

# I PROCESSI DI GUARIGIONE DEL TENDINE

**Bisciotti Gian Nicola**

*Physiologist Lead c/o Qatar Orthopaedic and Sport Medicine Hospital, FIFA Center of Excellence, Doha (Q).*

*Kinemove Rehabilitation Centers Pontremoli, Parma, La Spezia (I).*

## **Abstract**

I processi di guarigione del tessuto tendineo, pur presentando alcune analogie con i processi di riparazione del tessuto muscolo-scheletrico, presentano delle particolarità del tutto specifiche che non possono essere ignorate nell'ambito della stesura di un iter riabilitativo consono ad una loro ottimizzazione. Un altro aspetto centrale dei processi di riparazione tendinea è rappresentato dai meccanismi molecolari della neo-formazione del tessuto tendineo stesso. Ad oggi l'utilizzo di alcune molecole sembrerebbe particolarmente promettente per indurre tali processi di neo-formazione e migliorare in tal modo la qualità del tessuto di riparazione.

**Parole chiave:** Tendine, Guarigione intrinseca, Guarigione estrinseca, GDFs, Scx.

## **Introduzione**

Per una migliore comprensione dei principi biologici sui quali si basa il processo di guarigione della struttura tendinea, in questo capitolo faremo una breve ma dettagliata review su quelle che sono le varie fasi della guarigione del tessuto tendineo dopo che quest'ultimo abbia subito un evento lesivo od un atto chirurgico. La piena comprensione in senso biologico di queste differenti fasi costituisce la premessa assolutamente necessaria per poter comprendere appieno l'eziologia e lo sviluppo dei disordini tissutali a carico del tessuto tendineo ed i pathways che possono comprometterne il completo recupero anatomico e funzionale. Tale base teorica è quindi il presupposto indispensabile per poter mettere in pratica delle efficaci strategie il cui scopo sia l'ottimizzazione dei naturali processi di guarigione tendinea. Il processo di guarigione del tessuto tendineo, come d'altro canto anche quello degli altri tessuti molli, si può basare essenzialmente su tre principi biologici ossia, la

rigenerazione, la riparazione oppure una loro combinazione. La rigenerazione rappresenta una forma di guarigione biologica che si attua attraverso la produzione di un nuovo tessuto le cui caratteristiche strutturali e funzionali sono identiche a quelle del tessuto primitivo (Leadbetter, 1992). La rigenerazione tissutale rappresenterebbe quindi, in via del tutto teorica, il processo di guarigione ideale per i tessuti molli lesionati, tuttavia esattamente come nel caso del muscolo scheletrico (Bisciotti, 2010), la guarigione del tessuto tendineo avviene grazie ad un processo di riparazione che esita nella formazione di un più o meno cospicua area cicatriziale, che ancora una volta esattamente come nel caso del muscolo scheletrico, si presenta di natura connettivale e con proprietà strutturali e funzionali inferiori a quelle del tessuto originario (Józsa e Kannus, 1997). Il tessuto tendineo, in confronto a quello muscolare, presenta ridotte capacità di auto-riparazione date dalla scarsa vascolarizzazione che a sua volta comporta un ridotto apporto di ossigenazione e di nutrimento a livello tissutale, anche se alcuni Autori sosterrrebbero che i processi autoriparativi del tendine sarebbero comunque sottostimati (Holch e coll., 1994; Maagaard-Mortensen e coll., 1994; Zwipp., 1995).

### **Le fasi della riparazione tendinea**

Da un punto di vista generale il processo di riparazione tendinea si suddivide nelle stesse fasi in cui è strutturato il processo di riparazione del muscolo scheletrico ossia in tre fasi tra loro consequenziale ma, nel contempo, estremamente interconnesse che sono:

- La fase infiammatoria, che ha inizio nell'immediatezza dell'evento lesivo e si protrae sino a circa il quarto-settimo giorno.
- La fase proliferativa che si protrae dalla fine della prima settimana post-lesionale sino a circa la quarta-sesta settimana .
- La fase di maturazione o di rimodellamento che dalla fine della fase proliferativa può protrarsi sino ad un anno dall'insorgenza dell'evento lesivo.

Come nel caso della riparazione del tessuto muscolare, il passaggio da una fase a quella successiva è estremamente sfumato, tanto da creare dei veri e propri quadri di coesistenza biologica tra le due fasi considerate. Consideriamo ora le tre diverse tappe biologiche prima sommariamente descritte nei loro dettagli principali.

#### ***La fase infiammatoria***

La fase infiammatoria, detta anche fase essudativa, ha inizio nell'immediato periodo post-traumatico come risposta fisiologica nei confronti del danno strutturale. In seguito al danno subito dalle rete vascolare, sangue, plasma e fluidi tissutali si riversano all'interno dell'area lesionata. Le piastrine presenti nella zona della lesione si legano al collagene esposto dall'evento traumatico e rilasciano fosfolipidi che stimolano i meccanismi di coagulazione (Houglum, 1992). Circa un'ora dopo il trauma nel sito lesionale sono già osservabili fibrina e fibronectina che formano dei cross-link con le fibre di collagene lesionate (Józsa e coll., 1989a; Lehto e coll., 1990). Già queste prime tappe portano alla formazione di una tenue struttura simil-collosa che agisce come un vero e proprio "tappo", seppure ancora strutturalmente fragile, che in ogni caso argina l'emorragia locale e supporta meccanicamente le fibre tendinee danneggiate nel sopportare le forze tensili alle quali sono sottoposte durante questa prima fase immediatamente post-lesionale. A questa prima risposta fa seguito, nell'arco di poche ore, una massiccia migrazione nell'area lesionata di leucociti polimorfonucleati e di monociti. Tale infiltrazione cellulare avviene entro 24 ore dal trauma e prosegue per i successivi 2-3 giorni. La fase infiammatoria rappresenta un periodo temporalmente piuttosto breve, dell'ordine di circa una settimana (Enwemeka, 1989; Garret e Lohnes, 1990; Houglum., 1992). Gli elementi cellulari, i leucociti polimorfonucleati, i monociti ed i macrofagi migrano massivamente all'interno dell'area lesionata attratti da particolari sostanze, prodotte all'interno del sito lesionale stesso, denominati agenti chemiotattici. Tra queste sostanze spicca per importanza l'istamina, sostanza che viene rilasciata dai mastociti, dai leucociti granulari e dalle piastrine. L'istamina esplica un'azione vasodilatatoria incrementando in tal modo la permeabilità vascolare: Sempre tra le sostanze chemiotattiche, spiccano per importanza anche la fibronectina, che esplica la sua azione chemiotattica sui leucociti e sui macrofagi e la bradichinina che, oltre ad incrementare la permeabilità vascolare, stimola il rilascio di prostaglandine durante il prosieguo fase infiammatoria. Quest'ultima è influenzata da due prostaglandine in particolare: La prostaglandina E (PGE) – che incrementa la permeabilità vascolare- e la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) che presenta la capacità di attrarre i leucociti. Immediatamente dopo l'evento lesivo si può anche osservare un rapido incremento del contenuto di DNA all'interno delle cellule tendinee che poi tende a stabilizzarsi nella successive fasi di proliferazione e di rimodellamento e maturazione (Okuda e coll., 1987; Abrahamsson e coll., 1989a; Abrahamsson e coll., 1989b). Nel periodo tardivo della fase infiammatoria le PGE e le PGE<sub>2</sub> possono dare inizio ad un precoce processo di riparazione continuando, nel contempo, la reazione infiammatoria, fornendo in tal modo un primo esempio di come le varie fasi siano spesso tra loro sovrapposte. Uno dei compiti principali delle cellule pro-infiammatorie è quello di rimuovere dall'area lesionata i tessuti necrotici ed i prodotti di rifiuto, soltanto dopo che questi ultimi sono stati rimossi, ossia dopo circa 5-7 giorni dall'evento

