

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL EFECTO DEL
TRATAMIENTO CON ONDAS DE CHOQUE EXTRACORPÓREAS
EN TENDINOPATÍAS DEL MANGO ROTADOR EN EL HOMBRE.**

Julián Andrés Ricardo Brañes Fierro

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCION FISIOLÓGIA

Directores de Tesis

Prof. Héctor Contreras Muñoz. PhD.

Dr. Manuel Brañes Aroca.

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JULIAN ANDRES RICARDO BRAÑES FIERRO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Biológicas** con **mención en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 de Marzo de 2011.

Directores de Tesis

Prof. Héctor Contreras Muñoz. PhD.

Dr. Manuel Brañes Aroca.

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Francisco Herrera

Prof. Carlos Infante

Prof. Cleofina Bosco.
Presidente Comisión de Examen

A mi padre, mi esposa y mis hijas
Gracias por su apoyo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Prof. Héctor Contreras M. PhD Universidad de Chile, por su guía y dedicación en el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Manuel Brañes A., por su apoyo e invaluable contribución. Al Dr. Pablo Cabello, tesista doctorado en Ciencias Médicas de la Universidad de Chile, por su valiosa ayuda en la utilización del programa para el análisis de imágenes. A Alejandro Espinoza y Manuel De Orúe, Magísteres en bioestadística de la Universidad de Chile, por su cooperación en el análisis de resultados. Y finalmente, a Luis Contreras y Héctor Arellano, Médicos Patólogos, por su ayuda e interpretación de la histología.

INDICE	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Diseño del estudio	8
2. Paciente	8
3. Histología	9
4. Inmunohistoquímica	10
5. Análisis de Imágenes	11
6. Análisis Estadístico	11
7. Comité Ética	11
RESULTADOS	12
1. Análisis clínico-quirúrgico	12
2. Análisis Histológico	12
3. Análisis de marcadores inmunohistoquímica.	14
3.3.1. Evaluación de angiogénesis: CD14	14
3.3.2. Evaluación de angiogénesis: CD 34	15
3.3.3. Evaluación de Colágeno I	17
3.3.4. Evaluación de Colágeno III	18
3.3.5. Evaluación de linfoangiogénesis: D2-40	19
3.3.6. Evaluación de proliferación celular: PCNA	20
3.3.7. Evaluación de organización tisular: Tenascina C	21

DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	35
REFERENCIAS	36
CONSENTIMIENTO INFORMADO	41
ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO	42

RESUMEN

La Tendinopatía de Hombro es una enfermedad frecuente y de etiología aun desconocida. Ha sido denominado como Tendinopatía al proceso de carácter degenerativo y progresivo, con una alterada capacidad reparativa lo que conduce a rupturas y limitación funcional severa. El concepto de tendinosis corresponde a la definición histopatológica de este proceso que se expresa en el tendón.

La terapia con Ondas de Choque es un tratamiento reciente y no invasivo, que en estudios clínicos está demostrando su utilidad en esta patología, sin embargo, su rol biológico aun no ha sido completamente estudiado.

El objetivo de esta tesis es evaluar el efecto de tratamiento con Ondas de Choque extracorpóreas en tendinopatías del mango rotador en el hombre, mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Se utilizaron biopsias de pacientes con rupturas completas del mango rotador que aceptaron ser tratados con ondas de choque en forma pre-operatoria, los que fueron operados posteriormente, a las 8 semanas de aplicadas las ondas de choque. Se cuantificó la expresión de marcadores de proliferación celular (PCNA), neo-angiogénesis y vascularización (CD14 y CD34), análisis de vasos linfáticos a través de la marcación con D2-40, Colágeno I, Colágeno III y Tenascin-C. El grupo control fueron pacientes portadores de ruptura de mango rotador de indicación quirúrgica, a quienes no se les realizó el tratamiento de ondas de choque pre-operatorio, porque no lo aceptaron.

El análisis histopatológico, confirma para toda la serie, tanto los tratados como los que no recibieron la terapia, los hallazgos descrito para la tendinosis: un tejido desorganizado, con ausencia de células inflamatorias e hipocelularidad progresiva. Los pacientes sometidos a la terapia con Ondas de Choque muestran indicios de un tejido reactivo, con focos espontáneos de reparación tisular, desarrollo de neovascularización, aumento de vasos linfáticos y proliferación celular.

ABSTRACT.

Rotator Cuff Tendinopathy of the Shoulder is a frequent disease at Orthopaedic Medical facilities, but pathophysiology, that encompasses its many clinical variations are incompletely understood. The term "tendinopathy" define a degenerative and progressive character of this ailment that also includes an upset of the healing capabilities of the tendon, with potential for tears of tendon structure and severe functional limitation.

The Extracorporeal Shock Wave Therapy (ESWT) has been recently developed as a treatment for this condition; however its biological role has not been completely studied.

The aim of this Thesis is to evaluate the responses of Rotator Cuff Tendinopathy to ESWT, using Immunocytochemical Techniques as analytic tools. 31 patients with complete rotator cuff tear that deserve a surgical repair were offered to receive, pre-operatively, a single session of ESWT. 10 patients accepted the ESWT and underwent the surgical repair 8 weeks after application; 21 patients did not accept the treatment and underwent surgery according schedule. Routine biopsies were taken in all patients and processed immediately according protocol. Immunocytochemical battery includes PCNA, CD14, CD34, D2-40 (lymphatic marker), Collagen type I, Collagen type III, and Tenascin-C.

Histopathological analysis of entire population demonstrates the tendinopathic character for all samples (disorganized tendon tissue, absence of inflammatory cells and progressive hypo-cellularity). Biopsies from patients that received ESWT are showing reactive tissue foci with healing areas, actives neo-vessels development and augmented cellular proliferation.

INTRODUCCION.

Una de las causas frecuentes de consulta médica espontánea actual, corresponde a pacientes que acusan dolor en el hombro, de inicio insidioso y de carácter progresivo, que no responde a medidas habituales, como reposo o el uso de analgésicos comunes, notando los pacientes un deterioro en su capacidad de movimiento en la articulación afectada y por tanto un menoscabo físico doloroso e importante, el que se mantiene a lo largo de semanas ó más, situación que los lleva a consultar. Esta situación descrita presenta una incidencia internacional que está aumentando progresivamente (1,2) y se asocia al envejecimiento poblacional junto al sobre uso de la estructura en actividades laborales y deportivas; la etiopatogenia de ésta entidad nosológica no está definida y se trabajan distintas hipótesis que la explicarían.

Diversos reportes indican que la condición fisiopatológica de estos pacientes corresponde a una tendinopatía (3, 4, 18, 53), implicando en el término una “condición crónica del tendón afecto, que intenta reparar pero no lo logra, debido a que está implícitamente alterada su microestructura y metabolismo”.

Asimismo, en el concepto subyace la idea de incapacidad de la estructura a cicatrizar, a pesar de los esfuerzos terapéuticos, demostrada por la ineficacia de una serie de medidas médicas para obtener alivio clínico. También se informa, en revisiones clínicas consolidadas, el fracaso progresivo de tratamientos quirúrgicos adoptados, ya sea por el dolor crónico o por la aparición de roturas de espesor parcial ó total del mango rotador, derivadas del mismo daño microestructural; la tasa de re-roturas posterior a la cirugía varía entre el 25 al 90% (5), lo que indica la necesidad de buscar métodos de inducción biológica que aumenten la capacidad de cicatrización del mango rotador.

En los últimos años se aprecia un aumento en los reportes (6, 7, 8), que basados en la mejoría de las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas, intentan explicar en mayor profundidad lo que se puede considerar un tendón sano, en un individuo que naturalmente envejece (considerando metabolismo acorde a la edad); asimismo estos avances permiten comparaciones de las alteraciones progresivas encontradas en tendones tendinósicos y ayudan a definir las características propias de cicatrización de una estructura única , como es el mango rotador en el hombre.

La Clasificación de Riley (47) permite rápidamente categorizar el componente celular y calidad del estroma tendíneo, aunque no hace referencias específicas al componente vascular tendíneo. La clasifica en 4 tipos: I normal, caracterizados por paquetes de fibras de colágeno con un contorno ondulado y por núcleos de tenocitos elongados, con un patrón de cromatina homogéneo, y dispuestos con sus largos ejes paralelos a las fibras de colágeno. El tipo II o degeneración leve, corresponde a las fases iniciales de la tendinopatía, aun con fibras de colágeno alineadas, pero su ondulación es desigual y sus fibras no pueden ser fácilmente identificadas. Los núcleos son más cortos, pero aun ovals, con cromatina más oscura y su disposición es en cadenas cortas con apariencia de “fila india”. El tipo III presenta una degeneración moderada, muestra aumentada hialinización del colágeno con áreas borrosas, aumentada celularidad y los núcleos con formas redondas u ovals. Hay pérdida de la orientación de los paquetes de colágeno y pérdida de la orientación de los núcleos con las fibras. La degeneración severa o tipo IV describe franco compromiso del estroma con hialinización difusa avanzada (que se corresponde con la transformación condroídea) perdida completa de la orientación de las fibras de colágeno. El número de núcleos se observa reducido y los presentes son pequeños oscuros y redondos.

La condición clínica de tendinopatía y su evolución es un problema que no está resuelto, existiendo un amplio campo de investigación y sobretodo en el área terapéutica, la que está derivando en la búsqueda de fortalecer las capacidades intrínsecas remanentes de cicatrización, lo que se puede definir como “medicina regenerativa” (9), basada en terapias celulares (células mesenquimales/stem cells) y su coordinación con los procesos de neoangiogénesis y vasculogénesis post-natal. Estos estudios analizan los factores que están influenciando la respuesta vascular y celular inmediatamente subsiguiente, los que son absolutamente fundamentales para la serie de eventos multifactoriales que desembocan en lo que conocemos como cicatrización tisular.

La terapia con Ondas de Choque originalmente fue utilizada para destruir depósitos de calcio en el cuerpo, especialmente cálculos renales, siendo una técnica no invasiva y muy efectiva. Fue utilizada en patologías musculoesqueléticas por primera vez en 1987, inicialmente en pseudoartrosis y luego en tendinitis cálcica del hombro. Ha mostrado

resultados variables en el tratamiento de tendinitis y tendinosis. Importantes avances en su mecanismo biológico se han realizado, sin embargo aun faltan estudios que expliquen su rol en los procesos degenerativos tendíneos (15, 16, 17).

