

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 873**

51 Int. Cl.:

<b>A61L 27/00</b>	(2006.01)
<b>A61F 2/30</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/38</b>	(2006.01)
<b>A61F 2/02</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/18</b>	(2006.01)
<b>A61F 2/08</b>	(2006.01)
<b>A61L 27/36</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2008 PCT/AU2008/000583**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08128304**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2008 E 08733409 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2150281**

54 Título: **Bioestructuras que contienen tenocitos y tratamiento utilizando las mismas**

30 Prioridad:

**24.04.2007 AU 2007902168 P**  
**26.03.2008 AU 2008901451 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2018**

73 Titular/es:

**ORTHOCELL LIMITED (100.0%)**  
**Building 191, Murdoch University, South Street**  
**Murdoch WA 6150 , AU**

72 Inventor/es:

**ZHENG, MING-HAO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 671 873 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Bioestructuras que contienen tenocitos y tratamiento utilizando las mismas

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para preparar bioestructuras útiles en la reparación de desgarros. Más específicamente, la presente invención se refiere a la reparación de desgarros del manguito de los rotadores usando bioestructuras sembradas con tenocitos.

10

## Introducción

El desgarrar del tendón del manguito de los rotadores es una presentación común que resulta de las lesiones sufridas por actividades aéreas (Briner et al., (1997) Sports Med. 24 (1): 65-71). Numerosos estudios han descrito diferentes técnicas para la reparación de tendones. Estas incluyen técnicas de sutura (Gerber et al., (1999) J. Bone Joint Surg. Am. 81 (9): 1281-90), fijación del tendón al hueso (Burkhart et al., (2000) Arthroscopy. 16 (7): 82-90), técnicas de deslizamiento y movilización de tendones para desgarros retraídos (Tauro et al., (1999) Arthroscopy. 15 (5): 527-30) y uso de diversos injertos de tendones de tejidos o sintéticos (Amstutz et al. (1976), J. Biomed. Mater. Res. 10 (1): 47 - 59).

15

20

Aunque la reparación quirúrgica normalmente alcanza altos niveles de mejora funcional y satisfacción del paciente en la etapa postoperatoria temprana, existe una morbilidad significativa asociada con desgarros grandes y crónicos (Hatrup, (1995) J. Shoulder Elbow Surg. 4 (2): 95-100). Además, la tasa de éxito de la cirugía de revisión para la reparación fallida del manguito de los rotadores es muy baja (Bigliani et al. (1992) J. Bone Joint Surg. Am. 74 (10): 1505-15). Consecuentemente, existe una necesidad en la técnica de desarrollar mejores métodos para tratar la rotura del manguito de los rotadores.

25

30

En un intento de mejorar los resultados quirúrgicos se han propuesto en el tratamiento de el desgarrar del manguito de los rotadores implantes sintéticos y de bioestructuras (véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 4.668.233, 4.775.380, 5.352.463, 4.902.508 y el documento EP 0 223 370). Estos dispositivos están destinados a fomentar la invasión de tejido en el implante, con la esperanza de que el crecimiento interno del tejido, junto con el dispositivo, confiera una mejor cicatrización de la herida y una mejoría funcional del paciente. Sin embargo, los dispositivos para el tratamiento del desgarrar del manguito de los rotadores generalmente no han demostrado resultados exitosos a largo plazo, con fallas que ocurren comúnmente debido a la invasión de tejido graso no funcional, tenosinovitis, aflojamiento o falla del implante. Además, la carga continua del dispositivo y la abrasión contra los tejidos de la articulación causa desgaste, desplazamiento y fatiga del dispositivo y finalmente falla del dispositivo.

35

40

Como tal, no se ha demostrado que el aumento de la reparación quirúrgica con dispositivos tales como bioestructuras en desgarros del manguito de los rotadores mejore el resultado clínico de los pacientes (Iannotti, (1994) J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2 (2): 87-95). Como tal, los métodos actuales están por debajo de resultados óptimos y existe la necesidad de desarrollar mejores tratamientos para la reparación del desgarrar del manguito de los rotadores.

## 45 Sumario

45

Los inventores han desarrollado ahora un nuevo enfoque de ingeniería de tejidos basado en células para proporcionar una bioestructura sembrada con tenocitos para su uso en el tratamiento del desgarrar del manguito de los rotadores que comprende la implantación de la bioestructura que se ha sembrado con tenocitos que se han expandido *in vitro*. Por lo tanto, la presente invención proporciona una bioestructura sembrada con tenocitos para uso en un método para tratar el desgarrar del manguito de los rotadores en un sujeto mamífero que lo necesita, que comprende las etapas de: (i) expandir selectivamente el medio de cultivo de tenocitos en un medio de cultivo *in vitro* que comprende insulina y un glucocorticoide para producir un cultivo expandido de tenocitos; (ii) sembrar una bioestructura con dichos tenocitos expandidos para producir una bioestructura sembrada con tenocitos; y (iii) implantar dicha bioestructura sembrada con tenocitos en forma proximal a un desgarrar del manguito de los rotadores.

50

55

En algunas realizaciones, la bioestructura sembrada con tenocitos se cultiva *in vitro* durante tiempo suficiente para establecer los tenocitos antes de la implantación.

60

En algunas realizaciones, el desgarrar del manguito de los rotadores es un desgarrar masivo del manguito de los rotadores.

65

Se apreciará que los tenocitos usados en los métodos y dispositivos de la invención como se describe en este documento pueden aislarse de cualquier tejido que contenga tenocitos. En algunas realizaciones, el tejido es un tendón. El tendón puede ser de cualquier sitio anatómico de un animal y puede ser un tendón del manguito de los rotadores, tendón supraespinoso, tendón subescapular, tendón pectoral mayor, tendón peroneo, tendón de Aquiles,

tendón tibial anterior, ligamento cruzado anterior, ligamento cruzado posterior, tendón isquiotibial, ligamento lateral, ligamento medial, tendón de la rótula, tendón del bíceps y tendón del tríceps.

5 En algunas realizaciones, el tejido que contiene tenocitos se puede aislar de cualquier animal mamífero que incluye, pero no se limita a, una oveja, una vaca, un cerdo o un ser humano. En otras realizaciones, el tejido que contiene tenocitos se aísla de un ser humano. En aún otras realizaciones, el tejido que contiene tenocitos se aísla del sujeto que necesita tratamiento.

10 Los tenocitos aislados se expanden selectivamente mediante cultivo *in vitro* en presencia de un medio de cultivo que comprende insulina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,00005% a 0,1% p/v de insulina. En otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0001% a 0,001% p/v de insulina. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0006% p/v de insulina. El medio de cultivo puede comprender además un glucocorticoide, tal como un glucocorticoide sintético. En algunas realizaciones, el glucocorticoide es betametasona. El medio de cultivo puede comprender aproximadamente 15 0,00001% a 0,1% p/v de glucocorticoide. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0001% a 0,001% p/v de glucocorticoide. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0002% p/v de glucocorticoide.

20 En algunas realizaciones, el cultivo expandido de tenocitos comprende al menos 80% de tenocitos y no más de 20% de células que no son tenocitos. En otras realizaciones, al menos el 90% de las células en el cultivo son tenocitos. En aún otras realizaciones, al menos el 95% de las células presentes en el cultivo selectivamente expandido de tenocitos son tenocitos.

25 En algunas realizaciones, el cultivo expandido de tenocitos comprende células, en donde al menos el 80% de dichas células expresa uno o más genes que codifican lo siguiente: colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, EphA4, escleraxis, Six1, COMP y/o Cbfa1. La presente invención proporciona una bioestructura sembrada con tenocitos para uso en un método para tratar el desgarro masivo del manguito de los rotadores en un sujeto humano que lo necesita, que comprende las etapas de: (i) aislar los tenocitos del tejido del tendón tomado de dicho sujeto; (ii) expandir selectivamente dichos tenocitos *in vitro* en un medio de cultivo que comprende 0,0006% p/v de insulina y 30 0,0002% p/v de glucocorticoide para producir un cultivo expandido de tenocitos que comprende al menos 80% de tenocitos; (iii) sembrar una bioestructura con dichos tenocitos expandidos y cultivar dicha bioestructura y tenocitos durante no más de cinco días para producir una bioestructura sembrada con tenocitos; y (iv) implantar dicha bioestructura sembrada con tenocitos en el desgarro del manguito de los rotadores.

35 La bioestructura puede comprender células, en donde al menos 80% de dichas células expresan uno o más genes que codifican lo siguiente: colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, EphA4, escleraxis, Six1, COMP y/o Cbfa1.

40 La bioestructura puede comprender una matriz, una membrana, una microperla, un vellón, un hilo o un gel, y/o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la bioestructura comprende una matriz de colágeno de tipo I/III (ACI-Maix<sup>TM</sup>) o submucosa de intestino delgado (Vitrogen<sup>TM</sup>).

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1: Diseño experimental de estudio en animales.

Figura 2: Modelo de desgarro masivo del manguito de los rotadores en el conejo.

Figura 3: Expresión de colágeno de tipo I/III y EphA4 en tenocitos cultivados y tejido de tendón.

50 Figura 4: Inmunotinción para colágeno de tipo I en tenocitos en cultivo *in vitro*. (A) Pozo de prueba (100X); (B) pozo de control (100X).

Figura 5: (A) La disposición de fibra de colágeno porosa y suelta de la bioestructura ACI-Maix<sup>TM</sup> (100X). (B) Una lámina de tenocitos integrada dentro de las fibras de colágeno ACI-Maix<sup>TM</sup> después de 72 horas (200X). (C) La morfología de células solitarias mostró dos tipos de protuberancias (ampollas: flecha negra y lamelipodios: flecha blanca) en la bioestructura ACI-Maix<sup>TM</sup> (1500X). (D) La microscopía electrónica de barrido de sección transversal 55 reveló la morfología de la superficie plana y la estructura de colágeno altamente compacta de la bioestructura submucosa del intestino delgado Restore<sup>TM</sup> (400X). (E) Los tenocitos (flechas) mostraron un patrón de crecimiento de monocapa en la bioestructura Restore<sup>TM</sup> similar a la observada *in vitro*, con un aspecto en forma de husillo y una unión de células lamelipodios bipolares o tripolares (200X). (F) Una célula individual en la bioestructura Restore<sup>TM</sup> con protuberancias (ampollas: flecha negra y lamelipodios: flecha blanca) que se observa en la superficie de la célula (650X).

65 Figura 6: grupo de control; hematoxilina y eosina. (A) Las muestras de control de cuatro semanas se caracterizaron por un aumento en la celularidad y neoangiogénesis y alteración en la organización de las fibras de colágeno (250X). (B) El canal óseo (BT) de muestras de 4 semanas se caracterizó por una mayor población de células y la ausencia

de zona mineralizada (100X). (C) Las muestras de ocho semanas mostraron una estructura más organizada con menos densidad celular y disposición de fibra de colágeno paralela uniformemente dispuesta (100X). (D) El canal óseo de muestras de 8 semanas demostró una estructura típica de 4 zonas maduras (100X). MT: Sustancia media del tendón regenerado.