lesivo, può iniziare appieno la fase proliferativa. Come già accennato non esiste una netta suddivisione tra la fase infiammatoria, quella proliferativa e l'ultima fase di maturazione, ma si può osservare piuttosto un continuum di attività biologiche che presentano aspetti spesso sovrapposti (Houglum, 1992).

### ***La fase proliferativa***

La fase proliferativa ha inizio con un accumulo di fibroblasti, miofibroblasti<sup>1</sup>, e cellule endoteliali all'interno dell'area lesionata (Peacock e Van Winkle, 1970; Katenkamp e coll., 1976; Gelberman e coll., 1985; Gelberman e coll., 1988). I processi di migrazione e proliferazione di queste cellule sono promossi dalla presenza di fattori di crescita prodotti sia dalle piastrine che dai macrofagi (Houglum, 1992). In questa fase inizia la proliferazione di nuovi capillari che cominciano a comunicare funzionalmente con la rete capillare preesistente. Durante questa fase i fibroblasti ed i miofibroblasti, che possono provenire dal tendine stesso, dall'epitenonio, dalla guaina tendinea o dal paratenonio (Garner e coll., 1989), mostrano una forte attività proliferativa e di sintesi delle componenti della matrice extracellulare (ECM). In quest'ambito un importante ruolo è svolto dal Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), soprattutto per ciò che riguarda la proliferazione cellulare e la vascolarizzazione all'interno dell'area lesionata (Chang e coll., 1998). L'interazione tra capillari neo-formati, fibroblasti, miofibroblasti ed ECM da origine al tessuto di granulazione e l'originale "tappo" di sostanza simil-collosa formatosi nei primi stadi della fase infiammatoria, viene sostituito con una struttura più stabile, contemporaneamente la fibronectina migliora la migrazione e l'adesione dei fibroblasti. Nello stadio iniziale della fase di proliferazione, e più precisamente a partire dal settimo giorno dall'evento lesivo, i fibroblasti producono i glicosaminoglicani della ECM (principalmente acido ialuronico) ed il collagene di tipo III, anche se un netto incremento della sintesi di collagene è osservabile solamente a partire dalla terza settimana post-lesionale. Le nuove fibre di collagene che si vanno formando, non hanno ancora tuttavia né una consistente organizzazione strutturale né un netto orientamento. L'ultimo periodo della fase di proliferazione fa registrare un produzione di collagene di tipo I che continuerà sino alla fine della fase di maturazione e rimodellamento (Leadbetter, 1992). Il collagene di tipo I, a cominciare all'incirca dal dodicesimo

---

<sup>1</sup> *I miofibroblasti sono cellule del tessuto connettivo con capacità contrattili simili alla muscolatura liscia. Scoperte nel 1970, a queste cellule è riconosciuto un ruolo importante nel processo di guarigione delle ferite, nella fibrosi dei tessuti, e nelle contratture patologiche della fascia. La loro evoluzione avviene generalmente da normali fibroblasti a proto-miofibroblasti, fino alla completa differenziazione in miofibroblasti e ad una apoptosi terminale che è influenzata dalle tensioni meccaniche, dalle citochine e da specifiche proteine che provengono dalla matrice extracellulare*

- quattordicesimo giorno, inizia a sostituire il collagene di tipo III, nel frattempo il tessuto di granulazione è ulteriormente maturato e la formazione cicatriziale sta assumendo una sua solidità strutturale. Durante questa fase si può osservare un decremento dell'attività degli enzimi ossidativi, ed un netto incremento di quella degli enzimi anaerobici (Józsa e Kannus , 1997) . A questo proposito è interessante notare che anche nel muscolo scheletrico lesionato nel giro di poche ore dall'evento lesivo, il consumo di ossigeno a riposo, all'interno dell'area muscolare lesa, si alza drasticamente, generando come conseguenza uno squilibrio tra il rifornimento e la richiesta di O<sub>2</sub>, che determina a sua volta una rapida discesa della tensione di O<sub>2</sub> all'interno dell'area insultata, contestualmente a questo, si assiste ad aumento della concentrazione di lattato all'interno della lesione. Nel tendine la fase di proliferazione dura mediamente da tre a sei settimane , periodo oltre il quale viene progressivamente sostituita dalla fase di maturazione e rimodellamento.