La Onda de Choque de utilización en clínica es una explosión controlada que produce una onda sónica la cual penetra en los tejidos, transmitida por el componente acuoso corporal y absorbida, ejerciendo así su efecto biológico. Fue definida como una perturbación de presión, transitoria, que se propaga con un aumento repentino por sobre la presión del ambiente. Las ondas son generadas, desde los dispositivos a través de un medio fluido como el agua, y un gel de acoplamiento facilita la transmisión en los tejidos biológicos; la onda genera un estrés tisular y además fuerzas tensiles que causan cavitación (51).

Wang y col. demostraron un aumento significativo de eNOS, VEGF, PCNA y neovasos entre las 4 y 12 semanas, en tejido tendíneo de conejo tratado con ondas de choque. Así la capacidad de reparación tisular estaría dada por una neoangiogénesis, con la consecuente mejora de aporte sanguíneo y una hiper celularidad reparativa (10, 11).

La estimulación con Ondas de Choque en un modelo animal de tendinitis aquiliana inducida, demostró el aumento significativo de TGF- β 1 y IGF-1, fundamentales para la reparación tisular, mediante la regulación del metabolismo del colágeno y la proliferación de tenocitos. Se demostró una mejoría en las propiedades biomecánicas del tendón, encontrándose además que los tenocitos evidenciaron una proliferación celular con aumento de la expresión de PCNA (16).

La angiogénesis es el proceso fundamental para la reparación tisular (22,52) y la célula endotelial requiere, para su desarrollo y establecimiento, de señales como factores de crecimiento y una matriz extracelular que le provea de un soporte (23, 24).

En éste sentido se ha demostrado que la Terapia por Ondas de Choque extracorpóreas son capaces de inducir una respuesta angiogénica que se acompaña de una hiper celularidad con características reparativas (10, 11, 12, 13, 14), cuando son aplicadas a estructuras tendino-esqueléticas dañadas en sus procesos ontológicos de cicatrización espontánea (tendinopatía, retardo y/o no consolidación). Esta misma respuesta reparativa se aprecia en tegumentos con heridas crónicas y en procesos de necrosis óseas espontáneas,

que se resuelven con significativos porcentajes de mejoría inducida, cuando son tratadas con Ondas de Choque (15, 16, 17, 19, 20, 21).

Un análisis acucioso de los trabajos sobre el metabolismo de distintos tendones en fase tendinósica, nos indica que hay respuestas disímiles de sus sistemas enzimáticos frente a la mecanotransducción a la que se ven sometidos (22, 23, 24), lo que en suma, afectan la inducción de la matriz tendínea sobre los procesos angiovasculares de reparación (25,26,31); de esto inferimos que se hace necesario restringir nuestro acceso de datos y fundamentación científica exclusivamente a publicaciones sobre investigaciones en el mango rotador humano (38,39,40,42,43,44,45,46,47,48) y seleccionar los informes sobre modelos animales aceptados como homologables a la condición de tendinopatía del mango rotador en el hombre (34,35,36,37,41). De lo anterior se desprende que no existen trabajos que evalúen el efecto tisular de ondas de choque en tendones de mango rotador humano. Este trabajo pretende analizar los cambios tisulares observables y producidos por las ondas de choque en pacientes con tendinosis de mango rotador.

HIPÓTESIS

La Terapia de Ondas de Choque extracorpórea aplicada en pacientes con patología degenerativa y rotura del mango rotador del hombro, induce un efecto biológico que ayudaría a la reparación del tejido, estimulando la neovascularización y modificando la expresión de moléculas asociadas a estos procesos.

BJETIVO GENERAL

Evaluación inmunohistoquímica del efecto biológico inducido por la terapia de Ondas de Choque extracorpórea, aplicada en forma previa a la cirugía, en una población de pacientes tendinósicos con ruptura del mango rotador del hombro.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar si existe neovascularización inducida por las Ondas de Choque en los tendones del mango rotador afectados por el proceso de tendinosis que desembocó en la ruptura total de los mismos.
2. Evaluar las capacidades reparativas de la hiper celularidad derivada desde la neoangiogénesis inducida, a través de la determinación inmunohistoquímica de marcadores específicos para Colágeno I, Colágeno III, Tenascina C, D2-40, CD14, CD34 y PCNA.
3. Cuantificar las respuestas celulares y moleculares de los marcadores utilizados a través de análisis de imágenes.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Diseño del estudio

Es un estudio Cuasi Experimental, ya que se realizó una exposición determinada en un grupo de individuos que se comparó con otro grupo en el que no se intervino, pero no se realizó aleatorización debido al bajo número de individuos; Transversal y de tipo terapéutico (58).

Pacientes

El material que se trabajó en el presente estudio provino de pacientes atendidos por el Dr. Manuel Brañes A., Traumatólogo, y corresponde a una muestra de 31 pacientes con rupturas sintomáticas del mango rotador. De esta población pacientes, 10 de ellos aceptaron recibir el tratamiento de ondas de choque previamente a la cirugía (protocolo basado en tratamiento ambulatorio, dispositivos Dornier Compact Alpha, Orthospec y Storz Duo-lit, recibieron 4000 pulsos a 0,3 mJ/mm², equivalentes a una FED de 1,200 J/mm² en una sesión, sin anestesia; la cantidad total de energía aplicada fue normalizada para los diferentes dispositivos) (17, 65).

Las observaciones se distribuyen como 18 mujeres, 13 hombres, rango de edad de 48 años a 73 años, con una edad promedio de 61 años. Ningún paciente había recibido tratamiento quirúrgico previo en el hombro y sus molestias se extendían por más de 6 meses sin resultados a diversas medidas conservadoras. El diagnóstico de la condición se obtuvo en todos los casos a través de Ecografías y Radiografías de hombro, definiendo la presencia de tendinosis ecográfica y ruptura del mango rotador para todas ellas, sin alteraciones óseas de otro origen. Los exámenes preoperatorios alterados fueron normalizados por indicación del Anestesta (acción directa e Interconsultas) en las evaluaciones anestésicas pre-quirúrgicas y se procedió a la cirugía con el consentimiento informado de los procedimientos a realizar y de los métodos a aplicar a las biopsias obtenidas. En el intra-operatorio todos los pacientes mostraron ruptura de espesor completo

del mango rotador y se procedió a su reparación a través de una excisión completa y en bloque del borde libre de la ruptura más 2 a 3 mm. de tejido medial, muchas veces con aspecto macroscópico de daño estructural (adelgazamiento y/o esfacelo); asimismo se prepara un lecho óseo de reinsertación en el troquíter de +/- 5x7x2 mms. , (Ancho x largo x profundidad) lugar donde se reinsertará el tendón liberado/movilizado y preparado, reproduciendo sin modificaciones la técnica quirúrgica descrita por los Dr. Charles S. Neer y L. U. Bigliani, Shoulder Service, Columbia Presbyterian Medical Center, New York (49, 50).

El material derivado de ambas acciones se colocó en recipientes conteniendo solución de formalina buffer preparada y se envió de inmediato al Departamento de Histopatología para su procesamiento. Todas las biopsias fueron informadas por Patólogos (L.C.M. y L.A.H.) y se reservó una copia del informe junto a los tacos con el material fijado para utilización posterior.

Histología

Las 31 biopsias fueron procesadas con las técnicas habituales para tinción con Hematoxilina-Eosina y se estudiaron en forma exhaustiva bajo microscopio de luz (Nikon-Eclipse E200) para determinar las características microscópicas de estructura tendínea (matriz) y células constituyentes según la clasificación de Riley, al tiempo que objetivar los detalles de los focos de vascularización y/o reparación tisular que pudiesen estar presentes como una respuesta espontánea de cicatrización ó inducida después del tratamiento de Ondas de Choque. Se obtuvieron 3 (objetivo x10) microfotografías de las áreas mencionadas, a objeto de tener una base gráfica de análisis histopatológico, la que fue posteriormente revisada por Patólogo (L.A.H.).

Inmunohistoquímica.

El protocolo utilizado fue el siguiente (Contreras y col, 2009): primero se desparafinó e hidrató los cortes hasta el agua destilada. Luego se realizó recuperación de sitios antigénicos: se colocó los cortes en recipiente de vidrio con tapa y se cubrió con líquido de recuperación (Target Retrieval) durante 20 minutos en vaporera y luego 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en buffer PBS, 3 lavados. Posteriormente se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena: Incubación con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol x 15 min. en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Se lavó en PBS (3x). Luego se realizó bloqueo de sitios de unión inespecífica: Incubación con suero no inmune x 10 min. a temperatura ambiente y en cámara húmeda. (54, 55)

Luego se incubó con el anticuerpo primario durante 48 hrs. a 4° C. Los anticuerpos primarios monoclonales que se utilizaron se describen en la tabla 1 con sus respectivas diluciones utilizadas:

<i>Anticuerpo anti CD 14 (5A3B11B5), (1:500) (Santa Cruz Biotechnology sc-58951)</i>
<i>Anticuerpo anti CD34 (43A1) (1:100), (Santa Cruz Biotechnology sc-65261)</i>
<i>Anticuerpo anti Colágeno I (1: 500), (Affinity Bioreagents PAI-85319)</i>
<i>Anticuerpo anti Colágeno III (1: 250), (Affinity Bioreagents PAI-85323)</i>
<i>Anticuerpo anti PCNA (PC11) (1:100), (Santa Cruz Biotechnology sc-53407)</i>
<i>Anticuerpo anti D2-40 (1:100) (Affinity Bioreagents MA1-83884)</i>
<i>Anticuerpo anti Tenacina C (2Q568) (1:100) (Santa Cruz Biotechnology sc-73139)</i>

Tabla 1. Anticuerpos utilizados y diluciones.

