

# RICOSTRUZIONE IN VITRO DI TESSUTO TENDINEO

F. BASSETTO<sup>1</sup>, B. ZAVAN<sup>2</sup>, C. TONELLO<sup>2</sup>, E. DELLA VEDOVA<sup>1</sup>, G. ABATANGELO<sup>2</sup>, V. VINDIGNI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica di Chirurgia Plastica, Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Università di Padova

<sup>2</sup>Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova

---

## *In vitro tendon tissue engineering*

### SUMMARY

**Intoduction:** *Traumatized tendons heal due to the deposition of collagen via tenocytes, specialized fibroblasts of tendinous tissue. These cells have shown to possess regenerative potential and have been the object of in vitro experiments on tendon reconstruction. Purpose:* The goal of this study is to investigate the effect of cyclic mechanical stimulation on tenocytes seeded onto hyaluronic acid based scaffolds, and to determine the potential of the engineered constructs to function as tendon tissue replacement models. **Methods:** We studied human tenocytes isolated from tendon explants obtained from hand lesions. Tenocytes were expanded in vitro and then seeded onto hyaluronic acid based scaffolds (Hyalonect®). Tissue constructs were then placed into a bioreactor, devised by the authors, which was able to reproduce mechanical traction normally present in vivo. Controls were left untensioned. Histological, immunohistochemical, biomolecular, transmission and microscopic electronic analyses were used to evaluate the results after 7, 14, and 21 days. **Results:** At each time frame tenocytes showed a capacity to adhere and proliferate within the biomaterial and produce the principal components of the extracellular matrix, like collagen fibres. Microscopically, cyclically tensioned samples showed parallel orientation of collagen fibers and spindle-shaped cell nuclei mimicking the morphology of normal tendons. Moreover, mechanostimulation resulted in significantly stronger and stiffer constructs compared to untensioned samples. Higher expression of matrix proteins such as collagen I and adhesion proteins such as integrin 1 and scleraxis (tendon-specific marker) were found in cyclically tensioned samples. **Conclusions:** Human tenocytes, when stressed under adequate mechanical loads are able to develop a structure similar to an in vivo tendon. Mechanical traction are essential for sustaining cellular phenotype. Mechanical traction enhances cell proliferation and tenocytes longitudinal alignment. The model reproduces similar conditions of normal tendon healing preventing differentiation of tenocytes in fibroblasts. Duration, frequencies and amplitude of loading directly influence cellular response and behavior under in vitro conditions. Understanding the physiological window for these parameters is critical and represents future challenges of research in tendon tissue engineering.

Riv Chir Mano 2009; 64-69

### KEY WORDS

Tendon, tissue engineering, regenerative medicine

---

### RIASSUNTO

**Introduzione:** *La guarigione ed il ripristino della continuità dei tendini lesi sono assicurati dalla deposizione di collagene ad opera dei tenociti, fibroblasti specializzati del tessuto tendineo. Tali cellule hanno dimostrato avere potenzialità rigenerative e sono state alla base delle osservazioni sperimentali sulla ricostruzione dei tendini in laboratorio. Obiettivo di questo studio è la ricostruzione in laboratorio di una struttura similtendinea partendo da tenociti umani ottenuti da campioni di tessuto tendineo. Materiali e metodi:* Sono stati utilizzati tenociti, derivati da espunti di tendine. I tenociti, espansi in coltura, sono stati seminati su un biomateriale a base di acido ialuronico (Hyalonect®) e coltivati in condizioni

*di trazione in un bioreattore da noi ideato. Tale bioreattore è risultato essere in grado di riprodurre in vitro i normali stimoli meccanici presenti in vivo a livello delle strutture tendinee. I risultati sono stati valutati con metodiche istologiche, immunoistochimiche, di microscopia elettronica e di biologia molecolare dopo 7, 14, e 21 giorni di coltura in condizioni statiche e dinamiche. **Risultati:** Nei differenti intervalli di tempo esaminati, i tenociti hanno dimostrato la capacità di aderire e proliferare nel contesto del biomateriale e di secernere le principali componenti della matrice extracellulare, come le fibre collagene. Nei campioni soggetti a stress meccanico abbiamo osservato una migliore disposizione architetturale delle componenti cellulari nel biomateriale, ed una maggior sintesi di fibre collagene. **Conclusioni:** I tenociti umani, quando sottoposti ad adeguati stimoli meccanici sono in grado di sviluppare un costrutto simultaneo in vitro. Le forze meccaniche sono essenziali per il mantenimento del fenotipo cellulare tenocitario.*