### ***La fase di rimodellamento e maturazione***

Quest'ultima fase è quella temporalmente più lunga, si può infatti protrarre sino ad oltre un anno dall'evento lesivo (Houglum, 1992). Durante la fase di rimodellamento il numero dei macrofagi, dei fibroblasti, dei mioblasti e dei capillari diminuisce in modo lento e progressivo contestualmente a questo anche l'attività di sintesi va scemando. La zona cicatriziale diviene meno densa e la sua capillarizzazione decresce ed anche la sua matrice perde una certa quota fluida, in questa fase si assiste, in un primo tempo, ad una progressiva sostituzione del tessuto granulare di riparazione da parte del tessuto fibroso e, dalla decima settimana in poi, un'ulteriore sostituzione del tessuto fibroso da parte del tessuto tendineo (Wang, 2006). Anche la quantità di glicosaminoglicani diminuisce lentamente cambiando la propria distribuzione. Il collagene tendineo diviene meno denso nella sua compattazione strutturale e principalmente composto da collagene di tipo I<sup>2</sup>. In sostanza durante quest'ultima terza fase si assiste ad un rimodellamento delle fibre di collagene neo-formate, sino a che queste ultima non vengano a formare una forte struttura permanente (Leadbetter, 1992). La piena maturazione del collagene ed un totale riallineamento delle fibre richiedono usualmente un periodo di 5 o 6 mesi calcolato dall'insorgenza dell'evento lesivo. Verso la fine della fase di rimodellamento i fibroblasti, cessando la loro attività biosintetica, si trasformano in fibrociti. Nonostante questo grosso processo di rimodellamento i deficit biomeccanici e

---

<sup>2</sup> A questo proposito dobbiamo comunque ricordare che molti Autori sottolineano il fatto che a seguito dei processi riparazione il collagene di tipo I viene sostituito da collagene di tipo III e V, meccanicamente più deboli e che possono predisporre il tendine alla rottura meccanica .

biochimici conseguenti all'insulto traumatico possono mantenersi indefinitamente (Leadbetter, 1992; Bisciotti e coll., 2007). La forza tensile del tendine può ridursi di oltre il 30% (Leadbetter, 1992; Bisciotti e coll., 2007). e la struttura di quest'ultimo può presentare difetti nella distribuzione del collagene (con un aumento del collagene di tipo III e V a scapito di quello di tipo I), dell'orientamento delle fibre e del contenuto in acqua, DNA e proteoglicani (Gelberman e coll., 1988). E' interessante notare che un meccanismo comune delle tre fasi appena descritte è rappresentato dal processo di proteolisi. L'attività proteolitica risulta infatti una componente biologica essenziale sia della crescita tissutale che del suo mantenimento, nonché dei suoi processi di adattamento e riparazione. Dopo un evento lesivo la proteolisi diviene quindi necessaria sia per la rimozione della matrice danneggiata che per il rimodellamento dell'area cicatriziale (Everts e coll., 1996).

**Il ruolo dei fattori di crescita nel processo di guarigione del tendine.** I fattori di crescita (GF) rivestono un ruolo molto importante all'interno delle varie fasi del processo di guarigione del tendine, ruolo diversificato in base al loro target d'intervento specifico ed al loro eterocronismo d'azione. La piena comprensione di come e quando i vari GF ed i loro recettori implicati nei processi di riparazione tendinea vengono espressi rappresenterà una futura ed importantissima tappa nella ricerca tesa all'ottimizzazione dei processi di riparazione del tessuto tendineo. Schematicamente possiamo così riassumere il ruolo ed il timing dei vari GF implicati nel corso delle tre tappe del processo di riparazione del tessuto tendineo:

Il Platelet Derived Growth Factor (PDGF) viene prodotto solamente per un breve periodo immediatamente dopo l'evento lesivo, e stimola la produzione di altri GF (Kuroda e coll., 2000 ; Visser e coll., 2010)

Il Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) è attivo durante la fase infiammatoria e quella proliferativa ma riveste un ruolo più importante durante la seconda di dette fasi. Analizzando separatamente le sue tre isoforme possiamo osservare come il TGF-  $\beta$ 1 contribuisca alla sedimentazione della ECM e che una sua sovra-espressione esiti in una formazione di tessuto fibrotico; che il TGF-  $\beta$ 2 agisca in modo molto simile al TGF-  $\beta$ 1 e che infine il TGF-  $\beta$ 3 mostri la capacità di migliorare qualitativamente il tessuto cicatriziale. Il picco di attività dei recettori dell'espressione del TGF-  $\beta$  si registra attorno al 14° giorno post-lesionale, e inizia a decrescere da circa il 56° giorno in poi ( Duffy e coll., 1995; Chang e coll., 1997; . Oryan e Moshiri, 2011)

Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) stimola la proliferazione delle cellule endoteliali, migliora l'angiogenesi ed aumenta la permeabilità capillare. All'interno dell'area lesionata l'espressione del VEGF RNA si può osservare a partire dal 7° giorno post-lesionale, mentre il suo picco si registra attorno al 10° giorno (Bidder e coll., 2000 ; Savitskaya e coll., 2011)

Le isoforme di ossido nitrico sintetasi<sup>3</sup> (NOS) vengono espresse, attraverso diversi patterns di espressione, durante tutte le tre fasi della riparazione tendinea (Chang e coll., 1998).

<b>Periodo</b>	<b>Principali alterazioni cellulari e della matrice osservabili</b>
Immediatamente dopo l'evento lesivo	Preponderante presenza di eritrociti spesso raggruppati sotto forma di piccoli coaguli. Presenza di fibronectina (entro 1 ora) e macrofagi.
24 ore dopo	Presenza di leucociti polimorfonucleati, monociti e macrofagi (anche prima nel caso di rottura meccanica e più tardi nel caso di rottura spontanea).  Inizio della sintesi di acido ialuronico, seguita dalla sintesi di glicosaminoglicani (comunque più tardiva)
4°-5° giorno	Presenza di fibroblasti
Dal 7° giorno in poi	Lenta e progressiva diminuzione dei leucociti e dei macrofagi e dell'attività dei fibroblasti.  Aumento della presenza di fibronectina.

<sup>3</sup> *NO sintetasi è un enzima distribuito quasi in maniera ubiquitaria nei tessuti e nei viventi in generale che provvede a produrre NO a partire dall' arginina che viene trasformata in citrullina (metabolita intermedio del ciclo dell'urea). L'enzima nell'organismo è presente in 2 tipi di isoforme: inducibile e costitutiva. La seconda è localizzata principalmente nell'endotelio vasale e nel cervello, mentre l'inducibile è tipica dei globuli bianchi e viene attivata durante l'infiammazione sia con funzione segnalatoria che battericida*

	<p>Nessuna presenza di pro-collagene prima del 7° giorno.</p> <p>Del 7° giorno in poi inizia la sintesi collagene nelle cellule proliferative dell'epitenonio ma non ancora negli endotenociti.</p> <p>Presenza di miofibroblasti nel tessuto di granulazione</p>
2 <sup>a</sup> settimana	<p>Il tessuto di granulazione diviene più compatto</p> <p>I fibroblasti (tenoblasti) iniziano a mostrare un orientamento secondo l'asse principale del tendine.</p> <p>La sintesi di collagene è molto evidente anche in zone relativamente discoste dalla zona di riparazione.</p> <p>Il collagene neo-formato di tipo III (formatosi nell'area di lesione) inizia ad essere progressivamente sostituito dal collagene di tipo I (formatosi all'esterno dell'area di lesione).</p> <p>Con la sostituzione del collagene di tipo I al quello di tipo III inizia un progressivo aumento della forza tensile del tendine.</p>
4 <sup>a</sup> settimana	<p>Il numero dei fibroblasti, miofibroblasti e capillari inizia a diminuire.</p> <p>Il numero dei macrofagi diminuisce nettamente.</p> <p>Il collagene forma densi pacchetti di fibre</p>
Dalla 4 <sup>a</sup> settimana in poi	<p>Continua la fase di rimodellamento e maturazione che può protrarsi per un periodo</p>



	compreso tra i 4 e gli 11 mesi.
--	---------------------------------

*Tabella 1: schema riassuntivo delle principali alterazioni cellulari e della matrice osservabili in funzione del periodo di riparazione.*