Posteriormente se lavó en PBS (3x) y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado: Inmunoglobulinas biotiniladas en una dilución 1:600 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en PBS (3x). Se incubó con el conjugado Avidina-peroxidasa: en una dilución de 1:600 x 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en PBS (3x). Se incubó con solución sustrato-cromógeno DAB: durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó en agua destilada y se realizó tinción nuclear con Hematoxilina de Harris por 3 a 5 segundos.

Finalmente los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados en Eukit®. Luego fueron observados en microscopio Olympus®, y fotografiados (10 microfotografías a 40x) con cámara Digital E500 y procesados con sistema de captura computacional de imágenes (Image Pro-Plus v.6.2).

Análisis de Imágenes

Se analizaron las muestras mediante el software Image Pro-Plus v.6.2, para un análisis cuantitativo de la intensidad y cantidad de marcación tisular.

El protocolo utilizado fue el siguiente: se utilizaron las 5 microfotografías más representativas para ser procesadas. El canal de DAB fue extraído mediante el método de deconvolución de colores integrado en Image J (NIH) según el algoritmo de Ruifrok y Johnston (56). Las imágenes obtenidas se transformaron a imagen en escala de grises de 8 bits con Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics, Bethesda, MD) para la cuantificación del área de tinción positiva (AT) en μm^2 y la densidad óptica integrada (DOI). Se calculó la intensidad de tinción como $IT=DOI/AT$, obteniéndose el promedio con desviación estándar para cada serie.

Análisis estadístico

El análisis fue desarrollado en Stata v.11.1. Para comparar las diferencias entre los valores medios de los marcadores del grupo casos y del grupo control, fue desarrollado el método de *análisis de varianza para medidas repetidas*, siendo las distintas lecturas consideradas como medidas repetidas. Se consideró como significativo un valor $p<0.05$. Se realizó una comparación visual de las medias con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (CI 95%) entre los casos y controles para cada uno de los marcadores usados.

Comité ética

El estudio cuenta con la aprobación ética para su realización por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

Análisis clínico-quirúrgico.

Los 31 pacientes intervenidos evolucionaron en el post-operatorio inmediato en forma adecuada, no registrándose variaciones observables para los que recibieron la terapia de Ondas de Choque. No hubo casos de retardo de cicatrización de herida quirúrgica como así tampoco casos de infección superficial ó profunda. Los controles de seguimiento a 6 meses postoperatorios tampoco mostraron diferencias entre ambas poblaciones, cumpliendo todos sin problemas, la rehabilitación post-cirugía. Durante el seguimiento no se presentaron pérdidas.

No se observaron cambios macroscópicos en los planos quirúrgicos de los pacientes sometidos a Ondas de Choque comparándolo con los que no han recibido el tratamiento. En el período de seguimiento post-operatorio, no se observaron diferencias en los tiempos de cicatrización considerados habituales ó en los tiempos de rehabilitación posterior. No se han presentado complicaciones en la serie estudiada hasta el momento.

Análisis Histológico.

La evaluación histológica del tejido tendíneo de estos pacientes con historia clínica de tendinopatía crónica y operados por ruptura completa del mango rotador con grave insuficiencia funcional del hombro, muestra un tejido desorganizado, con ausencia de células inflamatorias e hipocelularidad, ausencia de fibras colágenas paralelas, siendo reemplazadas por zonas sin orden y amorfas asociada a microrrupturas del tejido.

Podemos agregar que aquellos clasificados como tipo III de Riley, presentaron junto a microrrupturas de la matriz, focos de neo-angiogénesis defectuosa observado por el mal desarrollo de pericitos que ayuden a estabilizar el vaso y además focos de micro-hemorragias los que no desarrollan una fase inflamatoria normal (fig. 1).

Las muestras se distribuyeron según la clasificación de Riley en tipo III y tipo IV, resultando en el grupo control a 13 observaciones tipo III y 8 tipos IV, y para el grupo casos hubo 9 observaciones tipo III y 1 del tipo IV. No se evidenció lesiones grados II de Riley.

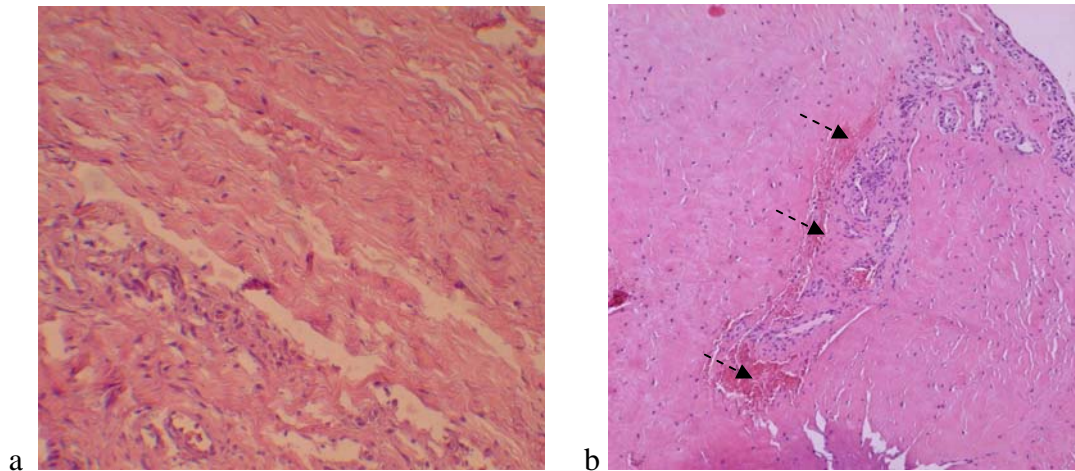


Figura 1: Microfotografía de tendón de mango rotador, tendinosis moderada tipo III de Riley. (a) Se observan microrupturas y desorganización de matriz (H-E, 10x). (b) Neoangiogenesis defectuosa con microhemorragias (flechas discontinuas) (H-E 10x).

En el tipo IV de Riley se observa un progresivo componente condroideo, el que no permite ningún tipo de neovascularización y asimismo se observa con disminuida celularidad y vascularidad. La revisión de nuestro material histopatológico enfocada en los aspectos morfológicos de la neo-angiogenesis, ha mostrado una forma "nodular" que se expresa como racimos de vasos activos principalmente y en un ambiente de alto número de pericitos y células ovals circundantes. Como rasgo distintivo éstos nódulos no muestran microhemorragias y se disponen de preferencia en las áreas endotendíneas y subsinoviales, siendo encontradas muy escasamente en el estroma tendíneo. Los nódulos muestran un alta celularidad en base a células grandes, poligonales, que salen desde los neovasos y migran hacia el estroma; estas células no se corresponden con fibroblastos y su origen requiere de una mejor caracterización en base a técnicas inmunohistoquímicas (fig. 2).

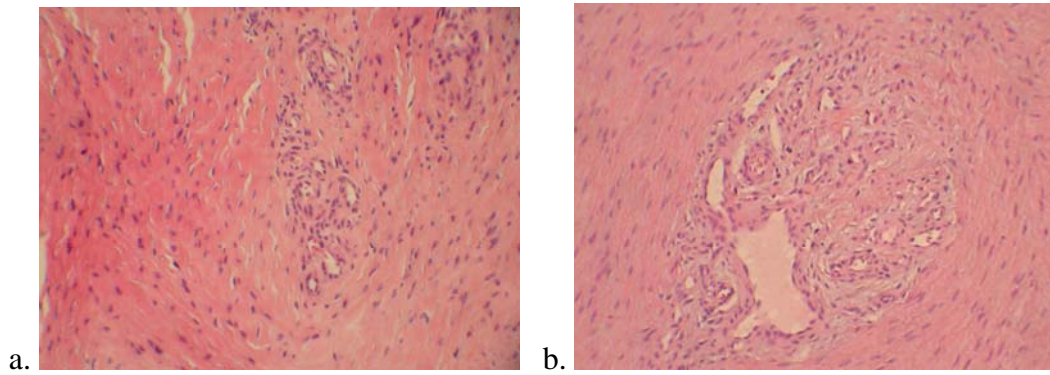
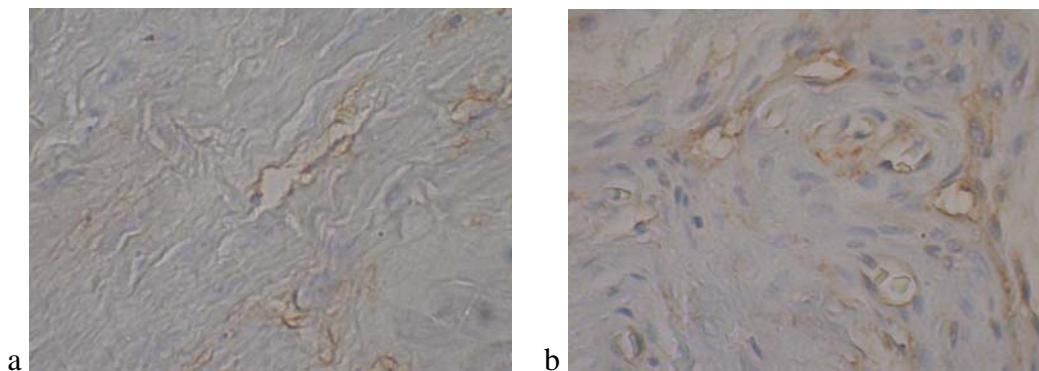


Figura 2: (a) Microfotografía de tendón de mango rotador, serie control, foco de "neovascularización nodular" con mayor número de células poligonales que invaden el estroma y se alinean en el sentido de las fibras de colágeno nativo (H-E, 10x). (b) Microfotografía de tendón de mango rotador, de la serie casos, mostrando un foco similar, donde los neo-vasos muestran mayor celularidad y no se observan microhemorragias (H-E, 10x).

Análisis de marcadores inmunohistoquímica.

Anticuerpo CD14

El anticuerpo anti CD 14, es un marcador de superficie de monocitos. Su población en sangre es considerada una fuente de precursores endoteliales y se expresa en células progenitoras endoteliales tempranas (early endothelial progenitor cells). Su existencia ha provisto de evidencia que existe vasculogénesis postnatal en el adulto, planteándose un rol en la reparación tisular (28, 29, 57).