## PAROLE CHIAVE

Tendine, ingegneria dei tessuti, medicina rigenerativa

## INTRODUZIONE

I tendini sono strutture connettivali che connettono i muscoli allo scheletro osseo, formando l'unità muscolo-tendinea. La funzione principale dell'unità muscolo-tendinea è la trasmissione delle forze di tensione meccanica generate dai muscoli per muovere e stabilizzare le articolazioni. Le proprietà biomeccaniche dei tendini sono attribuite all'elevata organizzazione strutturale della matrice extracellulare (ECM). L'ECM dei tendini è principalmente composta da collagene di tipo I, ed è organizzata in fascicoli paralleli immersi in un medium di proteoglicani. Le basi cellulari della guarigione tendinea non sono state completamente chiarite ed il completo ripristino morfologico e funzionale dopo una lesione tendinea rappresenta un problema complesso per i chirurghi. Dopo una lesione, il processo di guarigione nei tendini provoca la formazione di una cicatrice fibrosa e le proprietà strutturali e meccaniche del tessuto "guarito" sono inferiori rispetto a quelle del tendine normale. Il tendine possiede una scarsa potenzialità rigenerativa. Nonostante i processi tardivi di rimodellamento cicatriziale, le proprietà biochimiche e meccaniche del tendine guarito non sono mai sovrapponibili a quelle di un tendine intatto. Una possibile spiegazione di questo è l'assenza di stimoli meccanici al tendine leso durante il periodo di immobilizzazione post-operatoria. In letteratura è ben documentata

to il ruolo diretto delle forze meccaniche sulla proliferazione e differenziazione dei tenociti, che, in assenza di stimoli meccanici, perdono il loro caratteristico fenotipo cellulare (1-4). Il mantenimento del fenotipo tenocitario ha sempre rappresentato un ostacolo per lo sviluppo di un costrutto tendineo in vitro. I tenociti posti in coltura in condizioni statiche perdono la loro capacità di secernere le proteine proprie dell'ECM tendinea e si de-differenziano in fibroblasti meno specializzati (5-10). Obiettivo di questo lavoro è testare un bioreattore in vitro, in grado di riprodurre sul costrutto tendineo ingegnerizzato le forze meccaniche normalmente presenti in vivo. Gli stimoli meccanici sono in grado di mantenere durante i periodi di coltura cellulare il fenotipo dei tenociti. Un approfondimento scientifico, che attesti gli effetti molecolari ed istologici, che le forze meccaniche hanno su un costrutto tendineo in vitro, riveste anche una notevole implicazione clinica: la fisioterapia precoce, portando a livello della lesione un progressiva forza tensile, stimola una guarigione fisiologica.

## MATERIALI E METODI

### Biomateriale

È stato utilizzato un biomateriale costituito dall'estere benzilico al 100% dell'acido ialuronico, denomina-

to Hyalonaect®. Il biomateriale in forma tubolare è costituito da fibre di acido ialuronico di 100 g/m<sup>2</sup> ed è stato gentilmente fornito dalla Fidia Advanced Biopolimers (FAB) di Abano Terme, Padova.

### Colture cellulari

I tenociti sono stati ottenuti da prelievi di tessuto tendineo. I campioni tessutali sono stati prelevati in seguito a ferite traumatiche della mano, caratterizzate da perdite di sostanze tendinea, senza possibilità di ricostruzione immediata dei monconi tendinei lesionati (Fig. 1A). Tutti i prelievi sono stati eseguiti presso la Clinica di Chirurgia Plastica dell'Università di Padova. In totale sono stati inviati al laboratorio 8 campioni, prelevati da 5 pazienti di sesso maschile e 3 di sesso femminile con lesioni dell'apparato estensore e flessore della mano.