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30

Figura 7: grupo de bioestructura ACI-Maix™; hematoxilina y eosina. (A) Grandes porciones de la bioestructura ACI-Maix™ no se absorbieron a las 4 semanas, con una infiltración de linfocitos evidente que rodeaba la bioestructura (25X). (B) El área absorbida de muestras de 4 semanas demostró un patrón de reparación primaria caracterizado por una disposición de colágeno desigual, una celularidad creciente y formación neoangiogénica (100X). (C) El canal óseo de muestras de 4 semanas estuvo dominado por tejido de cartílago reparado, con tejido fibroso denso que se extiende desde el borde del canal óseo (100X). (D) muestras de ocho semanas muestran una estructura más organizada (100X). (E) La formación del canal óseo también fue madura. (F) Inducciones de tejido adiposo (flechas) en la sustancia media del tendón regenerado (100X) U: bioestructura no absorbida; L: invasión de linfocitos; A: área absorbida V: tejido vascularizado.

Figura 8: grupo de bioestructura Restore™; hematoxilina y eosina. (A) La estructura original de la bioestructura Restore™ SIS se veía como fibras desorganizadas. Se observaron numerosas células inflamatorias dentro y alrededor del implante (25X). (B) El área absorbida demostró un aumento en el número de fibroblastos con morfología tanto redonda como ahusada presente en una matriz de tejido conectivo rico en vascularización (100X). (C) Una muestra de 8 semanas no se absorbió completamente y presentó una infiltración de linfocitos obvia (100X). (D) La unión del tendón óseo exhibió una estructura madura de 4 zonas (100X). A: área absorbida; U: bioestructura no absorbida; L: linfocitos; V: tejido vascularizado.

Figura 9: Bioestructura ACI-Maix™ sembrada con un grupo de tenocitos autólogos; hematoxilina y eosina (A) A las 4 semanas, la bioestructura ACI-Maix™ implantada con tenocitos no se absorbió por completo y provocó la infiltración de células linfocíticas (100X). (B) Se detectaron también pocos tenocitos autólogos implantados (flechas) dentro de la bioestructura restante (200X). (C) A las 8 semanas, la bioestructura ACI-Maix™ implantada con tenocitos mostró un resultado idéntico al del grupo de control (100X). (D) La histología del canal óseo (BT) era indistinguible del grupo de control (100X). A: área absorbida; U: bioestructura no absorbida; L: linfocitos; MT: sustancia media del tendón regenerado.

Figura 10: Grupo de bioestructura Restore™ + tenocitos autólogos; hematoxilina y eosina. (A) A las 8 semanas, la bioestructura Restore™ implantada con tenocitos autólogos demostró una excelente estructura del tendón similar al grupo de control (100X). (B) La unión del hueso del tendón también fue madura, mostrando una estructura típica de 4 zonas (100X). (C) Se observó un poco de tejido de granulación mezclado con las fibras de colágeno, que se asemeja a la respuesta al granuloma crónico (100X). (D) Se encontraron pequeños focos de hueso ectópico en todos los grupos a los que se les implantó bioestructura Restore™ (100X).

Figura 11: Tasa de inflamación: el porcentaje de áreas de reparación de tendones ocupadas por células inflamatorias.

Figura 12: Puntajes de histología para bioestructuras ACI-Maix™ y Restore™ implantadas solas o sembradas con tenocitos autólogos a las 4 semanas y 8 semanas.

Figura 13: Inmuntinción de ACI-Maix™ + tenocitos para colágeno de tipo I (A) Prueba (flecha azul: área del citoplasma, flecha negra: matriz extracelular) (400X). (B) Control negativo (400X).

Figura 14: Células positivas para colágeno de tipo I en ACI-Maix™ y bioestructuras Restore™ implantadas solas o sembradas con tenocitos autólogos a las 4 semanas y 8 semanas.

Figura 15: Condiciones de trabajo y secuencias de cebadores de proteína de colágeno de tipo I/III de conejo, EphA4 y gen GAPDH.

Figura 16: Medición geométrica: Se midieron el espesor, el ancho y la longitud normales a partir de cincuenta tendones de manguito de los rotadores de conejo normales recogidos del hombro no operado. Todas las mediciones se realizaron en condiciones relajadas a temperatura ambiente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo celular, biología celular y cirugía ortopédica, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Coligan et al., 1999 "Current protocols in Protein Science" Volumen I y II (John Wiley & Sons Inc.); Ross et al., 1995 "Histology: Text and Atlas", 3ª edición, (Williams y Wilkins); Kruse y Patterson (eds.) 1977 "Tissue Culture" (Academic Press); Canale (ed.) 2003 "Campbell's Operative Orthopedics" 10ª edición (St. Louis, Mo.: MD Consult LLC); y Alberts et al., 2000 "Molecular Biology of the Cell" (Garland Science).

Se debe observar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen una referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 De este modo, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células, y una referencia a "un agente" es una referencia a uno o más agentes, y así sucesivamente. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

10 Aunque cualquiera de los materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se puede usar para practicar o probar la presente invención, a continuación, se describen los materiales y métodos preferidos.

15 En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una bioestructura sembrada con tenocitos para su uso en un método para tratar el desgarro del manguito de los rotadores. Los términos "tratar" o "tratamiento" o sus equivalentes gramaticales se usan en la presente memoria para cubrir el tratamiento de un desgarro del manguito de los rotadores en un mamífero, preferiblemente un ser humano, e incluye: (a) aliviar o mejorar los síntomas de un desgarro del manguito de los rotadores, es decir, provocar la regresión de los síntomas de un desgarro del manguito de los rotadores; o (b) prevenir o inhibir que vuelva a ocurrir el desgarro del manguito de los rotadores en un sujeto que puede estar predispuesto al desgarro del manguito de los rotadores, pero que aún no se ha diagnosticado que lo tenga, por ejemplo, una persona que ha sido tratada previamente por desgarro del manguito de los rotadores. El efecto del tratamiento puede ser terapéutico en términos de una curación parcial o completa del desgarro del manguito de los rotadores o profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente la repetición del desgarro del manguito de los rotadores.

25 El manguito de los rotadores se refiere al grupo de músculos y sus tendones que actúan para estabilizar el hombro. Los músculos del manguito de los rotadores son un grupo de cuatro músculos que rodean el hombro (supraespinoso, infraespinoso, redondo menor y subescapular). Los cuatro tendones del músculo del manguito de los rotadores se combinan para formar un tendón amplio y unido, llamado tendón del manguito de los rotadores, y se inserta en el hueso de la cabeza del húmero en el hombro.

35 El término "desgarro o desgarros del manguito de los rotadores" se refiere a un desgarro de uno o más de los cuatro tendones de los músculos del manguito de los rotadores o el tendón unido del manguito de los rotadores. Los desgarros del tendón del manguito de los rotadores pueden ser desgarros de espesor parcial, desgarros de espesor total o desgarros de espesor total con desprendimiento completo de los tendones del hueso. Los desgarros de espesor parcial se refieren al deshilachado de un tendón intacto. Los desgarros de espesor completo se refieren a las lesiones que persisten a través de todo el tendón. Estos pueden variar en tamaño desde muy pequeños o desde localizados con toda precisión hasta grandes que involucran a la mayoría del tendón. Los desgarros de espesor completo también pueden implicar el desprendimiento completo del tendón o de los tendones de la cabeza del húmero.

40 En algunas realizaciones, el desgarro del manguito de los rotadores es un desgarro masivo del manguito de los rotadores.

45 El término "desgarro masivo del manguito de los rotadores" se refiere a desgarros de más de aproximadamente 5 cm e implica más de un tendón.

50 Se apreciará que la mayoría de los animales mamíferos tienen tendones y que todos estos tendones contienen fibras de colágeno incrustadas en una matriz rica en glicoproteínas. Por lo tanto, en la presente memoria descriptiva, el término "sujeto mamífero" se refiere a cualquier mamífero, tal como un ser humano o mamíferos de importancia económica y/o importancia social para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros distintos de los humanos (tales como gatos y perros). También se prevé la reparación de la lesión del manguito de los rotadores en el ganado, incluidos, entre otros, cerdos domésticos (cerdos y puercos), rumiantes, caballos y similares. El término no denota una edad en particular. Por consiguiente, tanto adultos como recién nacidos están destinados a ser cubiertos.

55 En algunas realizaciones, una primera etapa implica el aislamiento de una población de tenocitos de una fuente. El término "tenocito" tal como se usa en el presente documento se refiere a las células de tipo fibroblasto en forma alargada que se encuentran en los tendones de todos los mamíferos. Los tenocitos típicamente tienen núcleos alargados y citoplasma delgado y a menudo se encuentran asentados sobre fibras de colágeno en los tendones. Los tenocitos a menudo se pueden identificar ya que producen colágeno de tipo I y expresan el marcador "escleraxis". Por consiguiente, en algunos aspectos, las células de tenocitos de la invención son células que expresan escleraxis o células capaces de expresar colágeno de tipo I o escleraxis.

65 El término "fuente", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tejido que contiene tenocitos en cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el tejido que contiene tenocitos es un tendón. Un tendón es el tejido que conecta el músculo al hueso en un mamífero. El tendón puede ser de cualquier sitio anatómico de un mamífero

y puede ser un tendón del manguito de los rotadores, tendón supraespinoso, tendón subescapular, tendón pectoral mayor, tendón peroneo, tendón de Aquiles, tendón tibial anterior, ligamento cruzado anterior, ligamento cruzado posterior, tendón isquiotibial, ligamento lateral, ligamento medial, tendón de la rótula, tendón del bíceps y tendón del tríceps.

5 Las células de tenocitos se pueden aislar de una fuente en una variedad de formas, todas las cuales son conocidas por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, las células de tenocitos se pueden aislar a partir de un material de biopsia por métodos convencionales. Como se describe con más detalle a continuación, en algunas realizaciones, los tenocitos se aíslan por digestión enzimática.

10 En algunas realizaciones, el tejido que contiene tenocitos se puede aislar de cualquier animal mamífero que incluye, pero no se limita a, una oveja, una vaca, un cerdo o un ser humano. En otras realizaciones, el tejido que contiene tenocitos se aísla de un ser humano.

15 En algunas realizaciones, el tejido que contiene tenocitos es "autólogo", es decir, se aísla del cuerpo del sujeto que necesita tratamiento para desgarro del manguito de los rotadores. Por ejemplo, un sujeto mamífero con un desgarro del manguito de los rotadores puede recibir una biopsia de cualquier tendón de su cuerpo. Dichos tendones incluyen, pero no se limitan a, el tendón del flexor radial del carpo y el tendón del calcáneo.