### **I processi di guarigione intrinseci ed estrinseci del tendine**

Alcuni Autori avanzerebbero l'ipotesi che i processi di guarigione del tendine abbiano origine dai due monconi tendinei lesionati. Questa teoria prende il nome di "teoria della guarigione intrinseca". Altri studi invece addebiterebbero la guarigione tendinea alla sola attività cellulare dei tessuti del peritenonio. Questa seconda teoria è conosciuta come "teoria della guarigione estrinseca". Infine, un terzo indirizzo di pensiero è quello che riconosce ai due processi sopramenzionati un ruolo equamente complementare.

#### ***I meccanismi di guarigione estrinseci.***

Già dal 1962 (Potenza, 1962) dimostrò che in un tendine reciso, riparato mediante sutura e quindi immobilizzato, la riparazione avveniva grazie alla formazione di tessuto di granulazione derivato dalle strutture peritendinee a livello delle quali era osservabile un'intensa attività proliferativa. Nel corso di questo processo di riparazione a livello peritendineo, l'Autore osservò che il tessuto tendineo rimaneva inerte ed in seguito a questa osservazione concluse che il tessuto tendineo mancava di qualsiasi capacità ripartiva propria. Per cui la totale mancanza di proprietà autoriparativa del tessuto tendineo dovrebbe far sì che i suoi processi di guarigione si debbano affidare interamente alla formazione di aderenze cicatriziali. Altri Autori ipotizzarono che durante i processi di riparazione tendinea il fenomeno della neo-vascolarizzazione prenda origine principalmente dal paratenonio e dagli altri tessuti peritendinei e che la vascolarizzazione propria del tendine abbia in quest'ambito un ruolo minore (Bergljung, 1968). Anche altri Autori (Takasugi e coll., 1976) suffragarono in seguito questa ipotesi affermando che i processi di riparazione tendinea avvengono attraverso la circostante tenosinovia nella zona in cui le cellule di fibroblasti di rivestimento coprono la lesione del corpo tendineo. Tuttavia un'ovvia osservazione nei confronti di questa affermazione risiede nel fatto che una delle principali cause di fallimento nel recupero della piena funzionalità tendinea in seguito a rottura, è proprio rappresentata dalla formazione di aderenze cicatriziali tra il sito di sutura e le strutture peritendinee (Matthews, 1979). Per cui, il fatto che la

riparazione estrinseca del tendine si basi sulla formazione di aderenze e che nel contempo queste ultime limitino fortemente il pieno ripristino dello scorrimento tendineo, rappresenterebbe di per sé un ossimoro (Mass e Tuel, 1991). In effetti, dal momento che la piena funzionalità di un tendine dipende largamente dalla sua capacità di scorrimento, molto spesso occorre rimuovere chirurgicamente le aderenze peritendinee formatesi. Nel caso specifico del tendine di Achille occorre ricordare che, dal momento che esso presenta una ridotta ampiezza di movimento, l'eventuale formazione di aderenze non limita in maniera drammatica la sua funzionalità, come invece avviene nel caso dei tendini delle dita della mano che, al contrario, presentano un'ampiezza di movimento molto più ampia (Williams e coll., 1980; Schneider, 1987).

### ***I meccanismi di guarigione intrinseci***

Ancor prima degli studi di Potenza (1962), Wheeldon (1939) riferì di come utilizzando una membrana di cellophane per ricostruire la guaina di scorrimento dopo sutura del tendine dell'estensore lungo del pollice, ottenne una piena guarigione anatomica del tendine ed una totale ripresa della sua funzionalità senza incorrere nella formazione di aderenze peritendinee. Ulteriori studi confermarono poi le capacità di riparazione intrinseca del tessuto tendineo, sia su rottura di tendini flessori su modello umano (Matthews, 1979; Mass e Tuel, 1991) che su modello animale in vivo ed in vitro (Lunborg, 1976; Lunborg e coll., 1980; Manske e coll., 1984; Abrahamsson e coll., 1989a; Abrahamsson e coll., 1989b). Tutti questi studi dimostrano le capacità intrinseche di guarigione da parte del tendine, sia in vivo che in vitro, basandosi su sperimentazioni che prevedevano, durante il processo di riparazione tendinea, l'esclusione di tutti i possibili apporti cellulari esterni come la circolazione e l'influenza del liquido sinoviale. In tale situazione la fagocitosi avviene attraverso la trasformazione dei fibroblasti dell'epitenonio, mentre la sintesi di collagene è principalmente svolta dalle cellule dell'endotenonio, la cui migrazione nel sito della lesione tendinea è stata osservata anche nel modello in vivo (Lindsay e Thomson, 1960; Gelberman e coll., 1983). In tutti i modelli studiati l'apporto nutritivo necessario ai processi di guarigione tendinea è fornito dal fluido sinoviale, e la riparazione stessa avviene senza la formazione di aderenze. Nella normale pratica clinica, al contrario la lisi delle aderenze tendinee si rende necessaria nel 20-30% dei casi (Schneider, 1987). La diatriba tra i sostenitori dei meccanismi di riparazione estrinseche e quelli intrinseci può sostanzialmente dirimersi abbracciando l'ipotesi che il microcircolo intratendineo e la produzione di fluido sinoviale viene preservata grazie al tipo di tecnica chirurgica adottata e, se nel contempo, il tendine lesionato viene mobilizzato precocemente

(compatibilmente ai suoi processi di riparazione), i tenociti sono in grado di esprimere geneticamente un programma di autoriparazione e quindi dar vita ad un processo di riparazione intrinseca. Se invece, l'apporto nutrizio del tendine, in seguito alla riparazione chirurgica, risulta jeopardizzato i meccanismi di riparazione estrinseca possono prevalere su quelli di riparazione intrinseca, soprattutto se a questo quadro si aggiunge un eccessivo periodo d'immobilizzazione del tendine stesso (Lundborg e Rank, 1987; Fenwick e coll., 2002), anche se occorre ricordare a questo proposito che i precisi effetti della stimolazione meccanica su di un tendine in via di riparazione su modello umano non sono del tutto chiariti (Aspenberg, 2007). I