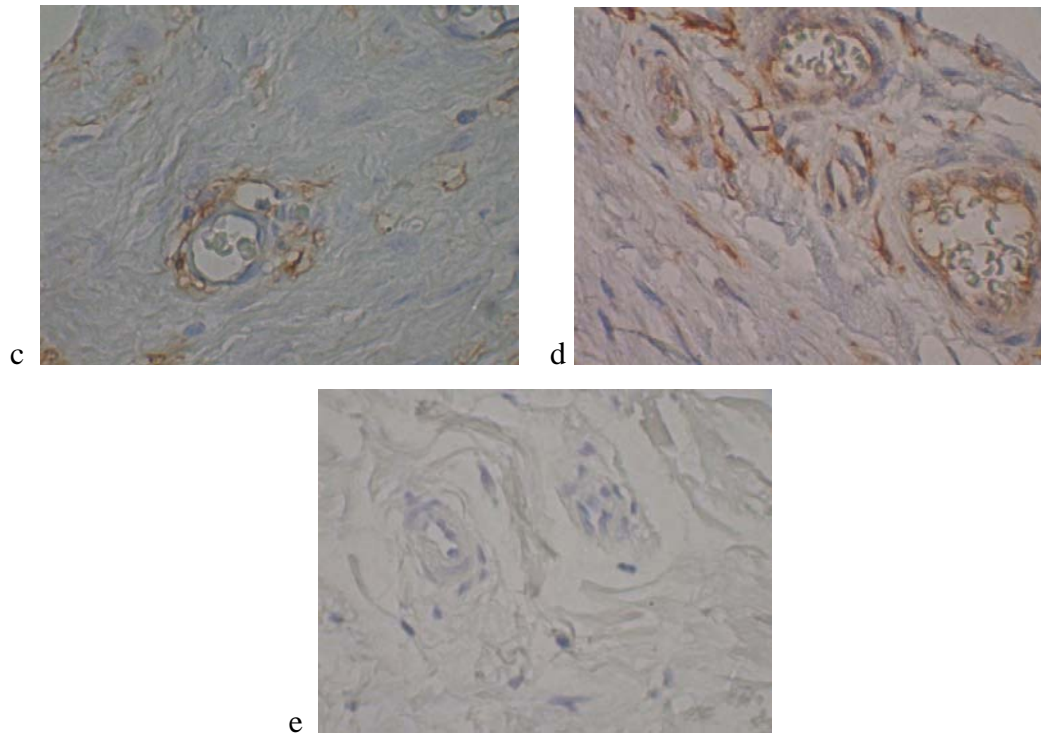


Figura 3. Expresión de marcador CD 14: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en pacientes con tendinosis tipo III: (a y c) no tratado (grupo controles); (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). (e) Control negativo. (40x)

En las muestras analizadas, las imágenes obtenidas mostraron una tinción específica con un leve aumento de su expresión en las muestras provenientes de pacientes tratados con ondas de choque, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (valor $p = 0,18$) (fig. 3).

Anticuerpo anti CD 34

El anticuerpo anti CD 34 reacciona con el marcador presente en las células endoteliales de los neo-vasos existentes y no se expresa prácticamente en las células endoteliales maduras de los vasos residentes que no participan de la neo-angiogénesis. En las muestras de pacientes tratados con ondas de choque, observamos un aumento de esta marcación, especialmente en zonas donde probablemente se organiza un foco reparativo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al análisis de imágenes (valor $p = 0.0116$). (fig. 4)

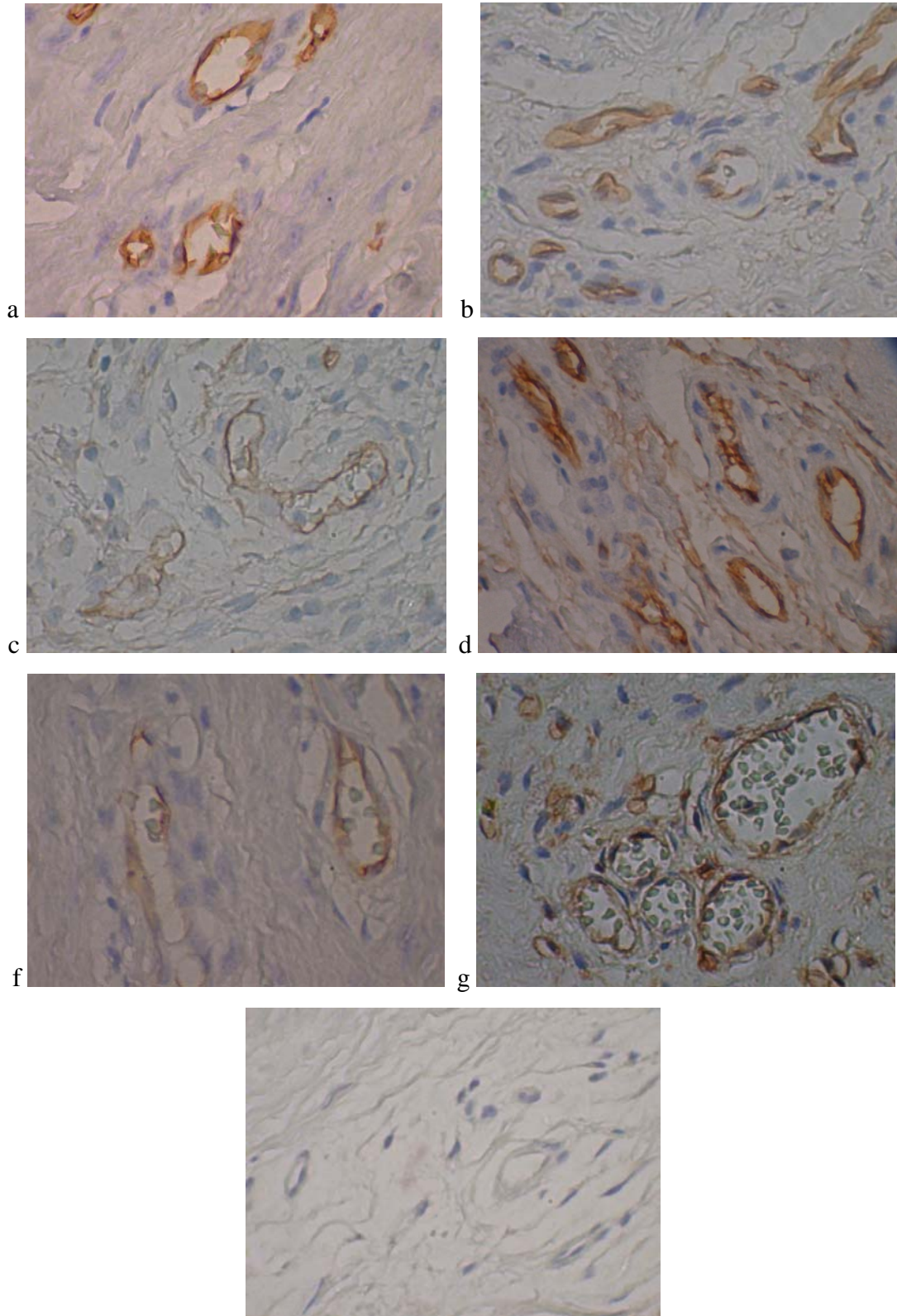


Figura 4. Expresión de marcador CD34: marcación inmunohistoquímica de tendón mango rotador en tendinosis tipo III. (a, c y e) no tratado (grupo controles) ; (b, d y f) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (g). (40x)

Colágeno I

El Colágeno I se encuentra en gran cantidad distribuido por el tejido, pero en tendinosis muestra un patrón heterogéneo y desordenado. En las muestras de pacientes tratados con ondas de choque no observamos diferencias en su marcación comparándolas con los controles. (fig. 5)