20 Se pueden obtener células de tenocitos a partir de material de biopsia mediante tratamiento apropiado del tejido que ha de servir como fuente de las células de tenocitos. Las técnicas para el tratamiento de tejido para obtener células de tenocitos son conocidas por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Freshney "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique", segunda edición (A. R. Liss Inc.). Por ejemplo, el tejido u órgano puede romperse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivas o agentes quelantes para debilitar las interacciones entre  
25 células haciendo posible obtener una suspensión de células individuales. Típicamente, el método incluirá una combinación de disrupción mecánica, tratamiento enzimático y agentes quelantes. En una técnica, el tejido se tritura y se trata simultáneamente o posteriormente con cualquiera de varias enzimas digestivas, ya sea solas o en combinación. Los ejemplos de enzimas útiles en células disociadoras incluyen, pero sin limitación, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, DNasa, pronasa, dispasa y similares. En algunas realizaciones, las composiciones enzimáticas que contienen una mezcla acuosa de colagenasa que tiene una actividad de  
30 aproximadamente 43 nkat/mL a aproximadamente 51 nkat/mL, y quimopapaína que tiene una actividad de aproximadamente 0,22 nkat/mL a aproximadamente 0,44 nkat/mL se usan para disociar células, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.422.261. La ruptura mecánica también se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de mezcladores, tamices, homogeneizadores, células a presión y similares.

35 La suspensión resultante de células y grupos de células se puede dividir además en poblaciones de tipos de células sustancialmente homogéneas. Esto se puede lograr utilizando técnicas estándar para la separación de células que incluyen, por ejemplo, métodos de selección positiva (por ejemplo, expansión clonal y selección de tipos celulares específicos), selección negativa (por ejemplo, lisis de células no deseadas), separación basada en gravedad  
40 específica en una solución de densidad, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y similares. Se conocen en la técnica otros métodos de selección y separación, por ejemplo, Freshney "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique", 2ª edición (A. R. Liss Inc.).

45 En algunas realizaciones, los tejidos del tendón, que se han aislado mediante biopsia, se lavan, diseccionan y digieren para formar explantes que se pueden cultivar en cultivo celular para producir tenocitos libres.

50 En algunas realizaciones, el tejido de biopsia se somete a digestión enzimática y/o se somete a agentes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que se une o quelata  $\text{Ca}^{2+}$  de la que depende la adhesión célula-célula. Los ejemplos de enzimas adecuadas para uso incluyen una o más de colagenasa, tripsina y proteasas.

55 En algunas realizaciones, se incuba tejido de tendón picado de no más de 1 mm en presencia de aproximadamente 2,5% p/v de tripsina y aproximadamente 5,5% p/v de colagenasa en medio de cultivo de tejido estándar sin rojo de fenol durante al menos 3 horas a aproximadamente 37°C en aproximadamente 5% de  $\text{CO}_2$ .

60 En algunas realizaciones, después de la digestión enzimática, los tenocitos se recuperan del material de biopsia mediante centrifugación de la solución de biopsia, y lavando el sedimento resultante con medio de cultivo celular. Alternativamente, los tenocitos pueden recuperarse de la solución de biopsia por filtración a través de, por ejemplo, una malla tal como una malla de nailon estéril de 150 micrómetros. Otro enfoque se basa en la tendencia de algunos tipos de células a adherirse fuertemente al plástico o al vidrio, lo que les permite separarse de los componentes de un tendón que no se adhieren con tanta fuerza. Alternativamente, las células pueden separarse de otros componentes del tendón usando anticuerpos que se unen específicamente a la célula, por ejemplo, usando anticuerpos conjugados a una matriz o acoplados a un colorante fluorescente que luego puede separarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En algunas realizaciones, los tenocitos se aíslan por filtración  
65 de la solución de biopsia a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar restos de la matriz y el filtrado se centrifuga para formar un sedimento celular. El sedimento se lava luego en medio de cultivo celular.

Los tenocitos aislados se expanden selectivamente *in vitro*. El término "expandido selectivamente" como se usa en la presente memoria se refiere al cultivo de los tenocitos aislados de tal manera que crecen y aumenta el número de células de tenocitos en detrimento de otros tipos de células.

5 En algunas realizaciones, los tenocitos aislados se expanden *in vitro* en un medio de cultivo que comprende insulina o un derivado funcional. La insulina es una hormona que, en su forma natural, es producida por el páncreas. Sin embargo, la insulina utilizada en el medio de cultivo para la expansión selectiva de los tenocitos puede ser sintética, tal como la insulina recombinante, o de origen natural.

10 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,00005% a 0,1% p/v de insulina. En otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0001% a 0,001% p/v de insulina. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0006% p/v de insulina.

15 El medio de cultivo puede comprender además un glucocorticoide, tal como un glucocorticoide sintético. Los glucocorticoides son una clase de hormonas esteroideas caracterizadas por la capacidad de unirse al receptor de cortisol y desencadenar efectos similares, tal como afectar el metabolismo o los efectos antiinflamatorios o inmunosupresores. Los glucocorticoides pueden ser de origen natural (hormonas) o sintéticos (medicamentos).

20 Ejemplos de glucocorticoides sintéticos adecuados para usar en un medio de cultivo para la expansión selectiva de tenocitos incluyen hidrocortisona, acetato de cortisona, predisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisonas, acetato de desoxicorticosterona (DOCA) y aldosterona.

25 En algunas realizaciones, el glucocorticoide es beta-metasona. La betametasona es un glucocorticoide sintético que tiene la fórmula  $C_{22}H_{29}FO_5$ .

30 El medio de cultivo puede comprender aproximadamente 0,00001% a 0,1% p/v de glucocorticoide. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0001% a 0,001% p/v de glucocorticoide. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,0002% p/v de glucocorticoide. En algunas realizaciones, los tenocitos aislados se cultivan durante aproximadamente 3 días a aproximadamente cinco semanas, a aproximadamente 37°C en una atmósfera de aproximadamente 5% de CO<sub>2</sub>. El período de tiempo para el cultivo celular puede, desde luego, variar.

35 El cultivo resultante de "tenocitos expandidos" se puede denominar un cultivo sustancialmente puro de tenocitos. El término "sustancialmente puro" como se usa en el presente documento significa que las células predominantes en el cultivo son tenocitos y otras células contaminantes tales como fibroblastos, condrocitos y similares están en una cantidad menor. En algunas realizaciones, los tenocitos expandidos son al menos 80% de tenocitos y no más de 20% de células que no son tenocitos. En otras realizaciones, al menos el 90% de las células son tenocitos. En aún otras realizaciones, al menos el 95% de las células presentes en el cultivo expandido de tenocitos son tenocitos.

40 En algunas realizaciones, el cultivo expandido de tenocitos comprende células, en las que al menos el 80% de dichas células expresan uno o más genes que codifican lo siguiente: colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, EphA4, escleraxis, Six1, COMP y/o Cbfal.

45 Los tenocitos expandidos selectivamente se pueden sembrar en una bioestructura. El término "bioestructura" se refiere a cualquier matriz o estructura que sea adecuado para la adherencia de tenocitos o células con o sin un adhesivo. A modo de ejemplo y no de limitación, la bioestructura puede estar en forma de una membrana, microperlas, vellón, hilo o gel, y/o mezclas de los mismos. La bioestructura puede ser elaborada de cualquier material que tenga los atributos físicos o mecánicos necesarios para la implantación, tal como actuar como una barrera hemostática. Una barrera hemostática inhibe la penetración de células y tejidos adjuntos en el área del defecto tratado.

50 En algunas realizaciones, la bioestructura está elaborada de un material semipermeable que puede incluir colágeno entrecruzado o no entrecruzado, preferiblemente tipo I en combinación con el tipo III o tipo II. La bioestructura también puede incluir polipéptidos o proteínas obtenidas de fuentes naturales o mediante síntesis, como ácido hialurónico, submucosa del intestino delgado (SIS), peritoneo, pericardio, ácidos polilácticos y ácidos relacionados, sangre (es decir, que es un tejido circulante que incluye una porción fluida (plasma) con elementos formados suspendidos (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas) u otro material que sea biorreabsorbible. Los polímeros bioabsorbibles, tales como elastina, fibrina, laminina y fibronectina también son útiles en la presente invención. Los materiales de la matriz de soporte o estructurales como se describe en la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 20020173806, también son útiles en la presente invención.

60 La bioestructura está preferiblemente inicialmente (es decir, antes del contacto con las células que se van a trasplantar) libre de células intactas y es reabsorbible dentro del sujeto mamífero. La bioestructura también puede tener una o varias superficies, tales como una superficie porosa, una superficie densa o una combinación de ambas. La bioestructura también puede incluir superficies semipermeables, impermeables o completamente permeables.

Las matrices de soporte que tienen una superficie porosa se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 6.569.172, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

5 La bioestructura puede ser autóloga o alogénica. En algunas realizaciones, se forma una matriz de soporte autólogo adecuada a partir de sangre, como se ejemplifica en la patente estadounidense No. 6.368.298, expedida a Berretta, et al., el 9 de abril de 2002. Un bioestructura adecuada puede ser una estructura sólida, semisólida, de gel o  
10 parecida a un gel, caracterizada por ser capaz de mantener una forma estable durante un período de tiempo para permitir la adherencia y/o crecimiento de las células sobre la mismo, tanto antes del trasplante como después trasplante, y para proporcionar un sistema similar al entorno natural de las células para optimizar el crecimiento  
15 celular. Ejemplos de matrices de soporte adecuadas se divulgan en la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 20020173806. Ejemplos adicionales de bioestructura adecuados para el crecimiento de tenocitos incluyen Vitrogen<sup>TM</sup>, una solución que contiene colágeno que gelifica para formar una matriz poblada de células, y las estructuras de tejido conectivo de Hwang (solicitud de patente estadounidense No. 20040267362), Kladaki et al., (solicitud de patente estadounidense No. 20050177249), Giannetti (solicitud de patente estadounidense No. 20040037812) y Binette et al., (solicitud de patente estadounidense No. 20040078077).

20 La bioestructura se puede cortar o conformar en cualquier forma regular o irregular. En algunas realizaciones, la bioestructura se puede cortar para que corresponda con la forma del desgarro. La bioestructura también puede ser de forma plana, redonda y/o cilíndrica. La forma de la bioestructura también se puede moldear para adaptarse a la forma de un desgarro en particular. Si la bioestructura es un material fibroso, o tiene las características de una fibra, la matriz de soporte se puede tejer en una forma deseada. Alternativamente, la bioestructura puede ser un gel, similar a un gel o un material no tejido.

25 En algunas realizaciones, la bioestructura está compuesta por colágeno de tipo I/III derivado de porcino, por ejemplo, ACI-Maix<sup>TM</sup>. En otras realizaciones, la bioestructura está compuesta de submucosa del intestino delgado, por ejemplo, Restore<sup>TM</sup>.

