugar del Estudio**

Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León un mes antes de ser operados, con la finalidad de que estén adaptados, en condición física adecuada, se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Los ensayos histológicos se realizaron en el Departamento de Histología del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **6.5. Recursos Materiales**

El recurso económico fue aportado por el Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y se contó con el apoyo del área de Bioensayos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **6.6. Extracción de CMDTA de los conejos donadores**

Los conejos fueron sacrificados mediante sedación de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Las muestras de grasa obtenidas del ligamento falciforme de los conejos donadores fueron procesadas en una campana de flujo laminar clase II

(SterilGARD® III Advance. THE BAKER COMPANY, Gatehouse Road. Sanford, USA). El tejido adiposo fue colocado en un tubo Falcon de 50 ml estéril y se lavaron con buffer PBS suplementado con gentamicina con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sangre y tejido estromal posible. La grasa se colocó en un frasco con un agitador magnético en su interior y se resuspendió en 20 ml de colagenasa tipo I (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY, EUA) al 0.1% para la digestión de la matriz estromal. Concluido el tiempo de digestión enzimática, se agregaron 2 volúmenes de PBS y se esperó a que se formaran dos fases: grasa en la parte superior y células en la parte inferior. Se recuperó el infranadante y se repitió el proceso de lavado con PBS en dos ocasiones más, para recuperar la mayor cantidad de células posible. Las células se cultivaron durante dos semanas con el objetivo de obtener la cantidad suficiente que cubriera las necesidades de dosificación para el grupo 1.

### **6.7. Caracterización celular por citometría de flujo**

Se utilizaron en promedio  $3 \times 10^6$  células, las cuales fueron resuspendidas en 50  $\mu\text{L}$  de buffer de tinción (SB, Becton Dickinson Pharmingen). Se les adicionó 10  $\mu\text{L}$  de cada anticuerpo (Tabla 1) en una dilución 1:10 y se agitó ligeramente para mezclar los reactivos, después se incubó durante 20 minutos. Las muestras se lavaron con 1 ml de PBS al 1X y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células teñidas de cada tubo se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de PBS al 1X y pasaron por el citómetro de flujo.

Tabla 1. Marcadores empleados para la inmunofenotipificación.

<b>Analito</b>	<b>Detector</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>
<b>Mesenquimal</b>			
<b>CD105</b>	Anti-CD105 IgG1, κ	FITC	Serotec
<b>CD73</b>	Anti-CD73 IgG1, κ	PE	Invitrogen
<b>CD44</b>	Anti-CD44 IgG2a, κ	PE	Chemicon
<b>Hematopoyético</b>			
<b>CD14</b>	Anti-CD14 IgG2a, κ	PE	Abd Serotec
<b>CD34</b>	Anti-CD34 IgG1, κ	PE	BD Biosciences
<b>Control</b>	IgG2a, κ Isotipo	PE	BioLegend
<b>Control</b>	IgG1, κ Isotipo	PE	BioLegend

### 6.8. Tenotomía Percutánea

Los conejos fueron anestesiados con acepromacina (0.5 mg/kg), ketamina (50 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) por vía intramuscular. Se monitorearon los signos vitales durante el procedimiento. Posteriormente, se colocó un catéter en la vena marginal para administrar tramadol (5mg/ kg) y para mantener la sedación en caso de que fuera necesario. A los dos grupos se le realizó asepsia de ambas patas en el área del tendón de Aquiles y con una hoja de bisturí #15 se realizó la tenotomía percutánea con una incisión de 3mm, llevando en máxima dorsiflexión el tobillo del conejo hasta sentir la rotura del tendón de Aquiles, este procedimiento se realizó en forma bilateral y se suturaron ambos extremos con Vicryl 3-0 para evitar que los extremos del tendón se retraigan. Finalmente, la herida fue suturada con nylon 3-0. Al grupo 2, se les administró en la zona de la lesión  $1 \times 10^6$  células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo previamente cultivadas a partir de los conejos donadores. Los conejos se mantuvieron con comida y agua



*ad libitum* hasta cumplir las 12 semanas establecidas para el momento del sacrificio.

### **6.9. Análisis Histopatológico**

Se realizaron las tinciones de Tricrómico de Masson y H&E para identificar la organización de las fibras de colágena.

### **6.10. Escalas de puntuación histológica para evaluar la reparación del tendón de Aquiles**

Se utilizó el puntaje de correlación biomecánica histológica (GHBCS) reportado por Andrew y colaboradores (2010)<sup>71</sup>, (Tabla 2). Es un sistema propuesto para comparar los resultados histológicos y correlacionarlos con la biomecánica en ingeniería de tejidos y en el tendón reparado quirúrgicamente, que califica la orientación del colágeno, la angiogénesis y la inducción para la formación de cartílago.

Tabla 2. Puntaje de correlación biomecánica histológica (GHBCS).

Parámetro	Puntaje	Descripción
Grado de Colágeno	0	Colágeno normal orientado tangencialmente
	1	Cambios leves con fibras de colágeno desorganizado (<25%)
	2	Cambios moderados con fibras de colágeno desorganizado (25% - 50%)
	3	Cambios marcados con colágeno desorganizado (>50%)
Grado de Angiogénesis	0	Infiltración moderada de tejido con arteriolas
	1	Presencia de capilares
	2	Sin infiltración vascular
Formación de Cartílago	0	Sin formación de cartílago
	1	Nódulos aislados de cartílago hialino
	2	Formación moderada de cartílago (25% - 50%)
	3	Extensa formación de cartílago (>50%)

### 6.11. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos aplicada a dos muestras independientes.

### 6.12. Análisis molecular

A partir de biopsias tomadas de la zona de la lesión de los grupos 1 y 2, se procedió a realizar la extracción del ADN de las muestras. Para localizar a las células de los conejos machos (donadores), se realizó una PCR punto final utilizando marcadores previamente reportados en el genbank para identificar al cromosoma SRY (número de acceso AY785433) y se utilizó GAPDH como gen endógeno (número de acceso L23961). Para poder cuantificar la

expresión de los colágenos I y III, se realizó una RT-qPCR utilizando los juegos de iniciadores D49399 para colágeno I, S83371 para colágeno III y para normalizar el nivel de expresión se utilizó GAPDH con número de acceso L23961.