### **Le basi molecolari della neo-formazione del tendine**

Sebbene nessun markers della morfogenesi tendinea sia stato indicato come potenziale target dei processi di neoformazione del tendine stesso, esiste qualche evidenza sul fatto che tale processo possa essere influenzato dall'attivazione di fattori specifici. I fattori su cui è reperibile maggior documentazione in quest'ambito sono i GDFs (Growth and Differentiation Factors) ed il Scx (Scleraxis)<sup>4</sup>. I CDFs rappresentano un sottogruppo della superfamiglia TGF- $\beta$ /BMP<sup>5</sup> superfamily e vengono secreti sotto forma di peptidi maturi che formano omo od etero dimeri<sup>6</sup> (Herpin e coll., 2004). Inizialmente alcuni studi mostrarono come il GDF5, il GDF6 ed il GDF7 fossero, in un modello murino, implicati nei processi di osteogenesi attraverso i processi di ossificazione endocondrale, ossia la formazione ossea che ha inizio con la condensazione delle cellule mesenchimali (Chang e coll., 1994; Storm e coll., 1994). I primi studi che identificarono nel GDF5 un marker dello sviluppo delle articolazioni in un modello murino risalgono al 1996 (Storm e Kingsley, 1996), in queste sperimentazioni gli Autori dimostrarono come il GDF5 fosse necessario e sufficiente al processo di sviluppo cartilagineo su modello animale. Sempre su modello murino è stato recentemente dimostrato il ruolo del GDF5 nella formazione tendinea su soggetti che

---

<sup>4</sup> *La proteina scleraxis (Locus: Chr. 8 q24.3) è un membro della superfamiglia di fattori di trascrizione basic-helix-loop-helix (bHLH). Viene espressa nei tendini maturi e nei legamenti degli arti e del tronco ma anche nei loro progenitori. Il gene che codifica per Scx è espresso in tutti i tessuti connettivali che mediano il collegamento del muscolo alla struttura ossea, oltre che nei loro progenitori che si trovano nel mesenchima primitivo*

<sup>5</sup> *TGF- $\beta$ /BMP: Transforming Growth Factor  $\beta$  – BMP: Bone Morphogenetic Protein.*

<sup>6</sup> *Un dimero è una molecola formata dall'unione di due subunità (dette monomeri) di identica natura chimica (omodimero) oppure di natura chimica differente (eterodimero).*

presentavano anomalie tendinee, come ad esempio uno sviluppo insufficiente del tendine rotuleo, dovute ad alterazioni strutturali del collagene (Mikic, 2004). Ancora più recentemente (Harada e coll., 2007) è stato osservato, su modello murino ed in soggetti che presentavano una deficienza di GDF5, un incompleto sviluppo dei condili femorali e dei legamenti intra-articolari del ginocchio. A questo proposito è interessante osservare che nei soggetti studiati si è potuta rilevare una massiccia ed eccessiva apoptosi di cellule mesenchimali nell'area di sviluppo dell'articolazione del ginocchio. Tuttavia, entrambi questi studi dimostrano con sufficiente evidenza il ruolo svolto dal GDF5 nello sviluppo delle articolazioni, altrettanto non si può dire per ciò che riguarda la morfogenesi dei tendini. Bisogna però ricordare che uno studio di Wolfman e coll. (1997) aveva già dimostrato che l'espressione del GDF5, GDF6 e GDF7 umano in siti ectopici di animali adulti, induceva la formazione di tessuto connettivo ricco di collagene di tipo I simile alla neoformazione di tessuto tendineo e legamentoso. Inoltre, sempre Wolfman e coll. (1997) osservarono che il co-impianto, intramuscolare o sottocutaneo di GDF5, GDF6 e GDF7 con BMP-2 induce la formazione di un tessuto contenente contestualmente tessuto osseo e tendineo, suggerendo in tal modo che i GDFs esplicano un effetto tenogenico anche in presenza di BMP-2 ed in condizioni osteogeniche. Anche altri studi più attuali (Dines e coll., 2007) avvallano l'ipotesi che i GDFs abbiano, su modello animale adulto, un effetto di stimolo sulla rigenerazione e la neo-formazione del tendine oltre che nella morfogenesi tendinea nel modello animale in via di sviluppo. La somministrazione di GDF5 umano ricombinante (rhGDF5) nel sito di lesione di un tendine suturato in un modello murino, induce un significativo miglioramento dei processi di guarigione, che esitano in una maggior forza tensile ed in un'accresciuta stiffness del tendine stesso comparato con il controlaterale ugualmente reciso e suturato ma che non abbia ricevuto la somministrazione di rhGDF5 (Dines e coll., 2007). Per poter ottenere un effettivo miglioramento dei tessuti molli lesionati attraverso la somministrazione di fattori di crescita (come ad esempio il GDF5 nel caso del tessuto tendineo), un punto cruciale è rappresentato dalla piena comprensione di tutta quella sequenza temporale di eventi che avvengono durante i processi di guarigione naturali dei vari tipi di tessuto considerati. Nel caso specifico del tendine, quando quest'ultimo subisce una lesione strutturale, si assiste alla formazione di un ematoma nel sito lesionale che funge da matrice per la successiva invasione da parte delle cellule mesenchimali che, come sappiamo, svolgono un ruolo determinante nei processi di riparazione tissutali (Aspenberg, 2007). La somministrazione iniettiva di GDFs all'interno dell'ematoma durante la sua fase di formazione è stata considerata da alcuni Autori come un promettente approccio terapeutico in grado di migliorare i processi di riparazione tendinea (Aspenberg e Forslund). La somministrazione di GDF5 transgenico attraverso un vettore adenovirale nel sito di rottura del tendine di Achille su modello murino, esita in una migliore