Le biopsie tendinee sono state lavate con PBS, quindi tagliate in piccole strisce e poste nelle capsule di coltura con DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) (Fig. 1 B-D). Dopo 7 giorni, tempo necessario per permettere il distacco dei tenociti dal tessuto, le cellule sono state tripsinizzate con tripsina ed amplificate. Le colture di tenociti sono state successivamente seminate su campioni di biomateriale delle

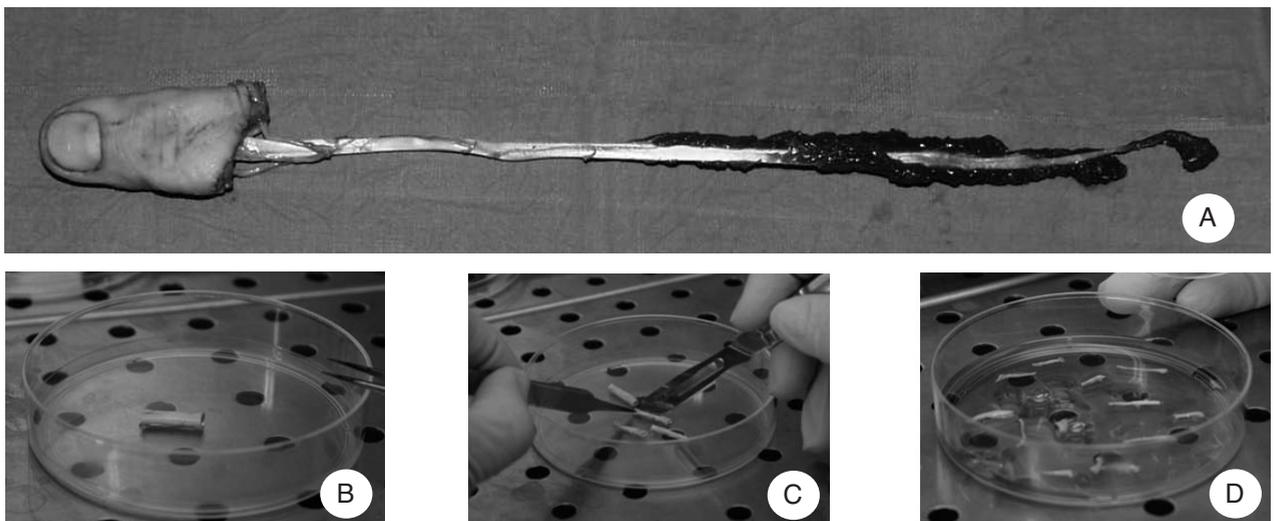
dimensioni di 1x2 cm, precedentemente ancorato alla base della piastra di coltura con fibrina. I tenociti sono stati seminati sul biomateriale alla densità di 10<sup>6</sup> cellule x cm<sup>2</sup>/50 µl di terreno. Per valutare l'adesione e la proliferazione cellulare nel contesto del biomateriale è stato fatto un studio preliminare su campioni dopo 7, 14 e 21 giorni.

### Coltura dei tenociti in condizioni di trazione

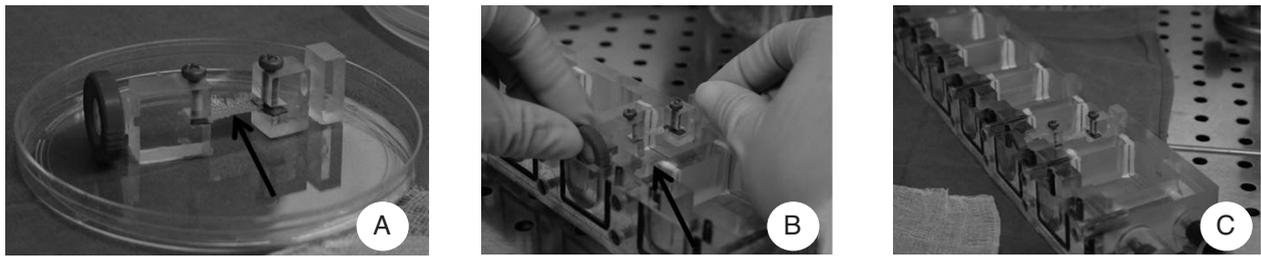
Le colture di tenociti su biomateriale a distanza di 7 giorni, osservata una perfetta integrazione cellulare con il biomateriale, sono state poste in un bioreattore sviluppato presso la nostra Università (Fig. 2). Il bioreattore consiste di un dispositivo a celle separate, dotate di supporti mobili rispetto all'asse longitudinale posti all'estremità di ogni cella (Fig. 2). Su tali supporti, sono stati collocati i campioni di tendine ingegnerizzati in coltura, e, ad intervalli di 2 giorni, è stato applicato un stress meccanico di allungamento.