30 El término "sembrado" se refiere a poner las células de tenocitos en contacto con una bioestructura durante un tiempo suficiente antes del trasplante de tal manera que se adhieran (con o sin un adhesivo) a la bioestructura. En algunas realizaciones, las células se cultivan con la bioestructura durante la noche o durante más de una semana. En algunas realizaciones, los tenocitos expandidos selectivamente se cultivan *in vitro* con la bioestructura durante aproximadamente cinco días antes del uso.

35 En algunas realizaciones, es preferible una siembra uniforme. Se cree que el número de células de tenocitos sembradas no limita el tejido final producido; sin embargo, la siembra óptima puede aumentar la tasa de generación. Las cantidades óptimas de siembra dependerán de las condiciones específicas de cultivo. En algunas realizaciones, la bioestructura se siembra con aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 veces la densidad celular fisiológica de un tipo de tejido nativo, es decir, en tendón. En otra realización, la densidad celular puede ser menor de  
40 aproximadamente  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células, o más, por  $\text{cm}^2$ , típicamente aproximadamente  $4 \times 10^6$  células por  $\text{cm}^2$ . En algunas realizaciones, la bioestructura se siembra con aproximadamente  $3,5 \times 10^6$  tenocitos expandidos selectivamente por  $\text{cm}^2$ .

45 Se apreciará que el bioestructura sembrada con tenocitos selectivamente expandidos se puede envasar y vender como un dispositivo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una bioestructura sembrada con tenocitos. El empaque del dispositivo podría comprender una placa de plástico sellada con una lámina de película adhesiva estéril, como se ejemplifica en la patente estadounidense No. 5.842.573.

En algunas realizaciones, el dispositivo se implanta en un sitio proximal al desgarro del manguito de los rotadores.

50 Los términos "implantado" o "implantación" o equivalentes gramaticales de los mismos se usan en la presente memoria para cubrir cualquier acto que introduzca una bioestructura que contenga tenocitos en el manguito de los rotadores de un sujeto.

55 El término "proximal" se refiere a un sitio dentro del manguito de los rotadores de manera que el tratamiento en ese sitio provocará la regresión de los síntomas del desgarro del manguito de los rotadores.

60 En algunas realizaciones, la bioestructura sembrada con tenocitos se implanta en las células del desgarro que miran hacia abajo sobre el desgarro. En algunas realizaciones, un parche de cobertura sirve para cubrir el defecto para evitar además la infiltración de materiales no deseados, tales como fibroblastos o macrófagos, del entorno circundante. En algunas realizaciones, el parche de recubrimiento puede ser cualquiera de las matrices de soporte descritas en el presente documento, y/o puede incluir colágeno (tipo I/III), ácido hialurónico, fibrina y ácido poliláctico. Preferiblemente, el parche de recubrimiento es libre de células y reabsorbible, y puede ser semipermeable.

La bioestructura sembrada con tenocitos puede asegurarse en su sitio por cualquier medio convencional conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante sutura, anclajes de sutura, dispositivos de fijación ósea y tornillos óseos. En algunas realizaciones, la bioestructura sembrada con tenocitos se sutura en su posición.

5 La presente invención también proporciona una bioestructura que comprende células, en la que más del 80% de dichas células son tenocitos. En algunas realizaciones, al menos el 90% de las células en la bioestructura son tenocitos. En aún otras realizaciones, al menos el 95% de las células presentes en la bioestructura son tenocitos.

10 Alternativamente, la bioestructura puede comprender células, en la que al menos 80% de dichas células expresan uno o más genes que codifican para lo siguiente: colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, EphA4, escleraxis, Six1, COMP y/o Cbfa1.

15 La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de referencia solo a los siguientes ejemplos no limitantes. Sin embargo, se debe entender que los siguientes ejemplos son solo ilustrativos, y no deben tomarse de ninguna manera como una restricción sobre la generalidad de la invención descrita anteriormente. En particular, aunque la invención se describe en detalle en relación con el desgarramiento masivo del manguito de los rotadores, se entenderá claramente que los hallazgos en este documento no se limitan a un desgarramiento masivo del manguito de los rotadores, sino que también abarca las lesiones menores del tendón del manguito de los rotadores descritas anteriormente.

### 20 Ejemplo 1. Animales y Bioestructura

Se utilizaron cincuenta conejos blancos Albinos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) entre 12 y 20 semanas de edad con un peso corporal entre 3-5 kg en este estudio. Todos los conejos fueron criados de una colonia de conejos criados en las instalaciones de la casa de animales de la Universidad de Western Australia (Nedlands, Australia). Los conejos fueron alimentados a placer con gránulos para conejo/conejillo de Indias, heno, y se proporcionó agua a placer. Los conejos se mantuvieron en jaulas que median 1,5 m de ancho, 0,75 m de largo y 0,75 m de alto, con pisos de rejilla para prevenir la dermatitis en la almohadilla de las patas. Todos los procedimientos operativos y las actividades de la jaula se llevaron a cabo bajo estrictas pautas detalladas por el Consejo Nacional de Salud e Investigación Médica (NHMRC, Canberra, Australia).

30 Se suministró y fabricó la bioestructura de colágeno de tipo I/III derivada de porcino (ACI-Maix™) por Matricel (Herzogenrath, Alemania). La bioestructura de colágeno es un complejo blanco con dos lados diferentes: el lado rugoso y el lado liso. El lado rugoso aparece como fibras que se entrelazan con un tamaño de poro de alrededor de 200 µm, mientras que el lado liso muestra una disposición compacta de fibras (Willerset, et al., 2005). La propiedad mecánica en el punto de ruptura es de aproximadamente 14,6 + 2,4 N/mm<sup>2</sup> (Chen J.M. Datos no publicados del estudio anterior). Una bioestructura de submucosa de intestino delgado (Restore™) fue fabricado por Depuy (EE.UU.). La bioestructura de la submucosa de intestino delgado (SIS) es un material de 1 mm de espesor, altamente compactado con apariencia semitransparente que consiste en 10 láminas de submucosas individuales del intestino delgado laminadas juntas por secado al vacío. Ambos lados de la bioestructura son muy suaves (Zheng et al., 2005).  
 40 La estructura altamente compactada de la bioestructura SIS la dota con una resistencia a la tracción muy fuerte de alrededor de 75,6 + 6,3 N/mm<sup>2</sup> en el punto de ruptura (Chen J.M. Datos no publicados del estudio anterior).

### Ejemplo 2. Diseño experimental

45 Los cincuenta conejos se asignaron aleatoriamente en cinco grupos de diez (Figura 1). Los manguitos rotadores izquierdos fueron completamente diseccionados y reconstruidos por uno de los cinco métodos siguientes: (1) Grupo A (Tratamiento de control): el tendón extirpado durante la creación del defecto se reimplantó *in situ* en el defecto en forma inmediata y se suturó al canal óseo usando suturas absorbible 5-0; (2) Grupo B (ACI-Maix™): el defecto se reparó suturando la bioestructura de colágeno ACI-Maix™ como un injerto de interposición en el tendón nativo y los bordes del canal óseo; (3) Grupo C (ACI-Maix™ con tenocitos autólogos): se uso un material compuesto de células-bioestructura para reparar el defecto del manguito de manera idéntica al Grupo B; (4) Grupo D (Restore™): el defecto del manguito se reparó de manera idéntica al Grupo B, pero utilizando Restore™ como un injerto de interposición; y (5) Grupo E (Restore™ con tenocitos autólogos): el compuesto Restore™ sembrado con tenocitos se usó para reparar el defecto del manguito de manera idéntica al Grupo C. En cada grupo, cinco de los diez conejos se sacrificaron a las cuatro semanas, y los otros fueron sacrificados a las ocho semanas.

60 Todos los datos estadísticos se expresan como media ± desviación estándar y se comparan mediante ANOVA usando el software estadístico SPSS (SPSS inc. EE.UU.). Los valores P menores a 0,05 fueron considerados significativos.

### Ejemplo 3. Recolección y cultivo de tenocitos

65 Como se muestra en la Figura 2, se obtuvo tejido del tendón de 3 mm de diámetro mediante punción de biopsia del tendón rotuliano de conejo y se lavó en medio DMEM F-12 (GIBCO, Invitrogen, EE.UU.) complementado con suero fetal bovino al 10% (FBS), 100 µg/mL de Penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (en lo sucesivo, el medio se refiere a los mismos contenidos). El tejido del tendón se diseccionó en 0,5 mm de diámetro y se digirió con

colagenasa (100 UI/mL de Gibco, Invitrogen, EE.UU.) durante la noche a 37°C. Después de la digestión, la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar restos de la matriz y las células liberadas del tejido se centrifugaron hasta formar un sedimento a 2000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante que contenía las enzimas se descartó y se resuspendió el sedimento en un nuevo medio. Este proceso de lavado se repitió tres veces.

El sedimento celular de los tenocitos resultantes se resuspendió luego en 5 mL de medio y se colocó en un matraz de cultivo a una densidad entre  $10^3$  a  $10^4$  células/mL que contenía medio de cultivo. Este medio de cultivo contiene medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen), suero bovino fetal al 15% v/v, 0,0006% p/v de insulina, 0,0002% p/v de betametasona, 0,5% p/v de penicilina, 0,5% p/v de estreptomina y 0,6% de L-prolina a pH 7,0. Las células se incuban luego bajo CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. El medio de cultivo debe cambiarse cada tres días durante 3 a 5 semanas hasta que las células alcancen el número máximo de células en el quinto pase, típicamente  $20 \times 10^7$  células. Para la implantación, los tenocitos del pase dos se cargaron ya sea en ACI-Maix™ (lado rugoso) o en bioestructura Restore™ a una densidad de alrededor de  $3,5 \times 10^6/cm^2$  y se cultivaron durante hasta 5 días para formular bioestructuras sembradas con células antes de la implantación.

#### Ejemplo 4. Comparación de la expresión de ARNm *in vivo* e *in vitro* en tenocitos

Para confirmar si los tenocitos mantuvieron su fenotipo durante el cultivo, se examinó la expresión del colágeno de tipo I/III y el ARNm de EphA4. Se extrajeron muestras de ARN total tanto del tejido del tendón como de los tenocitos cultivados *in vitro* utilizando Mini Kit RNeasy (QIAGEN Australia). El ARN se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando el kit de síntesis RETROscript™ First-strand (Ambion EE.UU.). Se realizó RT-PCR semicuantitativa para generar y amplificar el colágeno de tipo I/III y ADNc de EphA4. Los productos de PCR finales se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se visualizaron mediante UN transiluminador UV (IBI) y película Polaroid. El experimento se repitió cuatro veces para garantizar la integridad de los resultados. La amplificación por PCR se realizó de acuerdo con las condiciones enumeradas en la Figura 15.