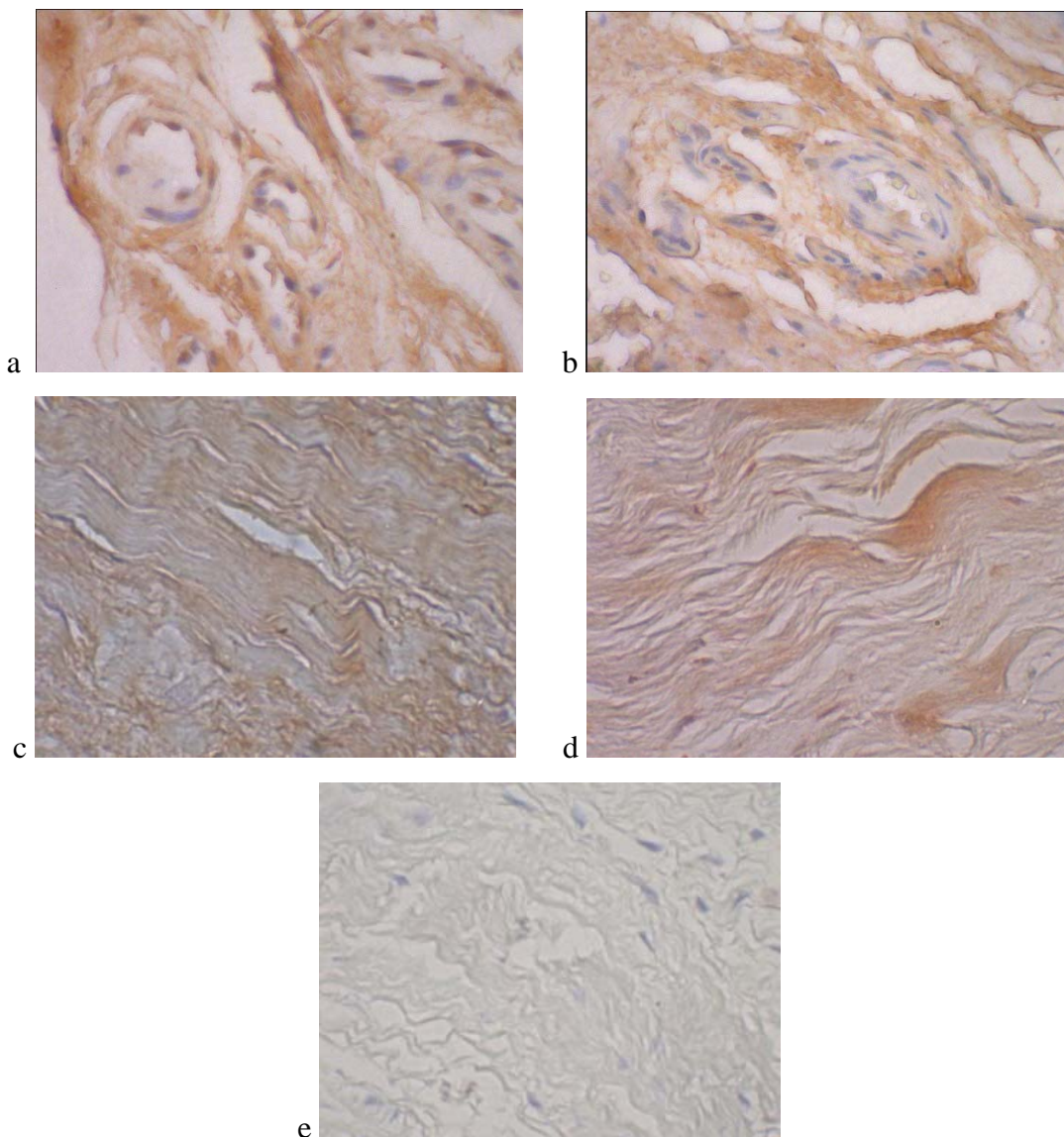


Figura 5. Expresión de Colágeno I: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en tendinosis tipo III. (a y c) no tratado (grupo controles) ; (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (e). (40x)

Colágeno III

Se ha observado un aumento de la expresión de colágeno tipo III, en tejidos tendíneos con roturas agudas, en los procesos de reparación; también dispuesto en forma heterogénea. Ésta respuesta da cuenta de un proceso inflamatorio, en que aumenta la expresión y cantidad de proteína. En las muestras de pacientes tratados con ondas de choque se observó leve aumento de esta marca y en relación a los focos de angiogénesis. Sin embargo los valores obtenidos por análisis de imágenes no muestran diferencia estadísticamente significativa (valor $p=0.7838$). (fig. 6)

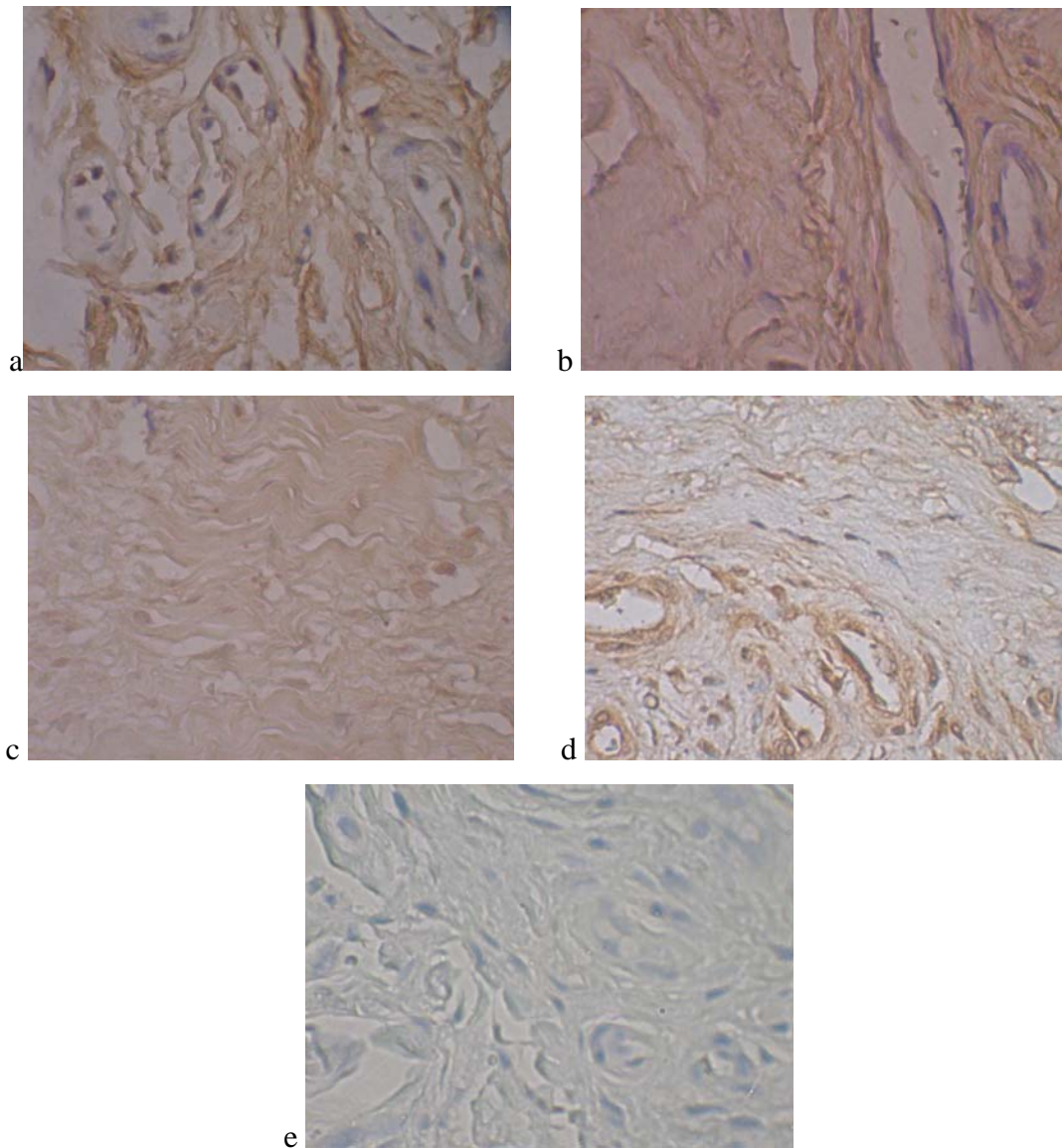


Figura 6. Expresión de Colágeno III: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en tendinitis tipo III. (a y c) no tratado (grupo controles) ; (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (e). (40x).

Anticuerpo anti D2-40

El anticuerpo D2-40 es un marcador específico de células endoteliales de vasos linfáticos. Existen pocos estudios que evalúen la respuesta linfática a los cambios degenerativos. En general, se produce una disminución de su cantidad en aquellos tejidos con mayores cambios degenerativos. Matthews y col. describe que la vasculatura linfática fue observada en las rupturas pequeñas y medianas y no en las grandes rupturas, las que presentan los mayores cambios degenerativos (48).

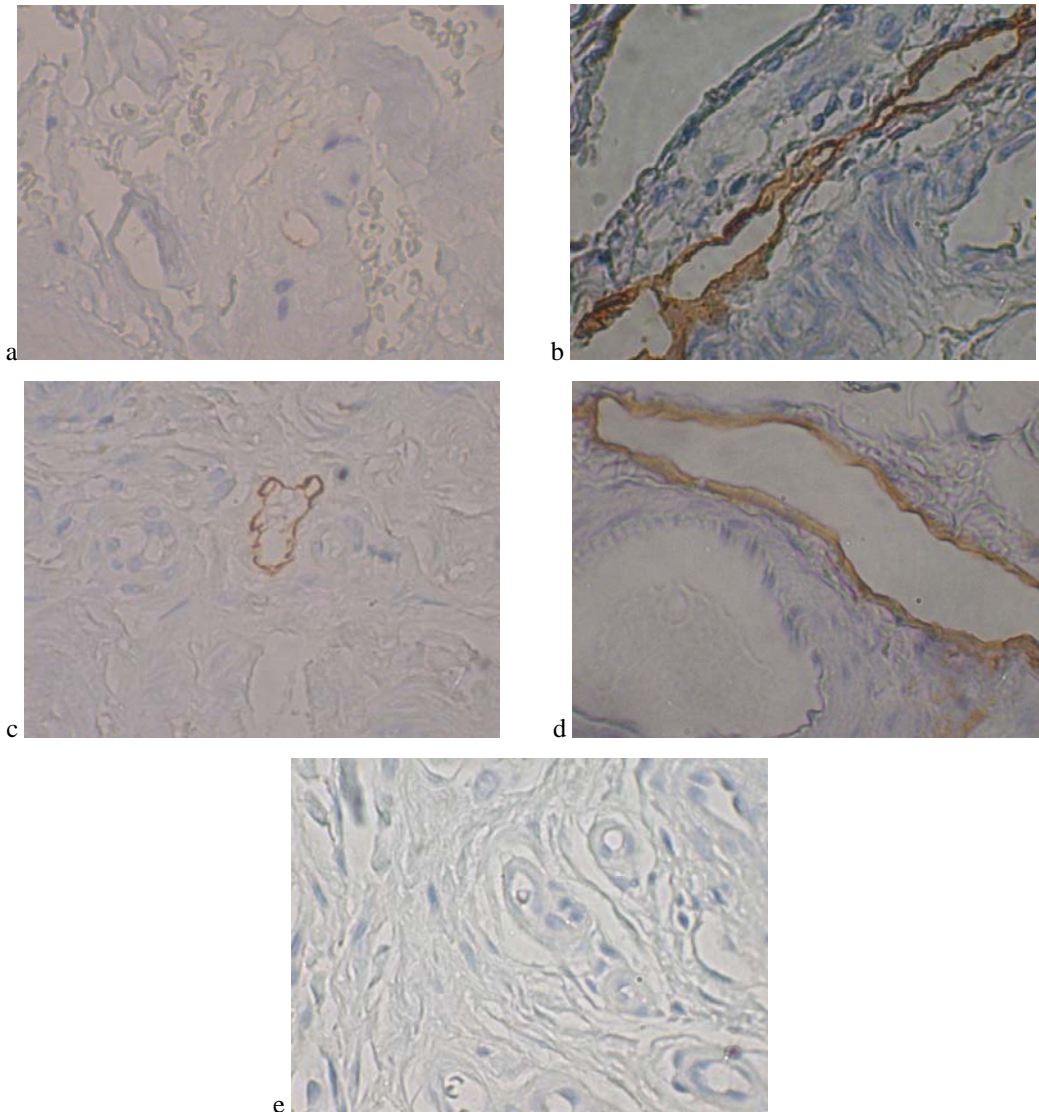
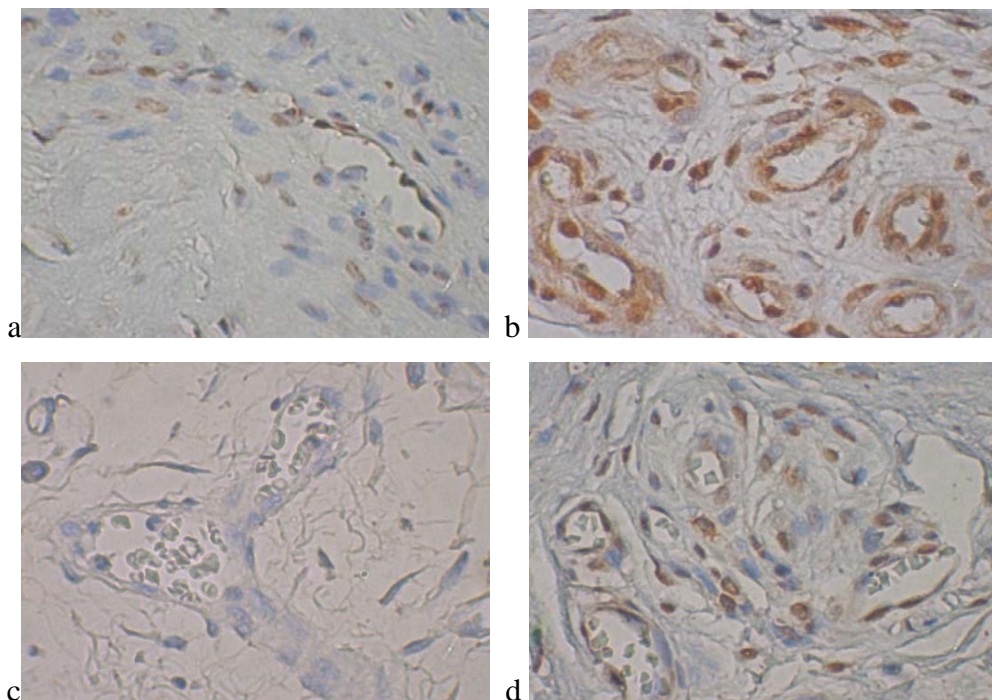