### Analisi dei risultati

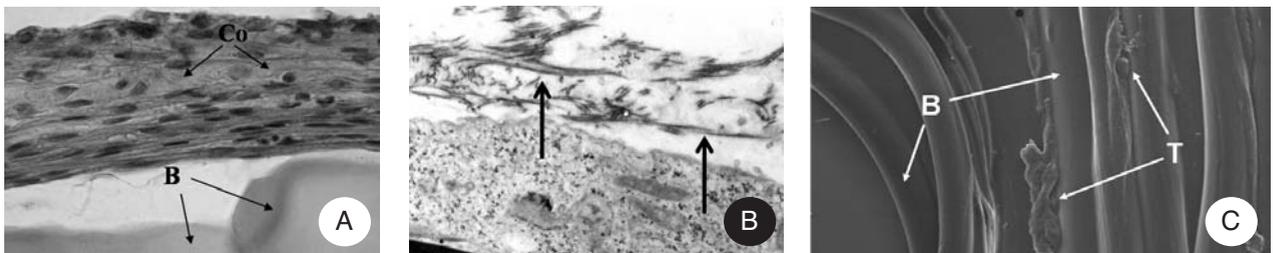
I costrutti tendinei sono stati prelevati dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura in trazione. Per valutare la proli-



**Figura 1.** L'isolamento dei tenociti dai campioni di tessuto tendineo. A) un esempio di trauma da strappamento del primo dito della mano sinistra, da cui è stato ottenuto un campione di tessuto; B) il campione viene posto in sterilità sulla piastra di coltura; C) la frammentazione meccanica del campione viene eseguita sotto cappa sterile a flusso laminare; D) i frammenti vengono posti in coltura per permettere la fuoriuscita dei tenociti.



**Figura 2.** Il prototipo di bioreattore per la coltura in condizioni dinamiche dei costrutti tendinei. A) la freccia nera indica il costrutto tendineo che viene posto in trazione, quando posizionato nell'apposito dispositivo; B) il dispositivo di trazione viene inserito in una camera di coltura (freccia); C) il bioreattore con le camere di coltura poste in serie.



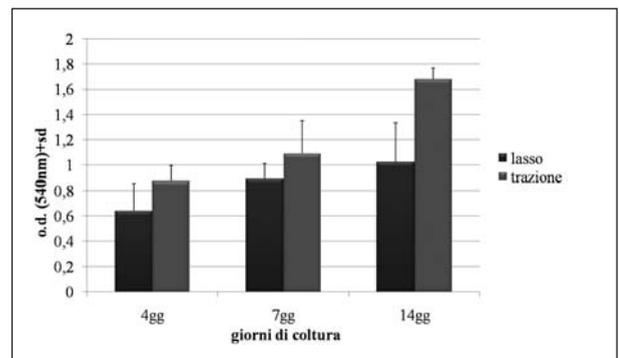
**Figura 3.** Il costrutto tendineo dopo 21 giorni di coltura in condizioni dinamiche. A) Colorazione con ematossilina-eosina (20x, scale bar 50µm), le frecce indicano le fibre collagene (Co) e il biomateriale (B); B) microscopia a trasmissione che mette in evidenza la disposizione delle fibre collagene (10000x); C) microscopia a scansione che illustra l'adesione del tenocita alla fibra del biomateriale (T: Tenocita, B: Biomateriale).

ferazione cellulare è stato utilizzato il test quantitativo MTT (4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium. Sono state eseguite le indagini istologiche standard con ematossilina-eosina, studi di microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione ed analisi biomolecolari mediante real-time PCR. Per la reazione di amplificazione è stato usato il kit SYBR Green I (Invitrogen) utilizzando il termocicizzatore Rotor-Gene TM 3500 (Corbett Research).

**RISULTATI**

Dopo 21 giorni di coltura in trazione il costrutto tendineo presentava un allungamento del 25% maggiore della lunghezza precedentemente misurata. Dopo 21 giorni, i tenociti presentavano morfologia allungata nella stessa direzione della trazione (Fig. 3A), erano presenti i principali costituenti della matrice extracellulare, come il collagene (Fig. 3A, B). I tenociti presenti nel contesto del

costrutto aderivano perfettamente alle fibre del biomateriale (Fig. 3C). Il grado di proliferazione cellulare dei tenociti in coltura sul biomateriale risultava maggiore, nei diversi intervalli di tempo osservati, nei costrutti sottoposti a trazione meccanica, rispetto al gruppo di controllo mantenuto in condizioni statiche per tutto il periodo dello studio (Fig. 4).