#### Ejemplo 5. Inmuntinción para proteína colágeno de tipo I en cultivo *in vitro* de tenocitos

Para confirmar si los tenocitos mantienen su capacidad para producir colágeno de tipo I en cultivo, se realizó una inmuntinción en las siguientes secuencias: colocar el pase del cultivo de dos tenocitos en una placa de 6 pozos; a una confluencia del 50% fijar con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente; bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 5 minutos; enjuagar en 3 cambios de solución salina del regulador Tris (TBS); permeabilizar las células con Triton X100 al 0,1% durante 5 minutos; lavar dos veces con albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA Sigma, EE.UU.)/solución salina regulada con fosfato (PBS); incubar con cualquier anticuerpo cebador de colágeno I (1:3000 Abcam, catálogo: 106017, Reino Unido), diluido en BSA/PBS al 0,2% durante 1 hora a temperatura ambiente (control negativo tratado con PBS en esta etapa); lavar 4 veces con BSA/PBS al 0,2%, 4 veces con PBS y 4 veces con BSA/PBS al 0,2%; incubar con el segundo anticuerpo usando el sistema LSAB (Dako, catálogo: K0675 Dinamarca); repetir el procedimiento de lavado; visualizar con el kit DAB (Dako, catálogo: K3468 Dinamarca) que tiñe la proteína de color marrón.

#### Ejemplo 6. Caracterización morfológica de las bioestructuras sembradas con tenocitos

Para determinar los comportamientos de los tenocitos en las bioestructuras, se estudió la morfología de los bioestructuras sembrados con tenocitos los días 1, 3 y 5 del cultivo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% (TAAB, Reading, Reino Unido) durante 7 días a temperatura ambiente y luego se trataron con ácido tánico. Las muestras se enjuagaron en regulador de cacodilato 0,2 M; se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% en regulador de cacodilato durante 60 minutos a temperatura ambiente; se lavaron en 3 cambios de regulador de cacodilato; se colocaron en ácido tánico al 1% en regulador de cacodilato 0,05 M durante 60 minutos a temperatura ambiente; se lavó en solución salina; se tiñó durante 60 min en acetato de uranilo al 0,5% en agua bidestilada; se enjuago en solución salina; se colocaron en 25%, 50%, 70%, 95% y etanol absoluto secuencialmente durante 30 minutos cada vez a temperatura ambiente; y luego se lavaron dos veces en etanol súper seco durante 30 min cada vez a temperatura ambiente. Después del secado en el punto crítico, las muestras se montaron y se visualizaron usando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL30.

#### Ejemplo 7. Técnicas operativas

Se anestesiaron cincuenta conejos mediante inyección intramuscular de Ketamina (Parke-Davis, Auckland, NZ) y Xilazina (Troy Laboratories Australia). Se realizó una incisión longitudinal sobre el hombro izquierdo (no se hizo nada sobre el hombro derecho) y se logró la exposición quirúrgica del tendón del manguito de los rotadores liberando una parte de los músculos trapecio y deltoides del acromion. El tendón completo del manguito de los rotadores se extirpó completamente desde la inserción del hueso con el tendón hasta la unión del tendón con el músculo, creando un defecto rectangular de aproximadamente  $7 \times 8 \text{ mm}^2$  de área (Figura 2). Utilizando una fresa dental, se preparó un canal óseo de 10 mm de largo, 2 mm de ancho y 2 mm de profundidad en la tuberosidad mayor, perpendicular a la dirección de la fibra del tendón. Se hicieron dos perforaciones pequeñas, de 0,5 mm de diámetro, desde la cara lateral del húmero dentro del canal óseo. Luego, el defecto fue reparado utilizando el método correspondiente a su

grupo. Después de la reconstrucción del tendón, la herida se cerró en capas y se vendó, pero la extremidad no se entablilló.

Ejemplo 8. Recolección de la muestra y evaluación geométrica

A las 4 y 8 semanas, los conejos se anestesiaron y se sacrificaron mediante inyección intravenosa de pentobarbital. La cabeza del húmero, el tendón del manguito y parte del músculo se recogieron de ambos hombros (operados y no operados). En condición relajada, se midieron la longitud y el ancho del tendón operado y no operado con un calibrador de vernier y el espesor se midió con un micrómetro. Las muestras se fijaron luego en paraformaldehído al 4%. Después de la fijación, las muestras se descalcificaron con ácido fórmico al 10%, se deshidrataron, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina y azul alcian.

Ejemplo 9. Examen de histología

La respuesta de inflamación a los implantes se evaluó mediante la velocidad de inflamación que se interpretó como el área porcentual del tendón para reparación ocupado por las células inflamatorias. El área del tendón completo y las áreas ocupadas por las células inflamatorias se midieron utilizando el software gráfico Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, EE.UU.). El examen histológico general se realizó con hematoxilina y eosina y tinción con azul alcian. Ocho parámetros fueron evaluados semicuantitativamente (Movin et al., 1997; Shalabi et al., 2002): (1) estructura de la fibra, (2) disposición de la fibra, (3) redondeo de los núcleos, (4) inflamación, (5) aumento de la vascularización, (6) unión del tendón al hueso, (7) biocompatibilidad (velocidad de absorción del material implantado) y (8) contenido de glicosaminoglicanos (la intensidad del color azul en la sección de azul alcian). Se asignaron cero a tres puntos a cada una de estas variables, siendo 0 normal y 3 anormalidad máxima. Por lo tanto, un tendón perfectamente normal tendría un puntaje de 0, y un tendón con anormalidad máxima obtendría un puntaje de 24.

El parámetro de inflamación se convirtió a partir de la velocidad de inflamación, donde menos del 10% obtuvo 0, 10-20% obtuvo 1, 20-30% obtuvo 2, y más del 30% de infiltrado de células inflamatorias obtuvo 3. La interpretación de la unión del tendón al hueso se basó en la formación de canales óseos. Si el canal óseo presentaba una histología de unión de tendón típica que constaba de 4 zonas (hueso cortical, fibrocartilago mineralizado, fibrocartilago y tendón) obtuvo 0. La ausencia de una de estas zonas dio como resultado un aumento de la puntuación de 1 y una unión completamente disociada puntuó 3. Este sistema de puntuación es una modificación de la clasificación de Likert (Movin et al., 1997, Shalabi et al., 2002).

Ejemplo 10. Inmuntinción de colágeno de tipo I en tendón reparador

Para determinar la proporción de células que sintetizan la proteína colágeno de tipo I, se realizó una inmuntinción en la siguiente secuencia: después del desparafinado y la rehidratación, los portaobjetos se digirieron con tripsina al 0,1% durante 20 min para recuperar el antígeno; se lavó con agua; se bloqueó con peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 5 min; se lavó con TBS tres veces durante 5 minutos cada vez; se bloqueó con suero bovino fetal (FBS) al 20% durante 30 minutos; se incubó con anticuerpo cebador de colágeno de tipo I (1:3000 abcam, catálogo: 106017, Reino Unido) durante 3 horas a temperatura ambiente (el control negativo se trató con PBS en esta etapa); se lavó en TBS tres veces durante 5 minutos cada vez; se incubó con un segundo anticuerpo usando el sistema LSAB (Dako, catálogo: K0675 Dinamarca); el procedimiento de lavado se repitió; se visualizó con el kit DAB (Dako, catálogo: K3468 Dinamarca), que tiñó las células positivas de color marrón; y se contratiñó con hematoxilina.

Se seleccionaron aleatoriamente cinco vistas de alta potencia (400X) de cada diapositiva. Se contaron el número total de células y las células positivas para colágeno de tipo I de cada vista. La relación se calculó dividiendo el número de células positivas para colágeno de tipo I por el número total de células. El promedio de las cinco vistas fue la proporción final de la diapositiva.

Ejemplo 11. Diseño experimental

Cincuenta conejos se asignaron aleatoriamente en cinco grupos de diez (Figura 1). Los manguitos de los rotadores izquierdos se diseccionaron completamente y se reconstruyeron mediante uno de los cinco métodos. En el reimplante *in situ* del tendón del manguito de los rotadores diseccionado sirvió como control. Se sacrificaron cinco conejos de cada grupo a las 4 y 8 semanas después de la operación.

En la Figura 2 se representa un esquema del modelo de desgarro masivo del manguito de los rotadores del conejo, utilizado en este estudio. Los tenocitos autólogos digeridos con enzimas a partir de la biopsia obtenida del tendón rotuliano se cultivaron *in vitro* y se sembraron en ambas bioestructuras (densidad celular: 3,5 X 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup>). Cuando las bioestructuras celulares estaban listas, el tendón del manguito de los rotadores se escindió completamente del punto de inserción de la tuberosidad humeral a la unión del tendón al músculo, creando un defecto de alrededor de 7 x 8 mm<sup>2</sup>. En el grupo de control, este se reimplantó en el sitio de extirpación. En los otros cuatro grupos, la porción de tendón extirpado se descartó y se reemplazó por bioestructuras ACI-Maix<sup>TM</sup> y Restore<sup>TM</sup>, con o sin tenocitos autólogos.

Ejemplo 12. Expresión de proteína y ARNm de tipo I/III y EphA4 en tenocitos

Usando análisis de RT-PCR, se compararon los perfiles de expresión génica de colágeno de tipo I/III y EphA4 en tejido de tendón y tenocitos cultivados. Como se muestra en la Figura 3, los tenocitos mantuvieron su capacidad para expresar colágeno de tipo I/III y ARNm de EphA4 *in vitro*. El nivel de expresión pareció mayor en muestras de ARNm extraídas de los tenocitos cultivados *in vitro* que en tejido tendón cuando se comparó con el gen de mantenimiento GAPDH.

Para confirmar adicionalmente si los tenocitos *in vitro* producen proteína colágeno de tipo I, se realizó la tinción inmunohistoquímica de la proteína de tipo I en los tenocitos cultivados. El resultado muestra proteína de colágeno de tipo I en el citoplasma de los tenocitos cultivados *in vitro* (Figura 4A), mientras que en el pozo de control no se observó tinción positiva (Figura 4B).

Ejemplo 13. Evaluación morfológica de bioestructuras sembradas con tenocitos

El análisis por microscopio electrónico de barrido de la bioestructura de colágeno ACI-Maix™ indicó una disposición de fibra de colágeno porosa suelta con un tamaño de poro de aproximadamente 200 μm (Figura 5A). A las 24 horas, los tenocitos se habían adherido a la matriz de colágeno y formaban una disposición similar a una lámina. A las 72 horas, se había producido una abundante replicación de tenocitos y las células cubrían la mayor parte de la superficie de la bioestructura (Figura 5B). Mayor aumento (Figura 5C) de la morfología celular individual demostró dos tipos de protrusiones, ampollas y lamelipodios, que irradian desde la superficie de la célula. La bioestructura SIS Restore™ se caracterizó por una topología de superficie plana y una estructura muy compacta (Figura 5D). El patrón de crecimiento de los tenocitos en la bioestructura Restore™ fue similar al del matraz de cultivo, mostrando una apariencia similar a un fibroblasto aplanado. La replicación de los tenocitos fue relativamente lenta con un patrón de crecimiento monocapa (Figura 5E). Una mayor ampliación reveló que los tenocitos sembrados con Restore™ (Figura 5F) también producen grandes cantidades de protuberancias en la superficie de la célula, similares a las de la bioestructura ACI-Maix™.