## CAPÍTULO VII

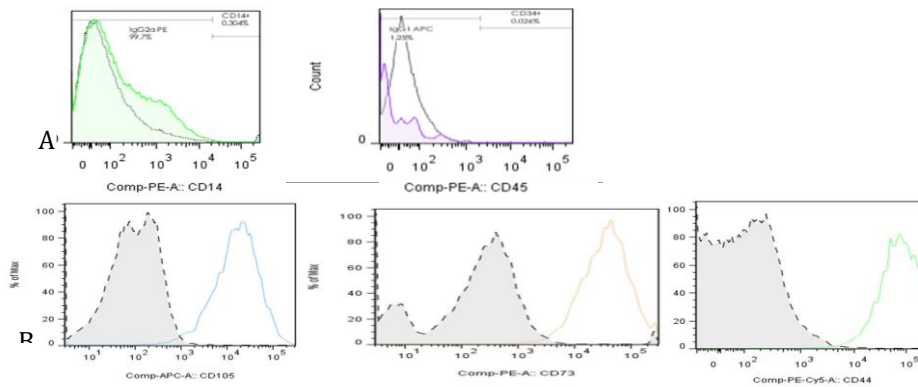
### RESULTADOS

#### 7.1. Cultivo de CMDTA

A partir de la grasa obtenida de los ligamentos falciformes de los conejos donadores, se establecieron los cultivos celulares y se procedió a generar las dosis celulares para aplicar al Grupo 2 en la zona lesionada del tendón de Aquiles.

#### 7.2. Caracterización celular por citometría de flujo

En la inmunofenotipificación (Figura 1) se pudo observar que no se encontraron marcadores de superficie asociados con células hematopoyéticas, lo que permitió distinguir células con características de un origen mesenquimal tal como lo revelaron los marcadores CD73+, CD44+ y CD105+ encontrados en las células sujetas de estudio.



**Figura 1. Histogramas del inmunofenotipo de CMMs.** A) No se detectó la presencia de marcadores de origen hematopoyético, CD45- y CD14-. B) Antígenos de superficie característicos de CMMs como CD73+, CD44+ y CD105+.

### 7.3. Análisis histopatológico y escala de puntuación

Una vez sacrificados los conejos sujetos de estudio, se procedió al análisis con tres observadores ciegos al estudio (Tabla 3). Los patólogos que participaron en la aplicación de la escala para el puntaje en la reparación del tendón de Aquiles se identificaron como A, B y C.

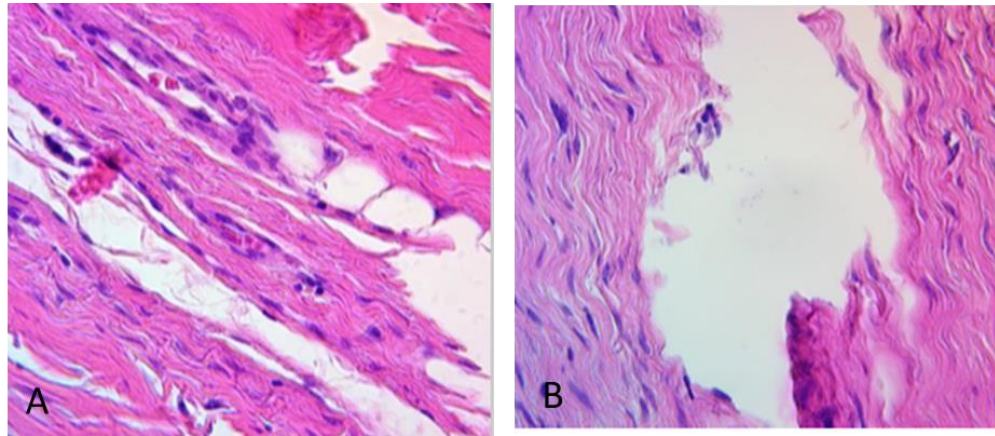
Tabla 3. Evaluación microscópica de los tendones por los observadores ciegos al estudio.

NÚMERO DE ESPÉCIMEN	GRADO DE COLÁGENO			GRADO DE ANGIOGÉNESIS			FORMACIÓN DE CARTÍLAGO		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>GRUPO 1</b>									
1 TD	2	2	2	0	1	0	0	0	0
1 TI	2	1	1	1	1	1	0	0	0
2 TD	2	2	2	1	0	1	0	0	0
2 TI	2	1	1	2	0	0	0	0	0
3 TD	2	2	2	1	0	1	0	0	0
3 TI	1	1	1	0	0	-	0	0	0
4 TD	1	0	1	1	1	1	0	0	0
4 TI	3	3	3	1	1	1	0	0	0
<b>GRUPO 2</b>									
5 TD	2	2	2	1	1	1	0	0	0
5 TI	2	-	-	1	1	1	0	0	0
6 TD	3	3	3	0	0	0	0	0	0
6 TI	2	2	2	0	0	0	0	0	0
7 TD	3	3	3	0	0	0	0	0	0
7 TI	1	1	1	1	0	-	0	0	0
8 TD	2	2	2	0	0	0	0	0	0
8 TI	3	2	3	0	0	0	0	0	0

En la descripción histológica general, en los tendones del grupo 1 o de tratamiento con CMMs (Figura 2), se pudo observar la presencia de células

infiltradas en los espacios adyacentes a la lesión, así como un arreglo en las fibras de colágeno. Los cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina revelaron la presencia de áreas con células en la zona de la lesión para el grupo I, el cual fue tratado con células. Para el grupo 2 o de lesión. Se pudo observar áreas con espacios entre las fibras y desorganización.