**Figura 4.** Proliferazione dei tenociti sul biomateriale in condizioni statiche e dinamiche.

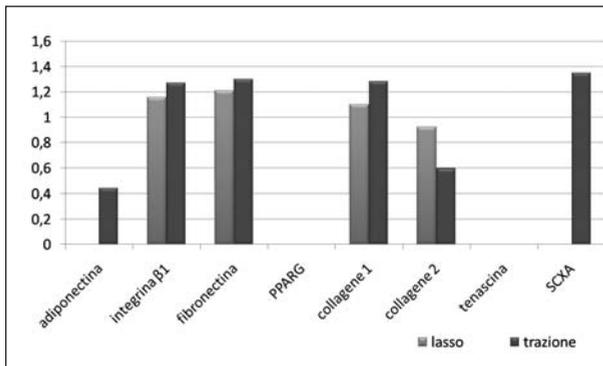


Figura 5. Espressione genica dei tenociti ottenuta mediante RT-PCR.

Le indagini biomolecolari evidenziavano una maggior espressione di proteine di adesione come l'integrina  $\beta 1$  e la scleraxis, e di collagene I nei costrutti sottoposti a trazione rispetto al gruppo di controllo (Fig. 5). Il gruppo di controllo presentava una maggior espressione di collagene di tipo II, collagene normalmente non presente nel tessuto tendineo, e quindi espressione di un progressiva de-differenziamento del fenotipo tenocitario (Fig. 5).

## DISCUSSIONE

Nei gravi traumi della mano, il cui tendine è compromesso nel 30% dei casi, la lesione tendinea rappresenta la principale causa della compromissione della funzionalità della mano. Nei casi più complessi, il chirurgo deve ricorrere all'impiego di sostituti tendinei, impiegando autoinnesti, omoinnesti o materiali sintetici provvisori. Queste alternative presentano alcuni svantaggi: gli autoinnesti richiedono il sacrificio di un'altra sede corporea impiegata per il prelievo, gli omoinnesti non presentano un'integrazione ottimale con la sede ricevente, i materiali sintetici presentano un maggior rischio di infezioni ed ovviamente di reazioni da corpo estraneo. Per queste ragioni l'ingegneria tissutale ha preso in considerazione lo sviluppo di tecniche che potessero permettere la ricostruzione di tessuto tendineo autologo in vitro (11-15). Tale costrutto potrebbe ovviamente avere un'applicazione clinica futura nei casi di perdita di sostanza tendinea (16). Negli ultimi

anni, ottimi risultati sono stati ottenuti nel campo dell'ingegneria tissutale della cute e della cartilagine, ma nel campo della ricostruzione di tessuto tendineo i risultati si sono fermati a livello sperimentale (17-20). I principali ostacoli sono stati rappresentati dall'incapacità di mantenere in vitro il fenotipo tenocitario delle cellule poste in coltura. Studi riguardanti la guarigione delle ferite hanno messo in luce gli eventi biologici ed i segnali che si verificano nelle cellule del tessuto tendineo e nella morfogenesi dello stesso. La comprensione di tali segnali biologici è di fondamentale importanza per lo sviluppo e la progettazione di un microambiente ideale per la rigenerazione del tendine in vitro. Ingber et al hanno osservato come la funzione e la crescita cellulare sono influenzate da stimoli meccanici che creano una distorsione fisica degli aggregati cellulari, attraverso variazioni del citoscheletro (21). Nelle cellule poste in coltura in vitro alla variazione della forma cellulare corrispondeva sempre una variazione nella crescita, nell'apoptosi e nella differenziazione delle linee cellulari. Partendo da queste osservazioni, e considerando la forza meccanica cui il tendine normalmente è soggetto, abbiamo sviluppato un dispositivo in grado di riprodurre in vitro gli stimoli meccanici. L'impiego di questo bioreattore ha permesso di sottoporre i costrutti tendinei (tenociti seminati su biomateriali a base di acido ialuronico) a cicli di stress meccanico e quindi di promuovere la formazione di strutture complesse, nelle quali anche le principali componenti dell'ECM tendinea erano espresse. I risultati hanno confermato l'adesione dei tenociti alle fibre del biomateriale (Fig. 3C) ma anche una loro corretta disposizione architettonica (Fig. 3A). Le forze meccaniche impiegate sono state in grado di promuovere la proliferazione cellulare e la sintesi dei componenti dell'ECM. Siamo quindi riusciti a mantenere il fenotipo tenocitario nelle cellule poste in coltura in condizioni di trazione, confermando in parte gli studi di Ingber et al che affermavano che la deformazione cellulare è responsabile di segnali biologici in grado di stimolare la differenziazione, inibire l'apoptosi e mantenere il differenziamento cellulare (21). Queste osservazioni, seppur preliminari, aprono inoltre la possibilità di un razionale biologico alla base dei protocolli di