Figura 7. Expresión de marcador D2-40: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en pacientes con tendinosis tipo III: (a y c) no tratado (grupo controles); (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (e) (40x)

Al comparar los pacientes, aquellos con lesiones tipo III presentan mayor cantidad de vasos linfáticos que los tipo IV, tanto los tratados como los no tratados. Sin embargo los pacientes tratados con ondas de choque mostraron un aumento de la marcación y en las imágenes analizadas, se observó la tinción específica con un aumento de su expresión en los casos tratados con ondas de choque, siendo esta diferencia estadísticamente significativa según el análisis de imágenes (valor $p = 0,003$) (fig. 7).

Anticuerpo anti PCNA

El PCNA es un antígeno que demuestra índice de proliferación celular. Se observó en relación a los núcleos de tenocitos y gran parte de las células de los focos de angiogénesis, con mayor expresión en las muestras de pacientes tratados con ondas de choque, evidencia inicial de una respuesta celular con objetivos de reparación tisular. En las muestras analizadas la tinción específica mostró significativamente un aumento en las muestras provenientes de pacientes tratados con ondas de choque (valor $p = 0,006$) (fig. 8).



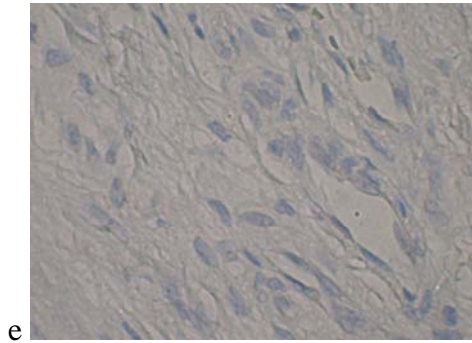


Figura 8. Expresión de marcador PCNA: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en pacientes con tendinosis tipo III: (a y c) no tratado (grupo controles); (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (e). (40x)

Anticuerpo anti Tenascina C

La Tenascina-C es una proteína de matriz extracelular que ayuda a la adhesión molecular con un rol en la migración celular y la organización tisular. La marcación en las muestras de pacientes tratados con ondas de choque fue menor que en las tendinosis no tratadas, destacandose especialmente en relación a los focos de vasos de neoformación. Las imágenes analizadas mostraron que la diferencia es estadísticamente significativa (valor $p = 0,000$) (fig. 9 y 10).

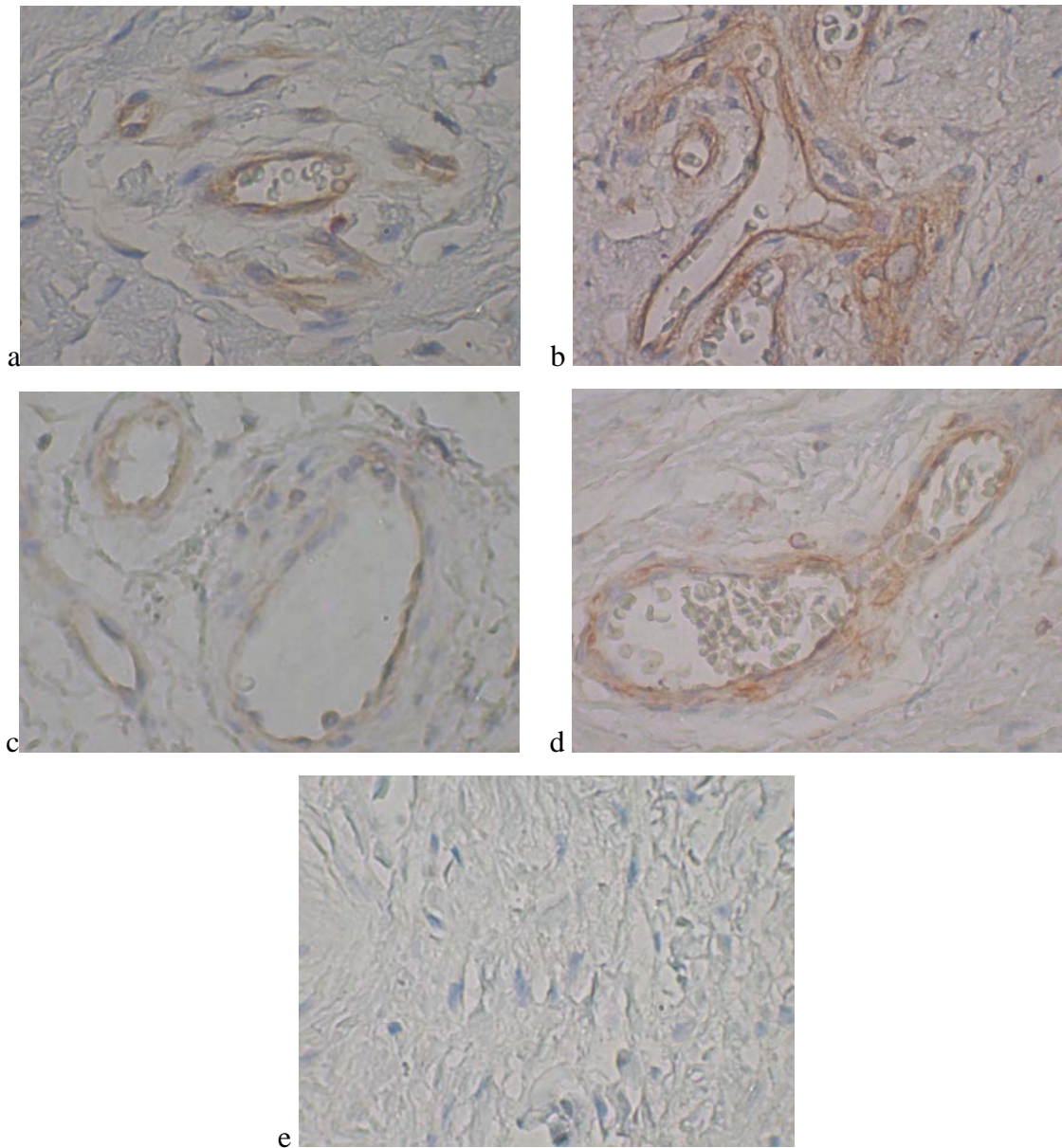


Figura 9. Expresión de marcador Tenacina C: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en pacientes con tendinosis tipo III: (a y c) no tratado (grupo controles); (b y d) 8 semanas post tratamiento con ondas de choque (grupo casos). Control negativo (e). (40x)