En cuanto a la formación de fibras de colágeno, se encontró zonas con escasa formación de cartílago en ambos grupos, así como en el grado de angiogénesis rodeando a la zona de lesión.



**Figura 2. Tinción con Hematoxilina y Eosina.** A.Grupo 1. Tratamiento con ADMSC. Se observan formación de vasos sanguíneos y agregados celulares. B. Grupo 2. Grupo control de lesión. Se observa desorganización generalizada de las fibras de colágeno. 20x.

Sin embargo, en el análisis estadístico se encontró una diferencia en la formación de vasos sanguíneos en la zona sujeta de estudio, favoreciendo al grupo que recibió como tratamiento células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico para la evaluación microscópica.

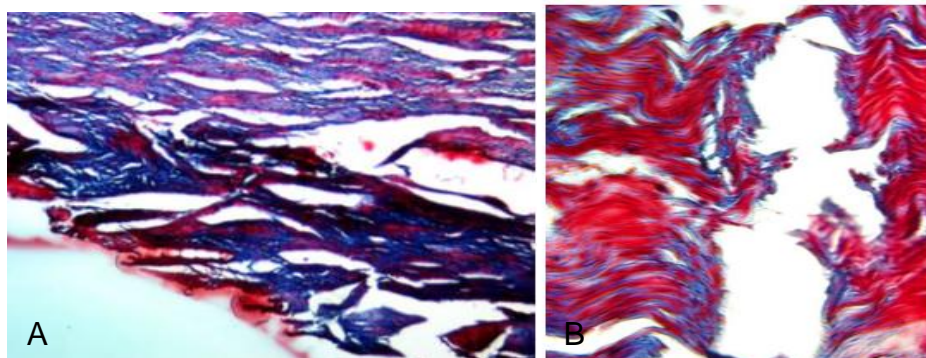
	CM n= 8	Control n=8	<i>p</i>
Colágeno	1.5(1-2)	2(2-3)	0.13
Angiogénesis	1(0-1)	0(0-0.75)	0.23
Cartílago	0(0-0)	0(0-0)	0.99

Mediana(rango intercuartílico)

*p* : obtenido por U de Mann-Whitney

En cuanto a la tinción con Tricrómico de Masson, se pudo distinguir áreas de colágeno más extensas en el grupo I, en comparación con el grupo 2, el cual, además de una desorganización más evidente de las fibras de colágeno, también se pudo distinguir zonas amplias de fibrosis (Figura 3).

Los resultados del análisis histopatológico indican que el grupo I presentó un mejor arreglo en las fibras de colágeno en comparación al grupo 2.



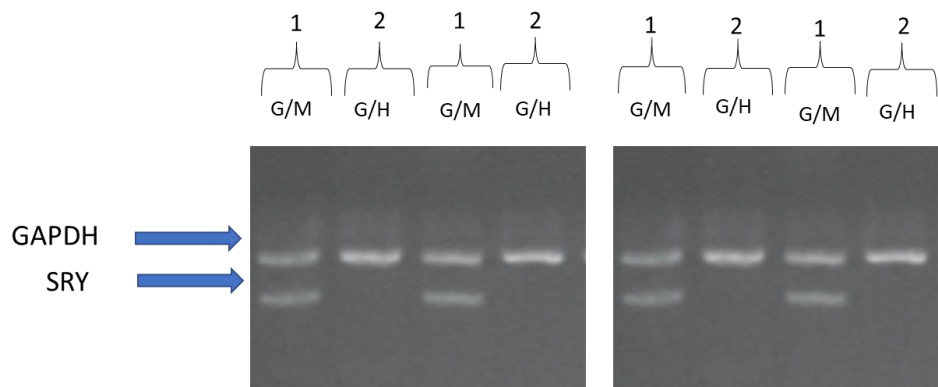
**Figura 3. Tinción con tricrómico de Masson.** A. Grupo 1. Tratamiento con ADMSC. Se observa mayor presencia de fibras de colágeno en la zona de la lesión. B. Grupo 2. Grupo control. Se observa menor cantidad de fibras de colágeno. 20x.

Sin embargo, en el grupo I se pudo observar la presencia de pequeños vasos, que según la escala propuesta por Andrew y Cols., no es tan deseado.

Al no encontrar extensas áreas de fibrosis, pensamos que estos pequeños vasos, pudieran favorecer la reparación en el sitio de la lesión, por lo que se requiere más tiempo antes del sacrificio, así como más estudios para demostrarlo.

#### 7.4. Análisis molecular

Se pudo identificar la región del gen determinante del sexo (SRY), lo que indica que las células fueron capaces de proliferar y mantenerse viables en el sitio de la lesión (Figura 4).



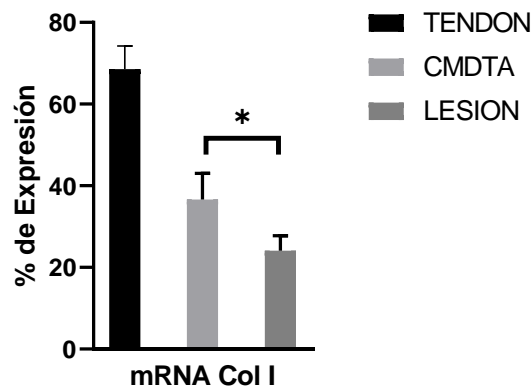
**G/M:** GAPDH – MACHO en zona de lesión del grupo I.

**G/H:** GAPDH – HEMBRA en grupo 2.

**Figura 4. Análisis molecular.** Identificación del gen SRY en las muestras de tendones tratados con células.

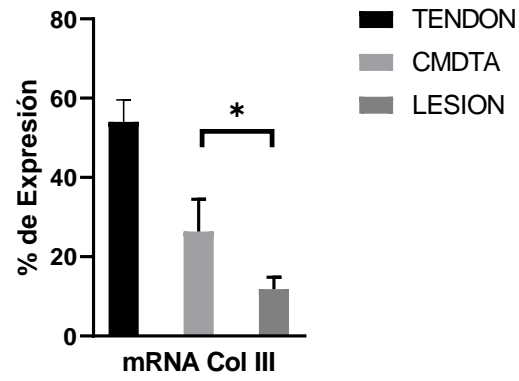


El nivel de expresión para el colágeno I en el grupo de animales que recibió tratamiento con células madre derivadas del tejido adiposo fue de 36.62% y de 24.08 para el grupo 2 o de lesión. Lo que indica, que las células derivadas del tejido adiposo fueron capaces de estimular una mayor expresión del colágeno de tipo I, importante en la estructura del tendón de Aquiles (Figura 5).