fisioterapia precoce che normalmente vengono applicati dopo una lesione tendinea (22-27). La fisioterapia, producendo un graduale e progressivo stimolo meccanico a livello del tendine leso, favorirebbe la proliferazione dei tenociti e la deposizione di fibre collagene di tipo I.

## BIBLIOGRAFIA

- Altman G, Horan R, Martin I, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002; 16: 270-72.
- Wang JH, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J Biomech* 2004; 37(4): 573-76.
- Barkhausen T, van Griensven M, Zeichen J, Bosch U. Modulation of cell functions of human tendon fibroblasts by different repetitive cyclic mechanical stress patterns. *Exp Toxicol Pathol* 2003(2-3): 153-158.
- Brown RA, Prajapati R, Mc Grouther DA, et al. Tensional Homeostasis in Dermal Fibroblasts: Mechanical Responses to Mechanical loading in three-Dimensional Substrates. *J Cell Phys* 1998; 175: 323-32.
- Cooper JA, Bailey LO, Carter JN, et al. Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament Achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament." *Biomaterials* 2006; 27: 2747-54.
- Cooper JA, Lu HH, Ko FK, et al. Fiberbased tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials* 2004;26: 1523-32.
- Doroski DM, Brink KS, Johnna S. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament. *Biomaterials* 2007; 28: 187-202.
- Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, et al. Application of tissue engineering techniques for rotator cuff regeneration using a chitosan-based hyaluronan hybrid fiber scaffold. *Am J Sports Med* 2005; 33: 1193-201.
- Ge Z, Gohm J, Lee E. Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant* 2005; 14: 573-83.
- Liu Y, Ramanath HS, Wang DA. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *Trends Biotech* 2008; 26: 201-9.
- Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1999; 1: 19-46.
- Lu HH, Cooper JA, Manuel S, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials* 2005; 26: 4805-16.
- Majima T, Funakoshi T, Iwasaki N, et al. Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering. *J Orthop Sci* 2005; 10: 302-7.
- Martinek V, Latterman C, Usas A, et al. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg* 2002; 84A: 1123-31.
- Musahl V, Abramowitch S, Gilbert T, et al. The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament - a functional tissue engineering study in rabbits. *J Orthop Res* 2004; 22: 214-220.
- Rodeo SA, Maher SA, Hidaka C. What's new in orthopaedic research. *J Bone Joint Surg* 2004; 86A: 2085-95.
- Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R et al. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 2006; 39: 1-20.
- Sato M, Maeda M, Kurosawa H, et al. Reconstruction of rabbit Achilles tendon with three bioabsorbable materials: histological and biomechanical studies. *J Orthop Sci* 2000; 3(5): 256-67.
- Schulze-Tanzil G, Mobasher A, Clegg PD, et al. Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 2004; 122(3): 219-28.
- Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL. Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 131-56.
- Ingber DE. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int J Dev Biol* 2006; 50: 255-66.
- Harris AK, Stopak D, Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981; 290 (5803): 249-51.
- Henshaw D, Attia E, Bhargava E, et al. Fibroblast integrin expression and cell alignment in response to cyclic tensile strain in three-dimensional collagen gels. *J Orthop Res* 2006; 24: 481-90.
- Kisiday JD, Jin M, DiMicco MA, et al. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J Biomech* 2004; 5(37): 595-604.
- Kannus P, Jozsa KP, Renstrom P. The effects of training, immobilization and remobilization on tendons. *Scand J Med Sci Sports* 1997; 7: 67-71.
- Tanaka H, Manske PR, Pruitt DL, Larson BJ. Effect of cyclic tension on lacerated flexor tendons in vitro. *J Hand Surg* 1995; 20A: 467-73.
- Buckwalter JA. Effects of early motion on healing of musculoskeletal tissues. *Hand Clin* 1996; 12: 13-24.