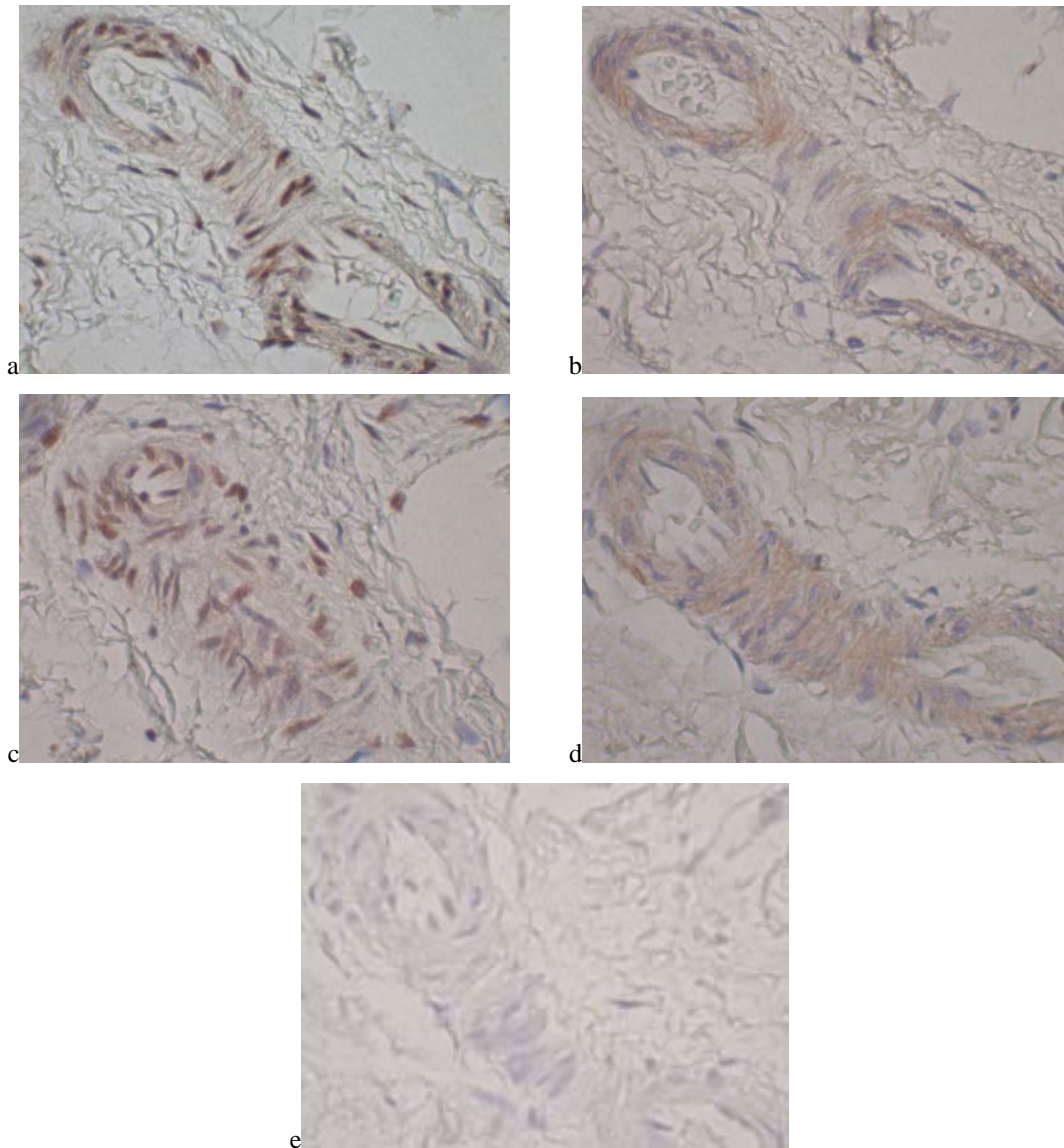


Figura 10. Comparación de la expresión de marcadores PCNA y Tenacina C: marcación inmunohistoquímica de tendón de mango rotador en paciente con tendinitis tipo III tratado con ondas de choque. (a) y (c) corresponde a PCNA y en (b) y (d) se observa la marcación de Tenacina C en relación a un vaso sanguíneo. Control negativo (e). (40x)

Los resultados del análisis cuantitativo, utilizando el procesador de imágenes Image Pro Plus 6.2 para la marcación inmunohistoquímica de los marcadores CD14, CD 34, Colágeno I y III , PCNA, Tenacina C y D2-40 se presentan en la tabla 2. Los valores promedio de intensidad de tinción para la marcación del anticuerpo CD 34, PCNA y D2-40 fue mayor en el grupo tratado con ondas de choque al compararlo con los controles, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), observándose valores altos para

éstos. Los valores de la marcación del anticuerpo Colágeno I y Tenascina C muestra diferencia entre los grupos: fue significativamente menor en el grupo tratado con ondas de choque comparándolo con los controles, siendo ésta diferencia debida a lo constante de sus valores. No se evidencia diferencia significativa en la marcación de los anticuerpos CD14 y Colágeno III, resultando con p-valores por sobre los 0,15, aunque para CD14 los valores sean mayores.

Tabla 2. Resultados del análisis para la cuantificación del área de tinción positiva para la serie completa.

Marcador	Grupo	Media	SD	Mín.	Máx.	LCI	UCI	p-valor
CD 14	Casos	17.78	19.78	0.79	82.94	11.84	23.73	0.175
	Control	13.32	14.46	0.23	63.48	9.74	16.91	
CD 34	Casos	22.16	12.83	1.31	61.97	18.31	26.02	0.012
	Control	15.82	12.32	1.86	57.27	12.63	19.00	
Colágeno I	Casos	0.1	0.04	0.04	0.17	0.09	0.12	0.0001
	Control	0.13	0.03	0.07	0.17	0.12	0.14	
Colágeno III	Casos	0.12	0.04	0.04	0.19	0.11	0.13	0.780
	Control	0.12	0.04	0.03	0.18	0.11	0.13	
PCNA	Casos	0,59	0,28	0,03	1,00	0,50	0,68	0,006
	Control	0,45	0,18	0,07	0,82	0,40	0,50	
Tenacina C	Casos	0,09	0,03	0,06	0,15	0,08	0,10	0,000
	Control	0,12	0,03	0,05	0,16	0,12	0,13	
D2-40	Casos	6,10	9,68	0,00	49,90	3,01	9,20	0,003
	Control	2,07	3,85	0,00	18,82	1,11	3,02	

SD: desviación estándar. LCI: Límite inferior IC95%. UCI: Límite superior IC95%. p-valor: Significancia del análisis de varianza entre casos y controles por marcador.

Se realizó, en forma conjunta, un análisis cuantitativo de la marcación inmunohistoquímica para los marcadores, según el grado de tendinosis tipo III y IV de Riley, diferenciando de esta manera entre los estadios de la enfermedad, considerando además el grupo y número de la medición realizada. Se observa una diferencia entre los estadios III y IV para los marcadores CD14 y CD34, tanto para el grupo control como para el tratado. Se observa una tendencia al aumento de marcación comparando el grupo casos versus el control. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen estadístico para el valor registrado por marcador según tipo de lesión (grado III / grado IV), de tratamiento (casos / controles) y número de lectura (L-1 / L-5).

Marcador	Grado	Lectura	Controles				Casos					
			N	Media	SD	LCI	UCI	N	Media	SD	LCI	UCI
CD14	G-III	L-1	13	12,2	7,08	7,92	16,48	9	11,45	10,23	3,58	19,31
		L-2	13	13,62	15,49	4,26	22,99	9	18,02	22,17	0,98	35,06
		L-3	13	16,17	17,32	5,7	26,64	9	11,77	8,47	5,26	18,28
		L-4	13	12,51	14,86	3,53	21,49	9	22,5	25,44	2,94	42,05
		L-5	13	12,11	17,06	1,8	22,43	9	25,19	25,79	5,36	45,01
	G-IV	L-1	8	10,1	9,6	2,07	18,12	1	2,48	-	-	-
		L-2	8	5,55	1,45	4,34	6,76	1	3,64	-	-	-
		L-3	8	5,77	5,08	1,52	10,01	1	1,01	-	-	-
		L-4	8	9,5	5,34	5,03	13,96	1	0,57	-	-	-
		L-5	8	8,04	8,43	1	15,09	1	0,15	-	-	-
CD34	G-III	L-1	12	13,95	11,01	6,95	20,94	9	14,84	11,5	6,01	23,68
		L-2	12	16,63	15,85	6,56	26,7	9	25,98	13,4	15,68	36,27
		L-3	12	16,91	14,57	7,65	26,16	9	24,03	12,55	14,38	33,68
		L-4	12	14,79	9,61	8,69	20,9	9	29,1	14,51	17,94	40,25
		L-5	12	16,79	11,35	9,58	24,01	9	16,87	7,73	10,93	22,82
	G-IV	L-1	8	6	6,96	0,19	11,82	1	0,04	-	-	-
		L-2	8	8,88	13,15	0	19,87	1	0,04	-	-	-
		L-3	8	8,45	10,47	0	17,21	0	-	-	-	-
		L-4	8	6,67	12,67	0	17,26	0	-	-	-	-
		L-5	8	3,82	6,8	0	9,51	1	4,36	-	-	-
Colageno I	G-III	L-1	13	0,13	0,03	0,11	0,14	9	0,09	0,03	0,07	0,12
		L-2	13	0,13	0,03	0,11	0,15	9	0,1	0,04	0,07	0,14
		L-3	13	0,13	0,03	0,11	0,15	9	0,12	0,03	0,09	0,14
		L-4	13	0,13	0,03	0,11	0,15	9	0,1	0,04	0,07	0,14
		L-5	13	0,13	0,03	0,12	0,15	9	0,1	0,04	0,07	0,13
	G-IV	L-1	8	0,13	0,03	0,1	0,15	1	0,1	-	-	-
		L-2	8	0,12	0,04	0,09	0,15	1	0,07	-	-	-
		L-3	8	0,12	0,02	0,1	0,14	1	0,06	-	-	-
		L-4	8	0,14	0,03	0,11	0,16	1	0,07	-	-	-
		L-5	8	0,23	0,29	0	0,47	1	0,06	-	-	-
Colageno III	G-III	L-1	13	0,12	0,04	0,09	0,14	9	0,12	0,04	0,09	0,15
		L-2	13	0,11	0,03	0,09	0,13	9	0,11	0,05	0,08	0,15
		L-3	13	0,12	0,03	0,11	0,14	9	0,11	0,04	0,08	0,14
		L-4	13	0,12	0,04	0,1	0,14	9	0,11	0,04	0,08	0,14
		L-5	13	0,12	0,04	0,1	0,14	9	0,12	0,04	0,09	0,15
	G-IV	L-1	8	0,13	0,04	0,1	0,16	1	0,06	-	-	-
		L-2	8	0,14	0,03	0,12	0,16	1	0,07	-	-	-
		L-3	8	0,12	0,03	0,1	0,15	1	0,12	-	-	-
		L-4	8	0,13	0,03	0,11	0,16	1	0,06	-	-	-
		L-5	8	0,12	0,03	0,09	0,15	1	0,07	-	-	-

SD: desviación estándar. LCI: Límite inferior IC95%. UCI: Límite superior IC95%. p-valor: Significancia del análisis de varianza entre casos y controles por marcador.