**Figura 5. Análisis molecular para la expresión del colágeno tipo I.** Se observa mayor expresión del colágeno tipo I en el grupo donde se aplicó las CMDTA.

El nivel de expresión para el colágeno III en el grupo de animales que recibió tratamiento con células madre derivadas del tejido adiposo fue de 26.35% y de 11.85% para el grupo control de lesión. Esto indica que las células aplicadas fueron capaces de estimular una mayor formación de colágeno de tipo III, lo que influye directamente en el arreglo de las fibras de colágeno de tipo I (Figura 6).



**Figura 6. Análisis molecular para la expresión del colágeno tipo III.** Se observa mayor expresión del colágeno tipo III en el grupo donde se aplicó las CMDTA.

## CAPÍTULO VIII

### DISCUSIÓN

Las lesiones agudas del tendón de Aquiles son relativamente comunes con un proceso de reparación natural lento, complejo e ineficiente debido a su hipocelularidad e hipovascularidad intrínsecas, lo que representa un desafío clínico para los ortopedistas que buscan la mejor opción de tratamiento, el cual sigue siendo variable entre métodos quirúrgicos y no quirúrgicos. Las causas más frecuentes de lesiones en los tendones se asocian principalmente con la práctica de deportes, al envejecimiento, tendinopatías, hipotiroidismo, hipertensión, diabetes mellitus, artropatías, corticosteroides, deficiencia de vitamina C, entre otras causas<sup>73</sup>. Los enfoques biológicos que utilizan células madre mesenquimales, como por ejemplo las derivadas del tejido adiposo, plantean una posible opción de tratamiento, aunque actualmente hay escasez de pruebas sobre su uso terapéutico clínico. Se piensa que la eficacia de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en la medicina regenerativa puede deberse a la liberación de factores de crecimiento y citocinas, así como a sus efectos inmunomoduladores para promover ciertos eventos celulares asociados a la reparación de los tejidos<sup>74,75</sup>.

De la misma manera, existen pocos estudios que utilicen modelos animales para determinar si las CMDTA inyectadas *in situ* son capaces de mejorar los signos histológicos de curación del tendón.

Devana y Cols (2018)<sup>77</sup>, aplicaron CMDTA en ratas que sometieron a una incisión percutánea en el tendón de Aquiles. Utilizaron un hidrogel como

medio de transporte para las células evaluar la cicatrización del tendón a las 3 semanas. En su análisis histológico no encontraron una diferencia estadística en el área de colágeno. En nuestro estudio, utilizando un modelo animal de una mayor escala evolutiva como es el conejo y empleando solución salina como medio de transporte celular, se observa una mayor formación de colágeno en el grupo que recibió CMDTA en comparación al grupo de lesión.

En un estudio realizado en el 2007 por Chong y Cols<sup>78</sup>., se inocularon células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea en lesiones completas del tendón de Aquiles en conejos., utilizando fibrina como medio acarreador de las células. Evaluaron varios parámetros para determinar la eficacia de su tratamiento a la semana 1, 3, 6 y 12. También marcaron con una proteína fluorescente a las células para poder identificarlas a los diferentes tiempos de sacrificio. El grupo de investigadores pudo determinar que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea que fueron marcadas permanecieron viables y presentes en la región intratendinosa durante al menos seis semanas, volviéndose más difusas pero localizables a las 12 semanas. En el presente trabajo de investigación, utilizando otra estrategia para rastrear a las CMDTA como es la identificación por sexado, pudimos determinar la presencia de las células aplicadas en la zona de la lesión en las 12 semanas del estudio.

El mismo grupo de Chong y Cols<sup>78</sup>., reportó que, a las tres semanas las fibras de colágeno parecían más organizadas y había mejores parámetros nucleares morfométricos en el grupo de tratamiento de células

mesenquimales derivadas de la médula ósea ( $p < 0.05$ ). A las 6 y 12 semanas, no hubo diferencias entre los grupos con respecto a los parámetros nucleares morfométricos. En nuestro estudio, utilizando células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo y solución salina como medio acarreador, encontramos que, a las 12 semanas las fibras de colágeno presentaban un mayor arreglo en comparación al grupo control de lesión ( $p < 0.05$ ).

Woo y Cols (1999)<sup>79</sup>., describieron cuatro etapas histológicas durante la fase de curación del tendón que van desde las primeras horas después de la rotura de un tendón, hasta varias semanas después para entender la etapa de maduración. Primero ocurre una fase hemorrágica y la formación de un coágulo de sangre que llena el espacio, en donde la liberación de citocinas atrae a leucocitos y linfocitos polimorfonucleares. A las 24-48 horas se identifica una fase inflamatoria, marcada por la llegada de macrófagos que fagocitan tejido necrótico y liberan factores de crecimiento, induciendo a una neovascularización y la formación de tejido de granulación. La tercera fase, que ocurre dentro de la primera semana, se caracteriza por la presencia de fibroblastos que producen las proteínas características de la matriz extracelular. Durante la fase de remodelación, se disminuye de manera gradual el tejido cicatrizado, la matriz se vuelve más densa y se va orientando longitudinalmente debido al recambio de colágeno y a la disminución en el contenido de agua. Durante las siguientes 12 a 14 semanas, la maduración continúa con un retorno a la concentración y proporción normal de colágeno tipo I y III que comienzan a acercarse a