riparazione tendinea in termini di calibro e forza del tendine riparato se comparato al controlaterale che non abbia ricevuto la somministrazione di GDF5 (Rickert e coll., 2007). E' tuttavia importante sottolineare il fatto che gli Autori, durante detta sperimentazione, osservano un abnorme proliferazione di tessuto cartilagineo all'interno del tessuto di riparazione tendineo formatosi, fatto che sta ad indicare una possibile perturbazione dei processi riparativi da parte del GDF5. Ciò che, in ogni caso, si può desumere dai vari studi reperibili sull'argomento, è che il GDF5 può essere considerato come un ragionevole candidato per ciò che concerne la neoformazione tendine ed il possibile miglioramento dei processi tendinei di riparazione. Malgrado ciò, il fatto che il GDF5 in vivo possa indurre una neo formazione ossea e cartilaginea, potrebbe di fatto impedirne l'utilizzo come fattore di rigenerazione tendinea (Hotten e coll., 1996; Kakudo e coll., 2007). Tuttavia, siccome gli effetti dei GDFs sono, nel modello murino, di tipo dose-dipendenti (300 µg di rhGDF5 inducono una formazione ossea e cartilaginea mentre 500 µg provocano solo una formazione ossea), è forse possibile che una fine regolazione del dosaggio possa essere la chiave di soluzione del problema, permettendo di ottenere un miglioramento del tessuto tendineo in via di guarigione escludendo la formazione di altri neo-tessuti indesiderati. Oltre ai GDFs numerose ricerche indicherebbero anche la Scx come una possibile molecola marker dei processi di neoformazione tendinea. La proteina Scx (Scleraxis - Locus: Chr. 8 q24.3) è un membro della superfamiglia di fattori di trascrizione basic-helix-loop-helix (bHLH) e viene espressa nei tendini maturi e nei legamenti degli arti e del tronco ma anche nei loro progenitori. Il gene che codifica per Scx è espresso in tutti i tessuti connettivali che mediano il collegamento del muscolo alla struttura ossea, oltre che nei loro progenitori che si trovano nel mesenchima primitivo. Scx è il miglior marker della morfogenesi tendinea e vi sono crescenti evidenze sul fatto che possa ricoprire lo stesso ruolo anche per ciò che riguarda i processi di neoformazione del tendine. Come già detto Scx è un fattore di trascrizione bHLH (Kadesch, 1993) e può legarsi alle sequenze di DNA contenenti la "E-box"<sup>7</sup>

---

<sup>7</sup> Un E-box è una sequenza di DNA che si trova di solito a monte di un gene in una "promoter region".

consensus sequence<sup>8</sup> attraverso il suo motivo bHLH<sup>9</sup> (Murre e coll., 1989). Durante l'embriogenesi del modello murino la trascrizione del Scx è osservabile sia nelle zone di formazione dei progenitori tendinei, che nel somite<sup>10</sup> dei progenitori tendinei stessi chiamato sindetoma (Brent e coll., 2003). L'analisi di sequenza del Scx mostra la presenza di tutti gli aminoacidi che caratterizzano la famiglia bHLH (Cserjesi e coll., 1995); tuttavia altri residui delle regioni di base sono diversi rispetto agli altri fattori di trascrizione bHLH, suggerendo in tal modo che Scx lega per uno specifico gruppo di E-box (Cserjesi e coll., 1995). Quindi nonostante il fatto che nei progenitori tendinei od in altre strutture, come osso e cartilagine, nelle quali sia richiesta un'importante formazione di collagene di tipo I e II, si possano osservare alti livelli di trascrizione di Scx, il ruolo di quest'ultimo sembrerebbe limitato alla funzione di progenitore tendineo (Brent e coll., 2003). Scx viene espressa in siti anatomici simili ma non sovrapponibili a quelli in cui si osserva l'espressione di MyoD<sup>11</sup> che determina la morfogenesi muscolare. Questo suggerirebbe che Scx agirebbe nell'ambito dello sviluppo tendineo in stretta associazione col fenomeno dello sviluppo muscolare ma senza sovrapporsi all'azione del MyoD (Brent e coll., 2003). Questo rappresenta un aspetto importante della ricerca nell'ambito di fattori che possano migliorare i processi di guarigione tendina, in quanto è ovvio che la scelta debba necessariamente ricadere su di target molecolare che non implichi nel contempo la neoformazione muscolare.

---

<sup>8</sup> In biologia molecolare e bioinformatica, una "consensus sequenze" (sequenza di consenso) si riferisce al più comune aminoacido o nucleotide in una posizione particolare dopo più sequenze allineate.

<sup>9</sup> I fattori regolatori miogenici sono dei fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia "basic helix-loop-helix" (bHLH), in quanto contengono un dominio basico coinvolto nel legame al DNA ed un dominio HLH necessario per formare omodimeri o eterodimeri con altre proteine contenenti domini HLH. Il motivo bHLH è presente in molti fattori trascrizionali sia espressi ubiquitariamente che in maniera tessuto-specifica.

<sup>10</sup> Somite: [dal greco soma, corpo+-ite]. In embriologia, ciascuno dei segmenti in cui si suddivide la parte dorsale del mesoderma (o epimero), a destra e a sinistra della corda dorsale. I somiti danno origine a elementi che formeranno il derma della cute del tronco (dermatomi), alle masse muscolari (miotomi) e allo scheletro assile (sclerotomi). Ogni somite è connesso al mesoderma insegmentato, posto ventralmente, da un peduncolo (peduncolo del somite). Nella zona caudale dell'embrione il mesoderma è costituito da una massa cellulare dalla quale hanno origine nuovi somiti per cui l'embrione può gradatamente allungarsi. Per alcuni embrioni l'età si indica con il numero dei somiti (per esempio embrione umano e del pollo).

<sup>11</sup> Il gene MyoD codifica un fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione del muscolo, in particolare induce i fibroblasti a differenziare in mioblasti

Sebbene molti studi dimostrino un ruolo attivo della Scx nella morfogenesi tendinea non vi è ancora evidenza del fatto che quest'ultima possa indurre anche il fenomeno di neoformazione del tendine. Scx lega alla sequenza di E-box consensus come un eterodimero con E12 (un membro della famiglia delle proteine E che eterodimerizza con le proteine bHLH e si lega al DNA per regolare l'espressione genica). Inoltre, singolarmente Scx è un potente transattivatore dell'espressione genica (Cserjesi e coll., 1995). Uno studio di Léjard e coll. (2007) dimostra come Scx regoli l'espressione del gene codificante per il collagene di tipo I nei fibroblasti del tendine, ossia il COL1A1. In un recente esperimento effettuato su topi omozigoti mutanti per un allele Scx non valido (*Scx*<sup>-/-</sup> mice) si è potuta osservare una forte perturbazione dei processi di differenziazione e di formazione tendinea (Murchison e coll., 2007). La severità della perturbazione dei processi di differenziazione e di formazione tendinea si presentava molto variabile, raggiungendo in alcuni casi un vero e proprio fenomeno di distruzione, mentre in altri l'unità tendinea rimaneva sostanzialmente intatta. Questo studio quindi avallerebbe le osservazioni effettuate precedentemente da Léjard e coll. (2007) e confermerebbe il fatto che Scx attiverrebbe l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo tendineo anche se l'esatta funzione di tali meccanismi rimane, per ora, sconosciuta. Per cui potremmo concludere che il fattore di trascrizione bHLH Scx può a tutti gli effetti essere considerato come un importante marker della neo-formazione tendinea; per cui il suo coinvolgimento nei processi di neo-formazione avallerebbe anche l'ipotesi che Scx una volta attivato sarebbe in grado d'indurre la rigenerazione del tessuto tendineo, anche se tale affermazione manca ad oggi di una sufficiente evidenza.