Ejemplo 14. Examen macroscópico

Después de la cirugía, todos los conejos sobrevivieron hasta la eutanasia programada. No hubo infecciones de heridas ni otras complicaciones observadas. Se observó una marcha con cojera desde la extremidad anterior operativa durante las primeras semanas después de la cirugía, y luego la marcha normal regresó a las 2 semanas. El examen macroscópico reveló que no se observaron arranques o fallas en la reparación del tendón en ninguna muestra en ningún punto temporal. El espesor medio, el ancho y la longitud de cincuenta tendones del manguito de los rotadores de conejo normales recolectados del hombro no operado fueron de 2,5 + 0,3 mm, 6,6 + 0,5 mm y 8,8 + 0,5 mm, respectivamente (Figura 16). En general, las muestras de espesor promedio a las 4 semanas fueron significativamente (p <0,01) más gruesas que el tendón normal, mientras que las muestras a las 8 semanas fueron significativamente (p <0,01) más delgadas que el tendón normal. No se encontraron diferencias en el ancho entre el tendón normal y el tendón reparador. Tanto los tendones de reparación de 4 como de 8 semanas eran significativamente alargados (4-5,5 mm más largos, p <0,01) en comparación con el tendón normal (Figura 16).

Ejemplo 15. Evaluación histológica del tratamiento control

La reparación del tendón autólogo a las 4 semanas después de la cirugía se caracterizó por un aumento en la celularidad, neoangiogénesis y alteraciones en la disposición longitudinal normal de las fibras de colágeno (Figura 6A). El colágeno se volvió más ondulado que el del tendón normal con algunas áreas desorganizadas y núcleos de tenocitos ligeramente redondeados. La unión del tendón al hueso en el canal óseo era de tipo fibrocartilago con grandes células de cartilago esféricas llenando el espacio, similar a la unión normal del tendón al hueso, excepto por una población celular densa y una ausencia de matriz osteoide mineralizada (Figura 4B). A las 8 semanas, las muestras mostraron una estructura más organizada con densidad y forma celulares normales, y una disposición paralela saludable de fibras de colágeno reparadoras (Figura 6C). El canal óseo de la muestra de 8 semanas exhibió una formación de 4 zonas más madura y una mejor integración con la médula ósea (Figura 6D).

Ejemplo 16. Evaluación histológica de bioestructuras SIN tenocitos autólogos

Grupo de ACI-Maix™. 4 semanas después de la cirugía, todos los injertos de ACI-Maix™ implantados sin tenocitos autólogos mostraron grandes porciones de la bioestructura que no se absorbieron. En las áreas donde permaneció la estructura original de la bioestructura, se observó un gran número de células linfocíticas dentro y alrededor de la bioestructura restante (Figura 7A). Las áreas donde se absorbió el injerto demostraron un patrón de reparación primario caracterizado por una disposición de colágeno más o menos paralela, mayor celularidad y vascularización (Figura 7B). El canal óseo estaba dominado por tejido de cartilago reparado, con tejido fibroso denso que se extendía desde el borde del canal óseo (Figura 7C). A las 8 semanas, el sitio del implante mostraba más haces paralelos de fibras de colágeno, que contienen células fibroblásticas de baja densidad y neoangiogénesis reducida (Figura 7D). La formación de canales óseos también maduró a medida que la organización de la fibra de colágeno se remodeló y produjo una buena integración con el hueso cortical y esponjoso (Figura 7E). Sin embargo, dos de las

cinco muestras todavía contenían fragmentos de bioestructura no absorbida con evidente infiltración linfocítica. Además, se encontraron inducciones de tejido adiposo en la sustancia media del tendón regenerado en las cinco muestras de 8 semanas (Figura 7F).

5 Grupo de Restore™: En todas las cinco muestras de 4 semanas, Restore™ implantado sin tenocitos autólogos solo se absorbió parcialmente. La estructura original del Restore™ estaba presente como bioestructuras desorganizadas a lo largo de la estructura del tendón. Numerosas células inflamatorias, predominantemente linfocitos, se observaron en los márgenes del injerto (Figura 8A). Algunos macrófagos, plasma, eosinófilos y células polimórficas se observaron ocasionalmente dentro de las fibras de la bioestructura. En áreas donde se había absorbido Restore™, había una gran cantidad de fibroblastos y linfocitos dentro de una matriz de tejido conectivo ricamente vascularizada que se asemejaba al tejido de granulación (Figura 8B). El canal óseo estaba ocupado por tejido fibroso mezclado con condrocitos con la zona mineralizada prácticamente ausente en todas las muestras.

15 A las 8 semanas, cuatro de los cinco implantes de bioestructura Restore™ se absorbieron por completo. El que no fue completamente absorbido presentó una infiltración de linfocitos evidente similar a las muestras de 4 semanas (Figura 8C). En el área absorbida, las fibras de colágeno se alinearon en un patrón menos ondulado y la angiogénesis fue menos intensa. La unión del tendón al hueso exhibió una estructura madura de 4 zonas que incluye hueso cortical, fibrocartilago mineralizado; fibrocartilago y tendón (Figura 8D). Se detectó algo de tejido de granulación entre los espacios de las fibras de colágeno, que se asemeja a la respuesta de granuloma crónico. Inesperadamente, se encontró algo de formación de hueso ectópico en la mitad de la sustancia de dos muestras.

#### Ejemplo 17. Evaluación histológica de bioestructuras CON tenocitos autólogos

25 Grupo de ACI-Maix™: a las 4 semanas después de la cirugía, tanto el tendón recién generado como el canal óseo de la bioestructura de ACI-Maix™ implantada con tenocitos autólogos eran similares a bioestructuras de 4 semanas implantadas sin tenocitos. Algunas partes de la bioestructura aún permanecían y las células linfocíticas se vieron de nuevo dentro y alrededor de la bioestructura (Figura 9A). También se observaron tenocitos autólogos implantados en la superficie de la bioestructura no absorbida (Figura 9B). En las áreas donde se absorbió bioestructura, la disposición de colágeno desigual y los lechos vasculares se observaron de forma similar a otros grupos experimentales.

35 Curiosamente, a las 8 semanas después de la implantación, se evidenciaron resultados reparativos superiores, con una histología del tendón similar a la del tratamiento de control ( $p > 0,05$ ) (Figura 9C). Todas las bioestructuras implantadas fueron completamente absorbidas y reemplazadas por tejido de tendón a las 8 semanas. Los haces de colágeno se dispusieron longitudinalmente y la apariencia histológica del canal óseo fue indistinguible de la histología de control (Figura 9D). Una cantidad ligeramente aumentada de fibroblastos se distribuyó uniformemente entre los haces en un patrón típicamente aplanado, delgado y ondulado. Solo una de cada cinco muestras contenía tejido adiposo en el medio del tendón recién generado.

40 Grupo de Restore™: Restore™ implantado con tenocitos autólogos mostró un patrón de reparación similar a otros grupos a las 4 semanas. Se observaron excelentes resultados reparativos a las 8 semanas, resaltados por una apariencia histológica similar a la reparación del tendón de control, demostrando haces de colágeno dispuestos longitudinalmente con fibroblastos distribuidos uniformemente entre los haces en un patrón en forma de huso (Figura 10A) y formación de canal óseo maduro (Figura 10B). No se encontró bioestructura no absorbida en las cinco muestras y la mayor parte de la formación de canal óseo demostró una estructura típica de cuatro zonas. Sin embargo, todavía se observó tejido de granulación (Figura 10C) en las 5 muestras y se encontró hueso ectópico (Figura 10D) en 2 muestras.

#### Ejemplo 18. Evaluación semicuantitativa de la histología del tendón reparador

50 El análisis de la tasa de inflamación a los bioestructuras demostró que la respuesta inflamatoria era menos intensa en los grupos constructores de células de bioestructura que en la bioestructura únicamente (Figura 11). A las 4 semanas, la tasa promedio de inflamación (el porcentaje de áreas del tendón reparador ocupadas por células inflamatorias) fue del 56% con ACI-Maix™, mientras que el grupo de ACI-Maix™ + células se redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) al 26%. Se observó un fenómeno similar en los grupos que aplicaban bioestructura Restore™, disminuyendo la tasa inflamatoria de 46% a 27% favoreciendo la implantación de tenocitos autólogos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cuando se comparó con los controles, la tasa de inflamación en los cuatro grupos experimentales fue significativamente elevada ( $p < 0,05$ ), independientemente de que tuvieran células o no. A las 8 semanas, la bioestructura se absorbió y la respuesta inflamatoria de todos los grupos se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) en comparación con 4 semanas. En los grupos en los que se implantaron tenocitos autólogos, las tasas de inflamación fueron muy similares ( $p > 0,05$ ) a las del grupo de control, mientras que la inflamación observada en el grupo de bioestructura únicamente fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que los controles.

65 El examen general de histología reveló que, todos los grupos experimentales tienen puntuaciones histológicas pobres en comparación con el control positivo ( $p < 0,01$ ) a las 4 semanas (Figura 12). A las 8 semanas, la bioestructura de ACI-Maix™ implantada solo mostró una puntuación histológica significativamente inferior al control

( $p < 0,05$ ), mientras que sembrada con tenocitos autólogos mostró una puntuación mucho mejor, idéntica al control ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la diferencia entre estos dos grupos (ACI-Maix<sup>TM</sup> con y sin tenocitos) no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Aunque el puntaje de histología de la bioestructura Restore<sup>TM</sup> sin tenocitos era peor que el implantado con tenocitos y control, aun así, logró un resultado estadísticamente no significativo diferente de cualquiera de ellos ( $p > 0,05$ ).