niveles normales, con predominio principalmente del colágeno tipo I. En el presente trabajo de tesis, analizamos la expresión del colágeno de tipo I y III entre ambos grupos mediante una RT-qPCR para poder determinar cómo se encontraba la síntesis de estas importantes proteínas propias de la matriz extracelular del tendón. El nivel de expresión para el colágeno I en el grupo de animales que recibió tratamiento con células madre derivadas del tejido adiposo fue de 36.62% y de 24.08 % para el grupo 2 o de lesión. Lo que indica, que las células derivadas del tejido adiposo fueron capaces de estimular una mayor expresión del colágeno de tipo I, importante en la estructura del tendón de Aquiles. En cuanto al nivel de expresión para el colágeno III en el grupo de animales que recibió tratamiento con células madre derivadas del tejido adiposo fue de 26.35% y de 11.85% para el grupo control de lesión. Esto indica que las células aplicadas fueron capaces de estimular una mayor formación de colágeno de tipo III, lo que influye directamente en el arreglo de las fibras de colágeno de tipo I. Oshita y Cols (2016)<sup>80</sup>, evaluaron los efectos de las células madre derivadas de tejido adiposo en un modelo de tendinopatía de rata inducido por colagenasa. Este grupo de investigadores realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) para medir la relación entre el ARN mensajero del colágeno tipo III (ARNm) y el ARNm del colágeno tipo I en los tendones lesionados. Encontraron que la proporción de colágeno tipo III con respecto al colágeno tipo I fue significativamente más baja en el grupo de CMDTA que en el grupo de lesión a las 12 semanas después del tratamiento. Además, esta proporción disminuyó con el tiempo en el grupo tratado con

CMDTA, mientras que aumentó con el tiempo en el grupo de lesión. Estos resultados, pueden compararse con los encontrados en nuestro estudio en donde observamos una síntesis de ambas proteínas más elevada, en comparación a nuestro grupo control en donde se realizó un corte en todo el diámetro del tendón de Aquiles en el modelo animal que utilizamos (conejo) el cual es de de una escala evolutiva más elevada y con una mayor exigencia en la biomecánica de sus miembros posteriores.

## **CAPÍTULO IX**

### **CONCLUSIONES**

Los hallazgos del presente estudio sugieren que la aplicación de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en lesiones por un corte transversal del tendón de Aquiles, pueden favorecer a la reparación estructural de este importante tejido con una síntesis más rica en colágenos y con un mejor arreglo entre las fibras. Sin embargo, se requiere de tiempos más prolongados que permitan determinar la reparación completa, así como estudios que analicen el módulo de tensión para poder estimar si los hallazgos patológicos son congruentes con la resistencia a la biomecánica normal del modelo animal utilizado. Histológicamente observamos un tejido más organizado al momento de aplicar electroestimulación a los 15 y 30 días en el modelo animal de osteosíntesis.



## **CAPÍTULO X**

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. 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: official journal of the ESSKA*, 18(5), 638–643.
2. O'Brien M (2005) The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin N Am* 10:225–238
3. Cumins EJ, Anson BJ, Carr BW, Wright RR, Hauser ED (1946) The structure of the calcaneal (Achilles) tendon in relation to orthopaedic surgery. *Surg Gynaecol Obst* 83:107
4. Chen, T.M., Rozen, W.M., Pan, W.-R., Ashton, M.W., Richardson, M.D., Taylor, G.I. (2009). The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clin. Anat.* 22, 377–385
5. Wong M, Jardaly AH, Kiel J. (2022) Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Achilles Tendon. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls
6. Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 10, 312–320
7. Henninger, H.B., Underwood, C.J., Romney, S.J., Davis, G.L., Weiss, J.A. (2013). Effect of elastin digestion on the quasi-static tensile response of medial collateral ligament. *J. Orthop. Res.* 31, 1226–1233

8. Waggett, A.D., Ralphs, J.R., Kwan, A.P., Woodnutt, D., Benjamin, M., (1998). Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol.* 16, 457–470.
9. Strocchi R, De Pasquale V, Guizzardi S, Govoni P, Facchini A, Raspanti M, Girolami M, Giannini S (1991) Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. *Foot Ankle* 12:100–104
10. Ker RF. (1981). Dynamic tensile properties of the plantaris tendon of sheep (*Ovis aries*). *J Exp Biol* 93, 283–302.
11. Scott SH, Winter DA. (1990). Internal forces of chronic running injury sites. *Med Sci Sports Exerc* 22, 357–69.
12. Shamrock AG, Varacallo M. (2022) Achilles Tendon Rupture. [Updated 2022 Feb 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls
13. Maffulli N, Via AG, Oliva F. (2017). Chronic Achilles Tendon Rupture. *Open Orthop J.* 11, 660-669.
14. Egger, A. C., & Berkowitz, M. J. (2017). Achilles tendon injuries. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 10(1), 72–80.
15. Sode J, Obel N, Hallas J, Lassen A. (2007). Use of fluroquinolone and risk of Achilles tendon rupture: a population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol.* 63(5), 499–503.
16. Holmes GB, Lin J. (2006). Etiologic factors associated with symptomatic Achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int.* 27(11), 952–959.
17. Longo UG, Ronga M, Maffulli N. (2009). Acute ruptures of the Achilles tendon. *Sports Med Arthrosc.* 17(2), 127–138.