## **Conclusioni**

I processi di riparazione tendinea, anche se ricalcano a grandi linee quelle che sono le tappe della riparazione del muscolo scheletrico, mantengono una loro specificità, differenziandosi dal modello muscolare sotto numerosi e non sottovalutabili aspetti. Ad esempio i meccanismi di guarigione intrinseci e d'estrinseci rappresentano una peculiarità dei meccanismi di riparazione tissutale del tendine che non trovano analogia nei processi di guarigione del muscolo scheletrico. Per questo motivo l'iter riabilitativo di un tendine lesionato si presenta del tutto diverso da quello applicabile nel caso di lesione muscolare. Anche i processi di neo-formazione tendinea nell'adulto rivestono un'importanza fondamentale soprattutto in considerazione del fatto che una loro ottimizzazione potrebbe risolvere l'annoso problema della guarigione del tessuto tendineo, problema ad oggi non ancora completamente risolto. La perfetta guarigione del tessuto tendineo richiede una sequenziale e coordinata espressione di numerose molecole e GF, ognuna responsabile di un ben specifico e

distinto e processo. Nell'ultima parte di questo lavoro abbiamo preso in considerazione le molecole che si presentano come le candidate potenzialmente più valide all'attivazione dei processi di neoformazione del tessuto tendineo. A questo proposito sembrerebbe possibile che l'utilizzo di GDFs ricombinante potrebbe essere approvato per l'uso clinico nel trattamento delle rotture tendinee (Aslan e coll., 2008). Anche l'Scx mostrerebbe un interesse applicativo in questo senso, anche se dovrebbe essere utilizzato attraverso un approccio di gene-terapia (il più probabile dei quali sembrerebbe essere l'utilizzo di vettori non-virali), dal momento che un'applicazione extracellulare della proteina non genererebbe nessun effetto in situ (Aslan e coll., 2008). Tuttavia, in quest'ambito sono ancora necessari ulteriori ed approfonditi studi che evidenzino la caratterizzazione dei fattori ottimali adatti ad indurre la neoformazione di tessuto tendineo in vari modelli di rottura tendinea e di tendinopatia.

## **Bibliografia**

- Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Segmental variation in microstructure, matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1989b;23(3):191-198.
- Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Tendon healing in vivo. An experimental model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1989a;23(3):199-205.
- Aslan H, Kimelman-Bleich N, Pelled G, Gazit D. Molecular targets for tendon neof ormation. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):439-44.
- Aspenberg P., Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop. Scand.* 1999; 70:51-54
- Aspenberg, P. 2007. Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A minireview. *Int. Orthop.* 31:783-789.
- Bergljung L. Vascular reactions after tendon suture and tendon transplantation. A stereomicroangiographic study on the calcaneal tendon of the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1968;4:7-63.
- Bidder M, Towler DA, Gelberman RH, Boyer MI: Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor at the repair site of healing canine flexor tendon. *J Orthop Res.* 2000; 18:247-252.
- Bisciotti GN. Le lesioni muscolari. Calzetti e Mariucci (eds). Perugia, 2010.
- Bisciotti GN., Capellu M., Hidalgo J et al. Comparison of stiffness resulting from different surgical methods of repair of Achilles tendon rupture. *Min. Ort Traum.* 2007; 58 (2): 107-114.
- Brent AE., Schweitzer R., Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell.* 2003, 113:235-248.



- Chang J, Most D, Stelnicki E, Siebert JW, Longaker MT, Hui K, Lineaweaver WC: Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 100:937-944.
- Chang J, Most D, Thunder R, Mehrara B, Longaker MT, Lineaweaver WC: Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg Am.* 1998; 23:1052-1058.
- Chang, S.C. Cartilage-derived morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:28227–28234.
- Cserjesi P., Brown D, Ligon KL., Lyons GE., Copeland NG., Gilbert DJ., Jenkins NA., Olson EN. Scleraxis: a basic helixloop- helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development.* 1995; 121:1099–1110.
- Dines, J.S., et al. The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model. *J. Shoulder Elbow Surg.* 2007; 16:S204–S207
- Duffy FJ Jr, Seiler JG, Gelberman RH, Hergrueter CA: Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg Am.* 1995; 20:645-649.
- Enwemeka CS. Inflammation, cellularity, and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation. *Phys Ther.* 1989 Oct;69(10):816-25
- Everts V., Van der Zee E., Creemers L., Beertsen W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodeling. *Histochem J.* 1996; 28: 229-245.
- Fenwick SA., Hazleman BL., Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Research.* 2002; 4(4): 252-260.
- Garner WL, McDonald JA, Koo M, Kuhn C 3rd, Weeks PM. Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendons. *Plast Reconstr Surg.* 1989 May;83(5):875-879.
- Garret WE., Lohnes J. Cellular and matrix response to mechanical injury at the myotendinous junction. In: Leadbetter WB., Buckwalter JA., Gordon SL (eds). *Sport induced Inflammation..* Pp: 215-224. AAOS. Park Ridge, 1990.
- Gelberman RH, Vandeberg JS, Manske PR, Akeson WH. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the first fourteen days. *J Hand Surg Am.* 1985 Nov;10(6 Pt 1):776-84.
- Gelberman RH., An KA., Banes A., Goldberg V. Tendon. In: Woo Sl., Buckwalter JA (eds) *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissue.* AAOS. Pp. 1-40. Ark Ridge, 1988.
- Gelberman RH., Vandeberg JS., Manske PR., Akesn WH. Flexor tendon healing and restoration of the gliding surface. An ultrastructural study in dogs. *J Bone Joint Surg (Am).* 1983; 65: 70-80.
- Harada, M., et al. Developmental failure of the intra-articular ligaments in mice with absence of growth differentiation factor 5. *Osteoarthr. Cartil.* 2007; 15:468–474.
- Herpin, A., Lelong, C., and Favrel, P. 2004. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.* 28:461–485.