La inmunotinción demostró que tanto el citoplasma como la matriz extracelular se tiñeron positivamente para el colágeno de tipo I (Figura 13A) mientras que no se observó tinción positiva en el control negativo (Figura 13B). A las 4 semanas, la proporción de células positivas de colágeno de tipo I promedio del grupo de control fue del 53,4%, ACI-Maix<sup>TM</sup> fue del 38,4%, ACI-Maix<sup>TM</sup> sembrada con tenocitos fue del 58%, Restore<sup>TM</sup> fue del 36,2% y Restore<sup>TM</sup> sembrado con tenocitos fue del 48,8%. A las 8 semanas, la proporción de células positivas al colágeno de tipo I aumentó ligeramente en todos los grupos, alcanzando el 63,2% el grupo de control, ACI-Maix<sup>TM</sup> alcanzando el 50,60%, ACI-Maix<sup>TM</sup> sembrado con tenocitos alcanzando el 61,2%, Restore<sup>TM</sup> alcanzando el 51,80%, Restore<sup>TM</sup> sembrado con tenocitos alcanzando el 65%. En ambos puntos temporales, las tasas positivas de bioestructuras sembradas con tenocitos fueron significativamente más altas que aquellas sin tenocitos ( $p < 0,05$ , Figura 14) y similares al control ( $p > 0,05$ ).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso en un método para tratar el desgarro del manguito de los rotadores en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de:
- (i) expandir selectivamente tenocitos *in vitro* en un medio de cultivo que comprende insulina y un glucocorticoide para producir un cultivo expandido de tenocitos;
- 10 (ii) sembrar una bioestructura con dichos tenocitos expandidos para producir una bioestructura sembrada con tenocitos, en la que la bioestructura está adaptada para la implantación proximal a un desgarro del manguito de los rotadores; y
- (iii) implantar dicha bioestructura sembrada con tenocitos proximal al desgarro del manguito de los rotadores.
- 15 2. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho desgarro del manguito de los rotadores es un desgarro masivo del manguito de los rotadores.
3. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichos tenocitos se aíslan de un tejido que contiene tenocitos antes de la expansión selectiva.
- 20 4. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho tejido que contiene tenocitos es un tendón.
5. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichos tenocitos son de un animal de mamífero seleccionado del grupo que consiste en una oveja, una vaca, un cerdo y un ser humano.
- 25 6. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho animal mamífero es un ser humano.
- 30 7. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichos tenocitos son autólogos.
8. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dichos tenocitos se expanden selectivamente *in vitro* en un medio de cultivo que comprende 0,0006% p/v de insulina y 0,0002% p/v de L-prolina.
- 35 9. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho cultivo expandido de tenocitos comprende al menos 80% de tenocitos.
- 40 10. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho cultivo expandido de tenocitos comprende al menos 80% de células que expresan uno o más genes que codifican lo siguiente: colágeno de tipo I, colágeno de tipo III, EphA4, escleraxis, Six1, COMP y Cbfal.
- 45 11. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la bioestructura sembrada con tenocitos se cultiva *in vitro* durante un tiempo suficiente para establecer los tenocitos antes de la implantación.
12. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho sujeto mamífero es un ser humano.
- 50 13. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con la reivindicación 6, para uso en un método de tratamiento de un desgarro masivo del manguito de los rotadores en un sujeto humano que lo necesite, comprendiendo el método las etapas de:
- 55 (i) aislar tenocitos del tejido de tendón aislado de dicho sujeto;
- (ii) expandir selectivamente tenocitos aislados *in vitro* en un medio de cultivo que comprende 0,0006% p/v de insulina y 0,0002% p/v de glucocorticoide para producir un cultivo expandido de tenocitos que comprende al menos 80% de tenocitos;
- 60 (iii) sembrar una bioestructura con dichos tenocitos expandidos y cultivar dicha bioestructura y tenocitos durante no más de cinco días para producir una bioestructura sembrada con tenocitos; y
- (iv) implantar dicha bioestructura sembrada con tenocitos en el desgarro del manguito de los rotadores y asegurarla con suturas.
- 65

14. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha bioestructura comprende una matriz, una membrana, una microperla, un vellón, un hilo o un gel, y/o mezclas de los mismos.
- 5 15. Una bioestructura sembrada con tenocitos para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que dicha bioestructura comprende una matriz de colágeno de tipo I/III o submucosa de intestino delgado.