18. Barfred T. (1973). Achilles tendon rupture: aetiology and pathogenesis of subcutaneous rupture assessed on the basis of the literature and rupture experiments on rats. *Acta Orthop Scand.* 44(sup152), 1–126.
19. Kannus P, Jozsa L. (1991). Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 73(10), 1507–1525.
20. Magnan, B., Bondi, M., Pierantoni, S., & Samaila, E. (2014). The pathogenesis of Achilles tendinopathy: a systematic review. *Foot and ankle surgery: official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons*, 20(3), 154–159.
21. Pearce, C. J., & Tan, A. (2017). Non-insertional Achilles tendinopathy. *EFORT open reviews*, 1(11), 383–390.
22. Miners, A. L., & Bougie, T. L. (2011). Chronic Achilles tendinopathy: a case study of treatment incorporating active and passive tissue warm-up, Graston Technique, ART, eccentric exercise, and cryotherapy. *The Journal of the Canadian Chiropractic Association*, 55(4), 269–279.
23. Schepsis, A. A., Jones, H., & Haas, A. L. (2002). Achilles tendon disorders in athletes. *The American journal of sports medicine*, 30(2), 287–305.
24. Uquillas, C. A., Guss, M. S., Ryan, D. J., Jazrawi, L. M., & Strauss, E. J. (2015). Everything Achilles: Knowledge Update and Current Concepts in Management: AAOS Exhibit Selection. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 97(14), 1187–1195.

25. Jiménez Martín F, Alonso Valdazo MD, Díaz Peña G, Fernández Leroy J, Hernández Herrero D, Díaz García F. (2017) Síndrome de Haglund. A propósito de 2 casos. *Reumatol Clin*, 13, 37–38.
26. Park, S. H., Lee, H. S., Young, K. W., & Seo, S. G. (2020). Treatment of Acute Achilles Tendon Rupture. *Clinics in orthopedic surgery*, 12(1), 1–8.
27. Ames, P. R., Longo, U. G., Denaro, V., & Maffulli, N. (2008). Achilles tendon problems: not just an orthopaedic issue. *Disability and rehabilitation*, 30(20-22), 1646–1650.
28. Shamrock AG, Varacallo M. Achilles Tendon Rupture. [Updated 2022 Feb 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430844/>
29. Horstmann, T., Lukas, C., Merk, J., Brauner, T., & Mündermann, A. (2012). Deficits 10-years after Achilles tendon repair. *International journal of sports medicine*, 33(6), 474–479.
30. Leppilahti, J., & Orava, S. (1998). Total Achilles tendon rupture. A review. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 25(2), 79–100.
31. Silbernagel, K. G., Steele, R., & Manal, K. (2012). Deficits in heel-rise height and achilles tendon elongation occur in patients recovering from an Achilles tendon rupture. *The American journal of sports medicine*, 40(7), 1564–1571.
32. Black, D. A., Lindley, S., Tucci, M., Lawyer, T., & Benghuzzi, H. (2011). A new model for repair of the Achilles tendon in the rat. *Journal of*

investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research, 24(5), 217–221.

33. Buttin, P., Goin, B., Giraud, N., Viguier, E., & Cachon, T. (2020). Biomechanical analysis of an original repair of an achilles tendon rupture in dogs: preliminary results. *Computer Methods In Biomechanics And Biomedical Engineering*, 23(sup1), S52-S54.
34. Buttin, P., Goin, B., Cachon, T., & Viguier, E. (2020). Repair of Tendon Disruption Using a Novel Synthetic Fiber Implant in Dogs and Cats: The Surgical Procedure and Three Case Reports. *Veterinary medicine international*, 2020, 4146790.
35. Meier Bürgisser, G., Calcagni, M., Bachmann, E., Fessel, G., Snedeker, J. G., Giovanoli, P., & Buschmann, J. (2016). Rabbit Achilles tendon full transection model - wound healing, adhesion formation and biomechanics at 3, 6 and 12 weeks post-surgery. *Biology open*, 5(9), 1324–1333.
36. Nagasawa, K., Noguchi, M., Ikoma, K., & Kubo, T. (2008). Static and dynamic biomechanical properties of the regenerating rabbit Achilles tendon. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)*, 23(6), 832–838.
37. Doherty, G. P., Koike, Y., Uthoff, H. K., Lecompte, M., & Trudel, G. (2006). Comparative anatomy of rabbit and human achilles tendons with magnetic resonance and ultrasound imaging. *Comparative medicine*, 56(1), 68–74.

38. Park, S. H., Lee, H. S., Young, K. W., & Seo, S. G. (2020). Treatment of Acute Achilles Tendon Rupture. *Clinics in orthopedic surgery*, 12(1), 1–8.
39. Khan, R. J., & Carey Smith, R. L. (2010). Surgical interventions for treating acute Achilles tendon ruptures. *The Cochrane database of systematic reviews*, (9), CD003674.
40. Willits, K., Amendola, A., Bryant, D., Mohtadi, N. G., Giffin, J. R., Fowler, P., Kean, C. O., & Kirkley, A. (2010). Operative versus nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a multicenter randomized trial using accelerated functional rehabilitation. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 92(17), 2767–2775.
41. Ma, G. W., & Griffith, T. G. (1977). Percutaneous repair of acute closed ruptured achilles tendon: a new technique. *Clinical orthopaedics and related research*, (128), 247–255.
42. Klein, W., Lang, D. M., & Saleh, M. (1991). The use of the Ma-Griffith technique for percutaneous repair of fresh ruptured tendo Achillis. *La Chirurgia degli organi di movimento*, 76(3), 223–228.
43. Delponte, P., Potier, L., de Poulpiquet, P., & Buisson, P. (1992). Traitement des ruptures sous-cutanées du tendon d'Achille par ténorrhaphie percutanée [Treatment of subcutaneous ruptures of the Achilles tendon by percutaneous tenorrhaphy]. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur*, 78(6), 404–407.