- Holch M., Biewener A., Thermann H., Zwipp H. Non-operative treatment of acute Achilles tendon ruptures: A clinical concept and experimental results. *Sport Exerc Injury*. 1994; 1: 18-22.
- Hotten GC., et al.. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors*. 1996; 13:65–74.
- Houglum PA. Soft tissue healing and its impact on rehabilitation. *J Sport Rehab*. 1992; 1. 19-39.
- Józsa LG., Kannus P. Healing and regeneration of tendon. In: *Human Tendons: Anatomy, Physiology and Pathology*. Human Kinetics (Ed). Champaign 1997; 526-554.
- Józsa LG., Kannus P. *Humans Tendon. Anatomy, Physiology an Pathology*. Human Kinetics (eds). Champaign, 1997.
- Józsa LG., Lehto M., Kannus P., Kvist M., Vieno T et al. 1989<sup>o</sup>; Fibronectin an laminin in Achilles tendon. *Acta Orthoped Scand*. 1989a; 70-469-471.
- Kadesch T. Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ*. 1993; 4:49–55.
- Kakudo N., Wang Y.B., Miyake S., Kushida S., Kusumoto K. Analysis of osteochondroinduction using growth and differentiation factor-5 in rat muscle. *Life Sci*. 2007; 81:137–143.
- Katenkamp D, Stiller D, Schulze E. Ultrastructural cytology of regenerating tendon--an experimental study. *Exp Pathol (Jena)*. 1976;12(1):25-37
- Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K: Localization of growth factors in the reconstructed anterior cruciate ligament: immunohistological study in dogs. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2000; 8:120-126.
- Leadbetter WB. Anti-inflammatory therapy and sport injury: The role of non steroidal drugs and corticosteroidal injection. *Clin Sport Med*. 1995; 14: 353-410.
- Leadbetter WB. Cell-matrix response in tendon injury. *Clin Sport Med*. 1995; 14: 353-410.
- Léjard V., Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 2007; 282:17665–17675.
- Letho M., Józsa LG., Kvist M., Järvinen M., Bálint BJ., Réffy A. Fibronectin in the ruptured human Achilles tendon and its parate non. An immunoperoxidase study. *Ann Chir Gynaecol*. 1990; 79: 72-77.
- Lindsay WK., Thomson HG. Digital flexor tendons: an experimental study. Part I. The significance of each component of the flexor mechanism in tendon healing. *Br J Plast Surg*. 1960 Jan;12:289-316.
- Lundborg G. Experimental flexor tendon healing without adhesion formation – A new concept of tendon nutrition and intrinsic healing mechanism. *Hand*. 1976; 8: 235-238.
- Lundborg G. Hansson HA., Rank F., Rydevik B. Superficial repair of severed flexor tendon in synovial environment. An experimental ultrastructural study on cellular mechanism. *J Hand Surg. (Am)*. 1980; 5. 451-461.

- Lundborg G., Rank F. tendon healing: Intrinsic mechanism. In: Hunter JM., Schneider LH., Mackin EJ. (eds). Tendon surgery in the hand. St. Louis-Washington- Toronto. Pp. 54-60. Mosby, 1987.
- Maagaard-Mortensen NH., Skov O., Egund N. Regeneration of Achilles tendon after necrosis. *Acta Orthop Scand.* 1994; 258 (Suppl): 65-87.
- Manske PE., Gelberman RH., Vandeberg JS., Lesker AP. Intrinsic flexor-tendon repair. A morphologic study in vivo. *J Bone Joint Surg (Am).* 1984; 66: 385-396.
- Mass DP, Tuel RJ. Intrinsic healing of the laceration site in human superficialis flexor tendons in vitro. *J Hand Surg Am.* 1991 Jan;16(1):24-30.
- Matthews P. The pathology of flexor tendon repair. *Hand.* 1979; 11. 233-242.
- Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32:466–476.
- Murchison N., et al. Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes forcetransmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development.* 2007; 134:2697–2708.
- Murre C. et al.. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989; 58:537–544.
- Okuda Y., Gorski JP., An KN., Amadio PC. Biomechanical, histological and biochemical analyses of canine tendon. *J Orthop Res.* 1987; 5: 60-68.
- Oryan A, Moshiri A. A long term study on the role of exogenous human recombinant basic fibroblast growth factor on the superficial digital flexor tendon healing in rabbits *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2011 Jun;11(2):185-9
- Peacock EE., Van Winkle W. Surgery and biology of wound repair. Philadelphia-London-Toronto. Pp. 331424. Saunders, 1970.
- Potenza AD. Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog: An experimental study. *J Bone Joint Surg (Am)* 1962; 44: 49-64.
- Rickert M., et al. Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon. *Connect. Tissue Res.* 2005; 46:175–183.
- Savitskaya YA, Izaguirre A, Sierra L, Perez F, Cruz F, Villalobos E, Almazan A, Ibarra C. Effect of angiogenesis-related cytokines on rotator cuff disease: the search for sensitive biomarkers of early tendon degeneration. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2011;4:43-53.
- Schneider LH. Flexor tenolysis. In: Hunter JM., Schneider LH., Mackin EJ (eds). Tendon surgery in the hand. Pp. 209-215. Mosby, St Louis-Washington-Toronto, 1987.
- Storm, E., and Kingsley, DM. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development.* 1996; 122:3969–3979
- Storm, EE., Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF-b superfamily. 1994; *Nature.* 368:639–642.

Takasugi H., Inoue H., Akahori O. Scanning electron microscopy of repaired tendon and pseudosheat. *Hand*. 1976; 8: 228-234.

Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech*. 2006;39(9):1563-82.

Wheeldon T. The use of cellophane as a permanent tendon sheath. *J Bone Joint Surg*. 1939; 21: 393-405.

Williams IF, Heaton A, McCullagh KG Cell morphology and collagen types in equine tendon scar. *Res Vet Sci*. 1980 May;28(3):302-10.

Wolfman, NM., et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGFbeta gene family. *J. Clin. Invest*. 1997; 100:321–330.

Zwipp H. Minibattle: Treatment of Achilles tendon rupture. Non operative functional treatment. The second Congress of EFORT, Specialty day of EFFORT. Munich, July 4<sup>th</sup> 1995. Abstract book pg 83.

Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, Egerbacher M. Platelet-rich fibrin constructs elute higher concentrations of transforming growth factor- $\beta$ 1 and increase tendon cell proliferation over time when compared to blood clots: a comparative in vitro analysis. *Vet Surg*. 2010 Oct;39(7):811-7.