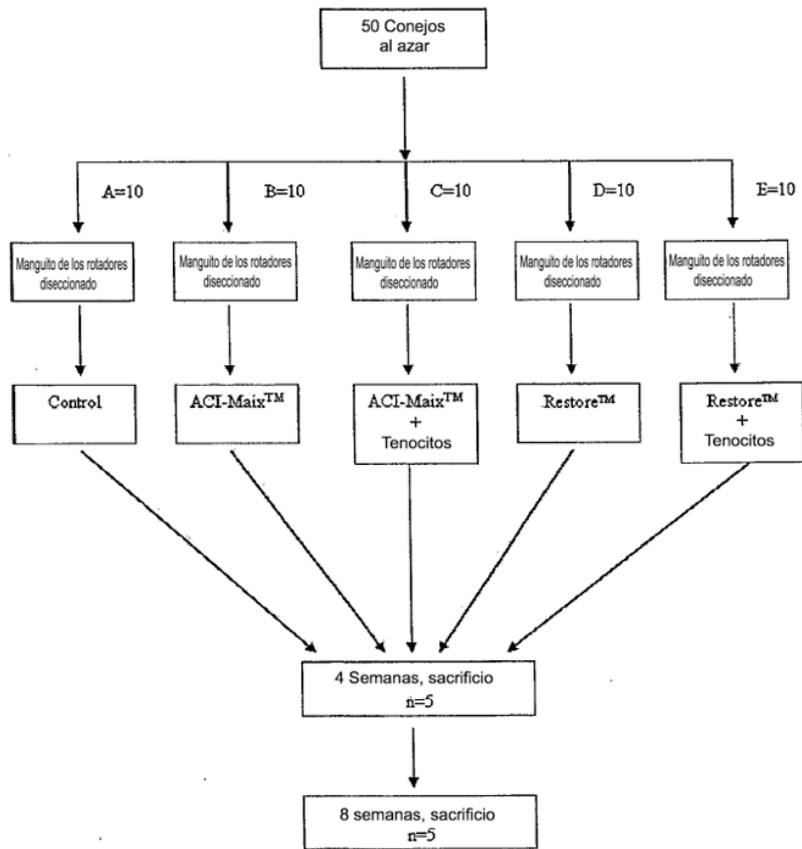


Figura 1

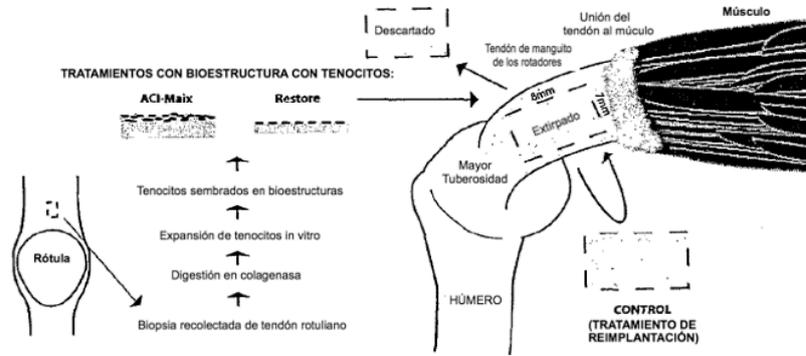


Figura 2

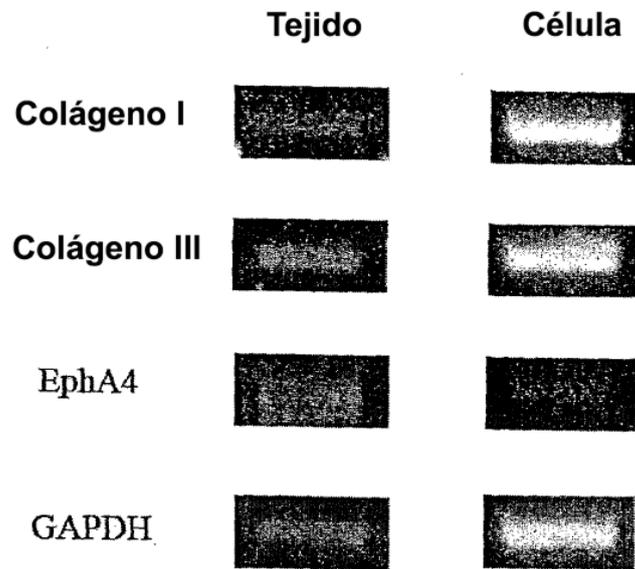


Figura 3

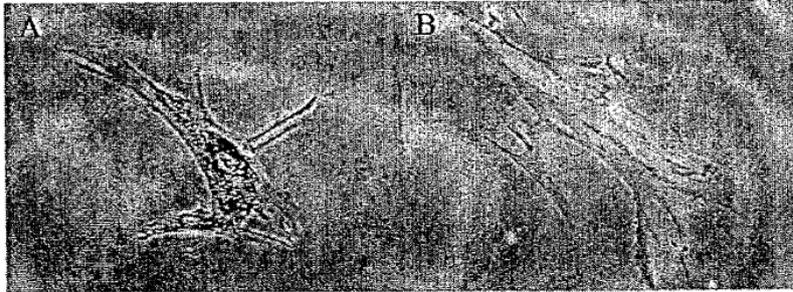


Figura 4



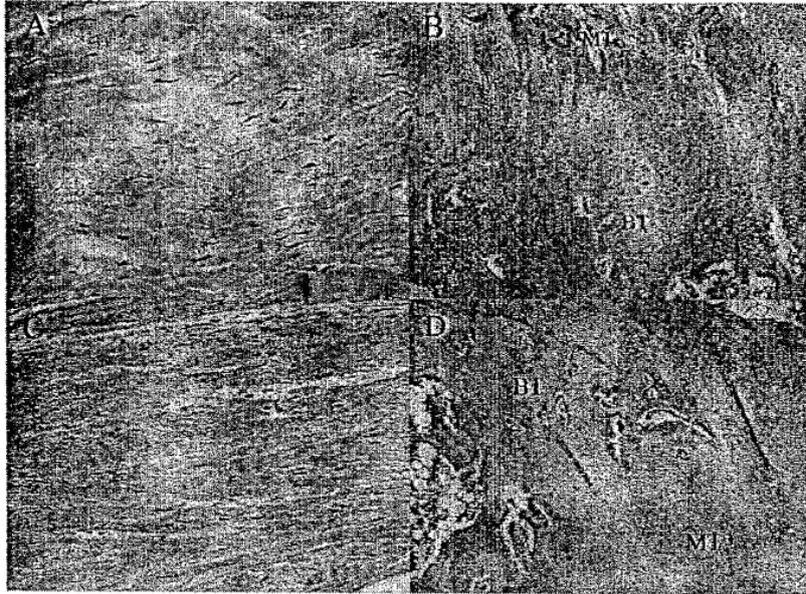


Figura 6



Figura 7

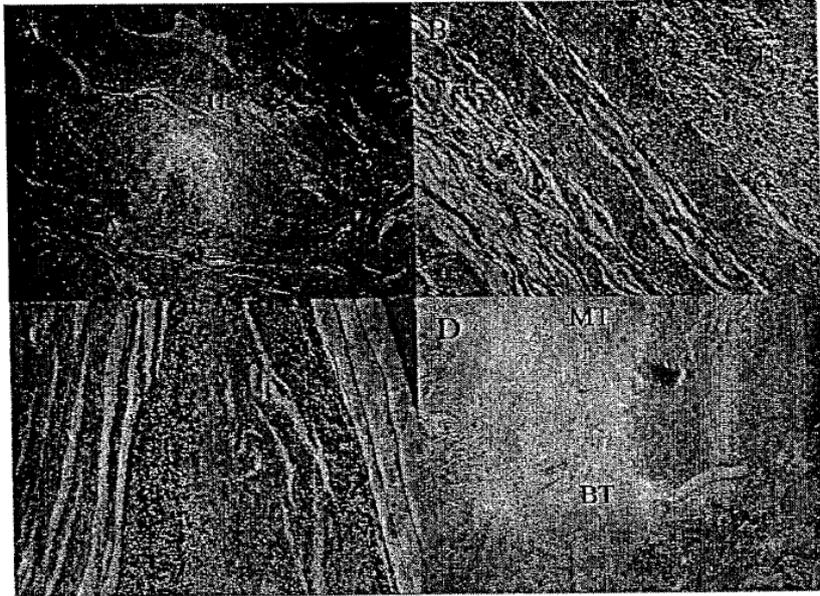


Figura 8

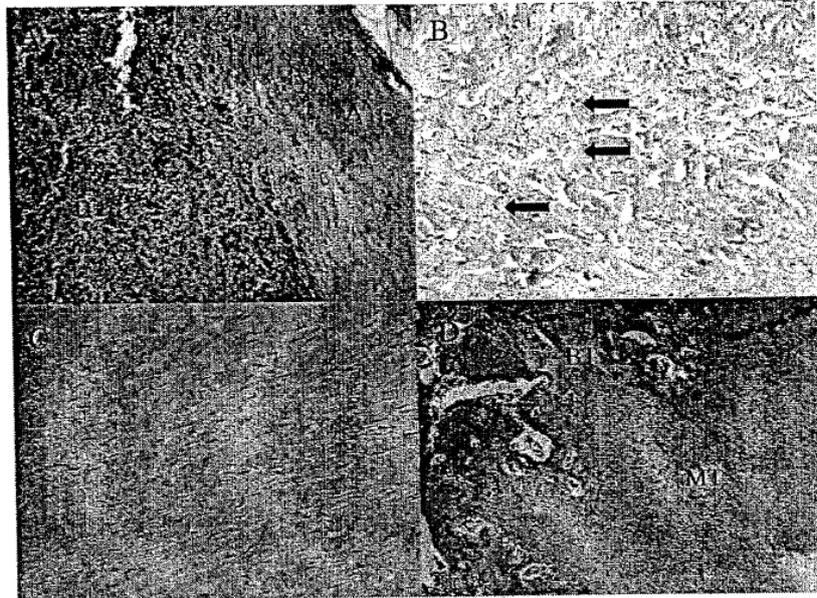


Figura 9

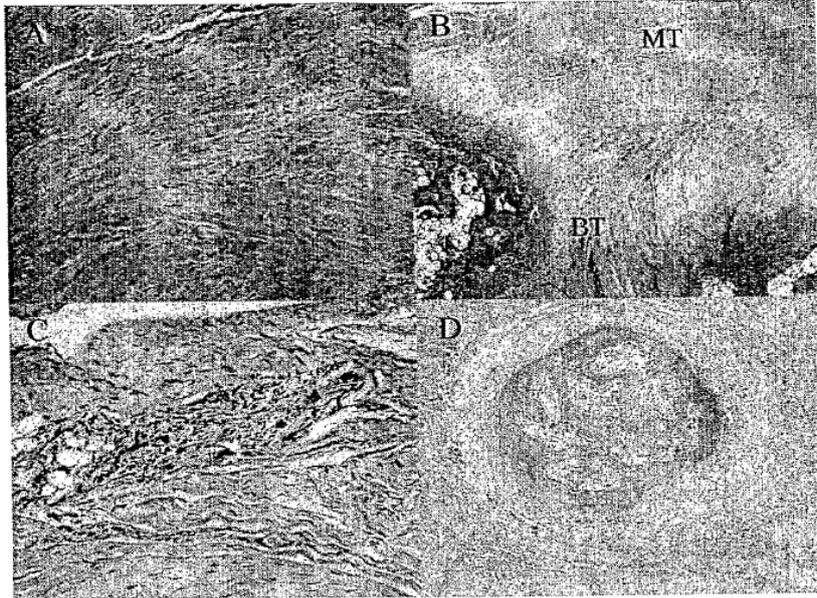


Figura 10

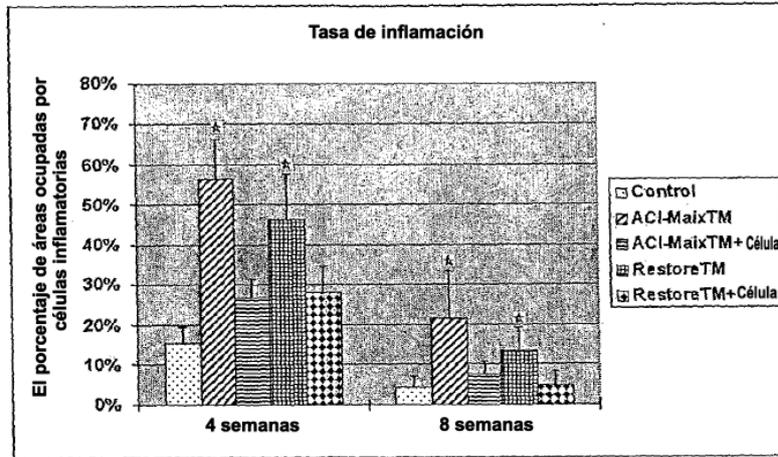


Figura 11

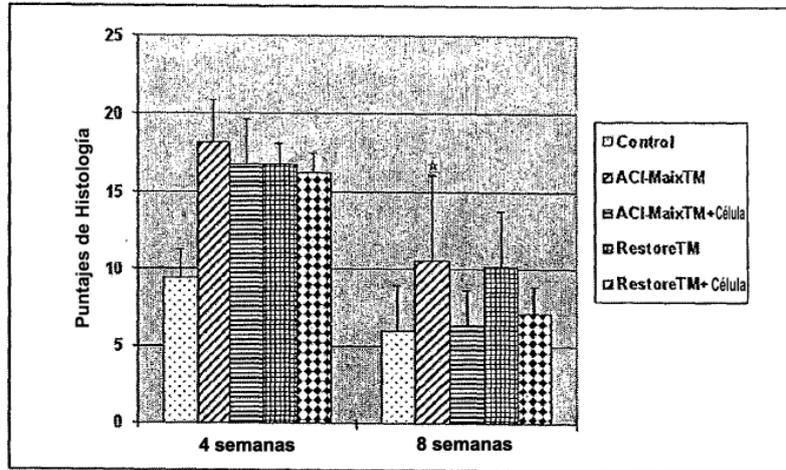


Figura 12

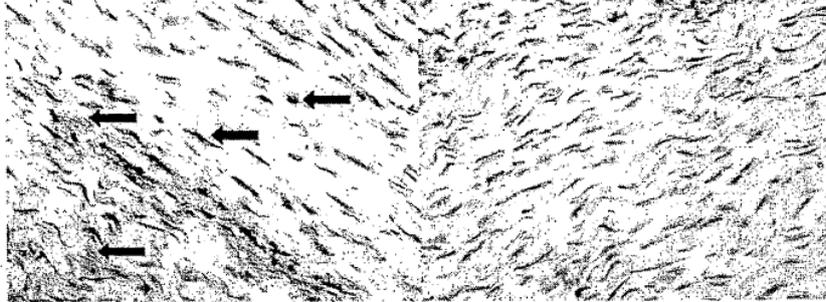


Figura 13

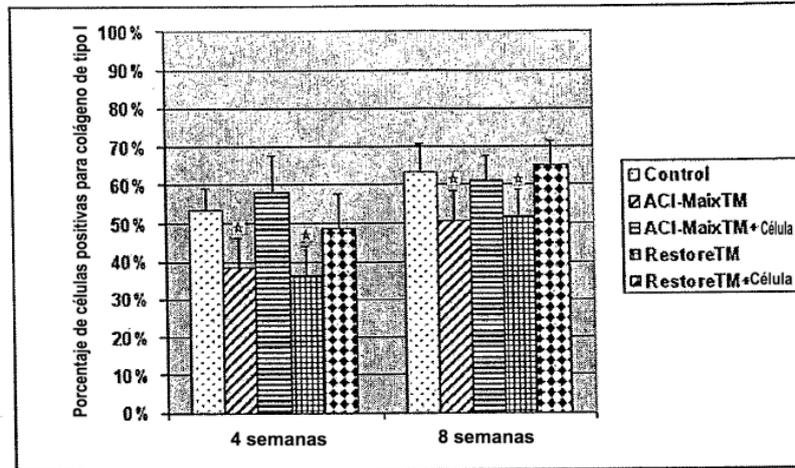


Figura 14

PCR Objetivo	Tamaño del Producto (pb)	Secuencia de los Cebadores (5' a 3')	Condiciones (Hibridación)
Colágeno Tipo I de Conejo	464	Sentido: CTCGCTCACCACCTTCTCTC	60°C 40 s, 30 ciclos
		Antisentido: TGTCTGAGAGGCGTGATTG	
Colágeno Tipo III de Conejo	254	Sentido: ACCAACCTCTTCCTGAAGCC	60°C 40 s, 30 ciclos
		Antisentido: CACCATTGAGACATTTTGAA	
EphA4 de Conejo	1205	Sentido: AGATGGTGAATGGCTGGTACC	580°C 40 s, 35 ciclos
		Antisentido: ATGATGCTGGCCTCACTCAGG	
GAPDH de Conejo	293	Sentido: TCACCATCTTCCAGGAGCGA	62°C 40 s, 30 ciclos
		Antisentido: CACAATGCCGAAGTGGTCGT	

Figura 15

	Puntos de Tiempo	Control (mm)	ACI Max™ (mm)	ACI Max™ Tenocitos (mm)	Restore™ (mm)	Restore™ Tenocitos (mm)	Normal (mm)
<b>Espesor</b>	4 semanas	3.2±0.8	3.3±0.8	3.3±0.5	2.8±0.6	3.0±0.4	2.5±0.3
	8 semanas	2.2±0.5	1.7±0.5	2.0±0.5	1.5±0.2	1.3±0.2	
<b>Ancho</b>	4 semanas	7.0±0.2	6.9±0.3	6.4±0.2	6.7±0.5	6.8±0.5	6.6±0.5
	8 semanas	6.7±0.3	6.9±0.3	6.8±0.4	6.9±0.3	6.8±0.3	
<b>Largo</b>	4 semanas	13.1±1.1	14.2±0.9	13.8±0.9	13.9±0.6	13.9±0.4	8.8±0.5
	8 semanas	12.8±1.0	14.3±0.8	14.2±0.9	13.8±0.7	13.5±0.7	

Figura 16