44. Webb, J. M., & Bannister, G. C. (1999). Percutaneous repair of the ruptured tendo Achillis. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 81(5), 877–880.
45. McClelland, D., & Maffulli, N. (2002). Percutaneous repair of ruptured Achilles tendon. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, 47(4), 613–618.
46. Carmont, M. R., & Maffulli, N. (2008). Modified percutaneous repair of ruptured Achilles tendon. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*, 16(2), 199–203.
47. Davies, H., Agrawal, Y., Blundell, C., & Davies, M. B. (2017). Outcome following use of the Achillon jig for the repair of acutely ruptured Achilles tendons. *Injury*, 48(3), 781–783.
48. A, B. (2017). Achilles Tendon Injuries: Comparison of Different Conservative and Surgical Treatment and Rehabilitation. *Journal Of Novel Physiotherapy And Rehabilitation*, 1(1), 039-053. doi: 10.29328/journal.jnpr.1001006
49. Reda, Y., Farouk, A., Abdelmonem, I., & El Shazly, O. A. (2020). Surgical versus non-surgical treatment for acute Achilles' tendon rupture. A systematic review of literature and meta-analysis. *Foot and ankle surgery: official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons*, 26(3), 280–288.
50. Soroceanu, A., Sidhwa, F., Aarabi, S., Kaufman, A., & Glazebrook, M. (2012). Surgical versus nonsurgical treatment of acute Achilles tendon

rupture: a meta-analysis of randomized trials. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 94(23), 2136–2143.

51. Marx R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 62(4), 489–496
52. Madhi, M. I., Yausep, O. E., Khamdan, K., & Trigkilidas, D. (2020). The use of PRP in treatment of Achilles Tendinopathy: A systematic review of literature. Study design: Systematic review of literature. *Annals of medicine and surgery (2012)*, 55, 320–326.
53. Lin, M. T., Chiang, C. F., Wu, C. H., Hsu, H. H., & Tu, Y. K. (2018). Meta-analysis Comparing Autologous Blood-Derived Products (Including Platelet-Rich Plasma) Injection Versus Placebo in Patients With Achilles Tendinopathy. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 34(6), 1966–1975.e5.
54. Fitzpatrick, J., Bulsara, M. K., O'Donnell, J., & Zheng, M. H. (2019). Leucocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Treatment of Gluteus Medius and Minimus Tendinopathy: A Double-Blind Randomized Controlled Trial With 2-Year Follow-up. *The American journal of sports medicine*, 47(5), 1130–1137.
55. Lin, K., Chen, P., Chen, A., Chan, Y., Lei, K., & Chiu, C. (2022). Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Has Better Stimulating Effects on



Tenocyte Proliferation Compared With Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma. *Orthopaedic Journal Of Sports Medicine*, 10(3), 232596712210847. doi: 10.1177/23259671221084706

56. Krogh, T. P., Ellingsen, T., Christensen, R., Jensen, P., & Fredberg, U. (2016). Ultrasound-Guided Injection Therapy of Achilles Tendinopathy With Platelet-Rich Plasma or Saline: A Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Trial. *The American journal of sports medicine*, 44(8), 1990–1997.
57. Filardo, G., Kon, E., Di Matteo, B., Di Martino, A., Tesei, G., Pelotti, P., Cenacchi, A., & Marcacci, M. (2014). Platelet-rich plasma injections for the treatment of refractory Achilles tendinopathy: results at 4 years. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 12(4), 533–540.
58. Wang, C., Fan, H., Li, Y., Yun, Z., Zhang, Z., & Zhu, Q. (2021). Effectiveness of platelet-rich plasma injections for the treatment of acute Achilles tendon rupture: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 100(41), e27526.
59. Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. (2010). Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(6):1104–9.
60. Lin F. (2010). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: A fat chance of curing kidney disease. *Kidney Int*, 82(7):731–3.
61. Liang, W., Chen, X., Zhang, S., Fang, J., Chen, M., Xu, Y., & Chen, X. (2021). Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor

growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cellular & molecular biology letters*, 26(1), 3.

62. Schnabel, L. V., Lynch, M. E., van der Meulen, M. C., Yeager, A. E., Kornatowski, M. A., & Nixon, A. J. (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(10), 1392–1398.
63. Yuksel, S., Guleç, M.A., Gultekin, M.Z., Adanır, O., Caglar, A., Beytemur, O., Küçükyıldırım, B.O., Avcı, A., Suba, C., İnci, Ç., et al. (2016). Comparison of the early period effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the Achilles tendon ruptures in rats. *Connect. Tissue Res*, 57, 360–373.
64. Cho, W. S., Chung, S. G., Kim, W., Jo, C. H., Lee, S. U., & Lee, S. Y. (2021). Mesenchymal Stem Cells Use in the Treatment of Tendon Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Clinical Studies. *Annals of rehabilitation medicine*, 45(4), 274–283.
65. Bolt, P., Clerk, A. N., Luu, H. H., Kang, Q., Kummer, J. L., Deng, Z. L., Olson, K., Primus, F., Montag, A. G., He, T. C., Haydon, R. C., & Toolan, B. C. (2007). BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 89(6), 1315–1320.

66. Kim, S. E., Kim, J. G., & Park, K. (2019). Biomaterials for the Treatment of Tendon Injury. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 16(5), 467–477.
67. Guevara-Alvarez A, Schmitt A, Russell RP, Imhoff AB, Buchmann S. (2014). Growth factor delivery vehicles for tendon injuries: mesenchymal stem cells and platelet rich plasma. *Muscles Ligaments Tendons J*, 4. 378–385.
68. Hee, C. K., Dines, J. S., Dines, D. M., Roden, C. M., Wisner-Lynch, L. A., Turner, A. S., McGilvray, K. C., Lyons, A. S., Puttlitz, C. M., & Santoni, B. G. (2011). Augmentation of a rotator cuff suture repair using rhPDGF-BB and a type I bovine collagen matrix in an ovine model. *The American journal of sports medicine*, 39(8), 1630–1639.
69. Manning, C. N., Kim, H. M., Sakiyama-Elbert, S., Galatz, L. M., Havlioglu, N., & Thomopoulos, S. (2011). Sustained delivery of transforming growth factor beta three enhances tendon-to-bone healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, 29(7), 1099–1105.
70. Chiou, G. J., Crowe, C., McGoldrick, R., Hui, K., Pham, H., & Chang, J. (2015). Optimization of an injectable tendon hydrogel: the effects of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cells on tendon healing in vivo. *Tissue engineering. Part A*, 21(9-10), 1579–1586.
71. Moshiri, A., Oryan, A., & Meimandi-Parizi, A. (2015). Synthesis, development, characterization, and effectiveness of bovine pure

platelet gel-collagen-polydioxanone bioactive graft on tendon healing.  
Journal of cellular and molecular medicine, 19(6), 1308–1332.

72. Chen, B., Wang, B., Zhang, W. J., Zhou, G., Cao, Y., & Liu, W. (2012).  
In vivo tendon engineering with skeletal muscle derived cells in a  
mouse model. *Biomaterials*, 33(26), 6086–6097.
73. Rosenbaum A.J.; Wicker, J.F.; Dines, J.S.; Bonasser, L.; Razzano, P.;  
Dines, D.M.; Grande, D.A. Histologic stages of healing correlate with  
restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair.  
*HSS J* 2010, 6(2), 164-70, doi: 10.1007/s11420-009-9152-5.
74. Zabrzyński, J.; Łapaj, Ł.; Paczesny, Ł.; Zabrzyńska, A.; Grzanka, D.  
Tendon - function-related structure, simple healing process and  
mysterious ageing. *Folia Morphol (Warsz)* 2018, 77(3), 416-427, doi:  
10.5603/FM.a2018.0006.
75. Okamoto, N.; Kushida, T.; Oe, K.; Umeda, M.; Ikehara, S.; Iida, H.  
Treating Achilles tendon rupture in rats with bone-marrow-cell  
transplantation therapy. *J Bone Joint Surg Am* 2010, 92, 2776–2784,  
doi: 10.2106/JBJS.I.01325.
76. Schneider, M.; Angele, P.; Jarvinen, T.A.H.; Docheva, D. Rescue plan  
for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells  
in tendon wound healing. *Adv Drug Deliv* 2017, 129, 352–375, doi:  
10.1016/j.addr.2017.12.016.
77. Devana, S.K.; Kelley, B.V.; McBride, O.J.; Kabir, N.; Jensen, A.R.;  
Park, S.J.; Eliasberg, C.D.; Dar, A.; Mosich, G.M.; Kowalski, T.J.;  
Péault, B.; Petrigliano, F.A.; SooHoo, N.F. Adipose-derived Human

Perivascular Stem Cells May Improve Achilles Tendon Healing in Rats.  
Clin Orthop Relat Res 2018, 476(10), 2091-2100, doi:  
10.1097/CORR.0000000000000461.

78. Chong, A.K.; Ang, A.D.; Goh, J.C.; Hui, J.H.; Lim, A.Y.; Lee, E.H.; Lim, B.H. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. J Bone Joint Surg 2007, 89(1), 74-81, doi: 10.2106/JBJS.E.01396.

79. Woo, S.L.; Hildebrand, K.; Watanabe, N.; Fenwick, J.A.; Papageorgiou, C.D.; Wang, J.H. Tissue engineering of ligament and tendon healing. Clin Orthop Relat Res 1999, 367, S312-23, doi: 10.1097/00003086-199910001-00030.

80. Oshita, T.; Tobita, M.; Tajima, S.; Mizuno, H. Adipose-Derived Stem Cells Improve Collagenase-Induced Tendinopathy in a Rat Model. Am J Sports Med 2016, 44(8), 1983-9, doi: 10.1177/0363546516640750.

## APÉNDICE A

### TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

#### A.1. Preparación de la Muestra

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con formalina al 10 % en PBS pH 7.2-7.4 por 24 hrs.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100 %.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina.
- 8.- Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
- 9.- Adherir los cortes en el baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Teñir.
- 12.- Deshidratar y aclarar.
- 13.- Montar el cubreobjetos añadiendo resina sintética.

#### A.2 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniaca (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con alcohol etílico 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.- Montar con resina sintética.

#### A.3 Técnica de tinción con el método tricrómico de Masson

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %  
Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 5 µm.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 % y agua destilada.
- 2.- Usar como "mordente" el fijador de Bouin por 30-60 min a 56°C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente, 5 min o hacer 3 cambios de 15 seg.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 5 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
- 12.- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético por 1-2 min.
- 14.- Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

## APÉNDICE B PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

### **B.1. Solución de formalina 10 %**

\* Para preparar 500 mL

Formalina 37 %	136 mL
PBS 1X	364 mL

### **B.2. PBS 10 X**

\* Para preparar 100 mL

NaCl	8.0 gr
KCl	0.20 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 gr

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4°C.

### **B.3. PBS 1X**

\* Para preparar 500 mL

PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4°C.

### **B.4. Hematoxilina de Gill**

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 gr
* Si está en cristales pesar	2.36 gr
Yodato de sodio	0.2 gr
Sulfato de aluminio	17.6 gr
Ácido acético glacial	2.0 mL

\* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.



### **B.5. Eosina**

#### Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 gr
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

#### Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

### **B.6. Solución de alcohol-ácido**

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

### **B.7. Solución de agua Amoniacal**

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

### **B.8. Hematoxilina férrica de Weigert**

#### Solución A

Hematoxilina	1 gr
Alcohol de 96°	100 mL

#### Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29%	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico	1 mL

#### Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo).

#### Solución de Cloruro Férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 gr
Agua destilada	50 mL

### **B.9. Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich al 1 %	90 mL
Fucsina ácida al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

#### **\* Solución de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 gr
Agua destilada	100 mL

#### **\* Solución de fucsina ácida**

Fucsina ácida	1 gr
Agua destilada	100 mL

### **B.10. Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico**

Ácido Fosfomolibdico	5 gr
Ácido Fosfotúngstico.	5 gr
Agua destilada	200 mL

### **B.11. Solución de azul de anilina**

Azul de anilina	2.5 gr
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

### **B.12. Solución acuosa de ácido acético al 1%**

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

### **B.13. Solución fijadora de Bouin**

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38%)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

### **B.14. Solución enjuagadura sulfurosa**

Agua	300 mL
Ac. Clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de Sodio 10 %	18 mL

### **B.15. Solución metabisulfito de sodio 10 %**

Metabisulfito de Sodio 10 %	10 gr
Agua	100 mL