Tabla 3 (continuación)

Marcador	Grado Lectura	Controles					Casos					
		N	Media	SD	LCI	UCI	N	Media	SD	LCI	UCI	
PCNA	G-III	L-1	11	0,51	0,21	0,37	0,65	7	0,59	0,25	0,36	0,82
		L-2	11	0,39	0,19	0,26	0,52	7	0,61	0,28	0,36	0,87
		L-3	10	0,48	0,17	0,36	0,61	8	0,54	0,32	0,27	0,81
		L-4	11	0,45	0,16	0,34	0,56	8	0,53	0,31	0,27	0,79
		L-5	10	0,42	0,19	0,29	0,55	7	0,7	0,29	0,43	0,97
	G-IV	L-1	2	0,3	0,18	0	1,95	1	0,62	-	-	-
		L-2	2	0,35	0,14	0	1,58	1	0,57	-	-	-
		L-3	2	0,24	0,18	0	1,84	1	0,54	-	-	-
		L-4	2	0,32	0,24	0	2,44	1	0,8	-	-	-
		L-5	4	0,23	0,25	0	0,63	1	0,64	-	-	-
Tenacina C	G-III	L-1	13	0,13	0,02	0,12	0,15	9	0,09	0,02	0,07	0,11
		L-2	13	0,11	0,04	0,09	0,13	9	0,08	0,01	0,07	0,09
		L-3	13	0,13	0,03	0,11	0,15	9	0,1	0,03	0,08	0,12
		L-4	13	0,11	0,03	0,09	0,13	9	0,09	0,03	0,06	0,11
		L-5	13	0,13	0,03	0,11	0,15	9	0,09	0,03	0,07	0,12
	G-IV	L-1	8	0,15	0,01	0,14	0,16	1	0,13	-	-	-
		L-2	8	0,13	0,03	0,1	0,16	1	0,13	-	-	-
		L-3	8	0,14	0,03	0,11	0,16	1	0,15	-	-	-
		L-4	8	0,15	0	0,15	0,15	1	0,14	-	-	-
		L-5	8	0,15	0	0,15	0,15	1	0,14	-	-	-
D2-40	G-III	L-1	13	2,22	4,3	0	4,81	8	3,39	4,65	0	7,27
		L-2	13	3,11	5,81	0	6,62	8	4,88	6,16	0	10,03
		L-3	13	2,54	4,13	0,04	5,04	8	6,57	7,86	0	13,14
		L-4	13	1,2	1,78	0,13	2,28	8	9,38	17,08	0	23,66
		L-5	13	1,26	1,9	0,11	2,4	8	6,31	9,26	0	14,05
	G-IV	L-1	8	1,5	3,25	0	4,22	1	0,32	-	-	-
		L-2	8	0,54	0,69	0	1,12	1	0,25	-	-	-
		L-3	8	0,63	0,95	0	1,43	1	0,11	-	-	-
		L-4	8	0,91	1,59	0	2,24	1	1,03	-	-	-
		L-5	8	0,39	0,61	0	0,91	1	0,21	-	-	-

SD: desviación estándar. LCI: Límite inferior IC95%. UCI: Límite superior IC95%. p-valor: Significancia del análisis de varianza entre casos y controles por marcador.

El análisis estadístico de los valores obtenidos por *análisis de varianza con medidas repetidas* se resumen en la tabla 4, que compara los grupos casos v/s control en las lesiones tipo III.

Se observa que el modelo utilizado tiende a explicar poca variabilidad de los datos ($R^2 < 0,30$) y ser poco representativos ($p\text{-valor (Modelo)} > 0,05$), pero cumple con el objetivo de poder conocer cual marcador presenta diferencias entre los grupos casos y controles ($p\text{-valor (Grupo)} < 0,05$). No hubo evidencia para indicar que las 5 mediciones realizadas en cada uno de los pacientes, por cada marcador, fueran distintas ($p\text{-valor (Lectura)} < 0,05$).

En cuanto a los valores medios registrados entre los casos y controles para cada marcador (p-valor (Grupo)) hay evidencia de ser diferentes entre los marcadores CD34, Colágeno I, PCNA, Tenascina C y D2-40 al presentar p-valor < 0,05; sin embargo los valores promedios para Colágeno I y Tenascina C fueron significativamente menores en los tratados. Los marcadores CD14 y Colágeno III resultaron sin la evidencia necesaria con p-valor por sobre los 0,15. En promedio, los marcadores CD34, PCNA y D2-40 presentan valores más altos entre los sometidos a Ondas de Choque que entre los no tratados.

Tabla 4. Resumen de los modelos obtenidos por análisis de varianza con medidas repetidas (Lectura) para comparar los grupos (casos / control) en las lesiones Grado III por marcador.

Marcador	R²	Modelo (p)	Grupo (p)	Lectura (p)
CD 14	0.03	0.664	0.1800	0.8402
CD 34	0.1	0.06	0.0116	0.3623
Colágeno I	0.15	0.006	0.0001	0.8484
Colágeno III	0.00	0.993	0.7838	0.9827
PCNA	0.10	0.124	0.0065	0.8765
Tenascina C	0.30	0.000	0.000	0.0819
D2-40	0.09	0.098	0.0038	0.9332

R² : Coeficiente de determinación. (p): p-valor significancia del análisis de varianza entre casos y controles por marcador.

La figura 11 representa la distribución y tendencia de los valores registrados según marcador y grupo en grado de lesión tipo III y IV, según los diferentes marcadores.

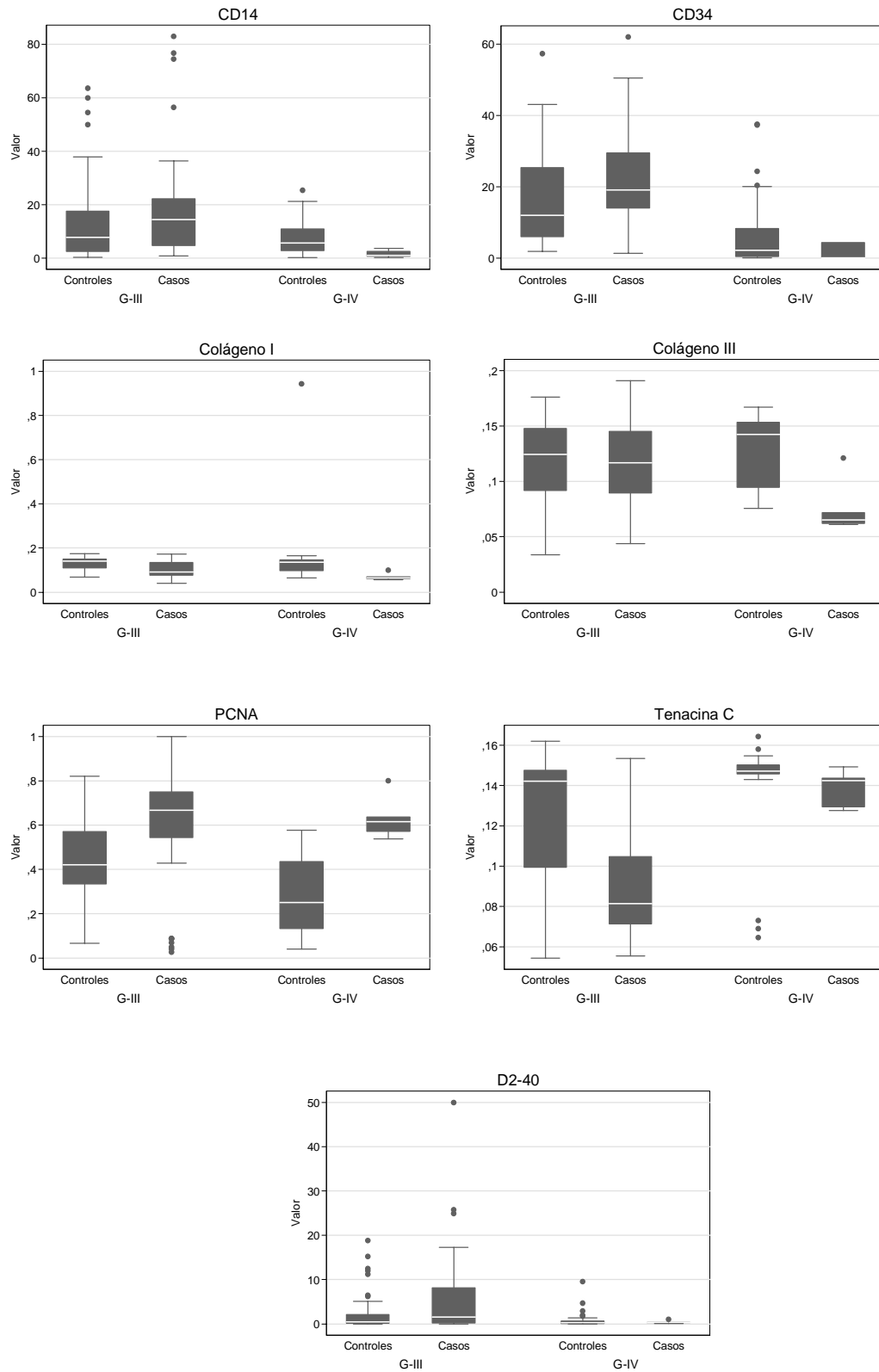


Figura 11. Efecto del tratamiento con Ondas de Choque: gráficos de caja para describir la distribución y tendencia de los valores registrados según marcador, grado de lesión y grupo casos tratados comparado con el grupo controles.

Adicionalmente, se comparó las diferencias entre los valores medios para las lesiones de grado III y IV de los pacientes pertenecientes al grupo de los controles. Otras comprobaciones no fueron posibles de ejecutar por el número de participantes que obtuvo el grupo casos con lesiones grado IV (sólo una observación). Esta comparación también fue desarrollada con análisis de varianza para medidas repetidas. El resumen de los modelos obtenidos con sus características principales es presentado en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los modelos obtenidos por análisis de varianza con medidas repetidas (Lectura) para comparar el tipo de lesión (grado III / grado IV) en los controles por marcador.

Marcador	R²	Modelo (p)	Grupo (p)	Lectura (p)
CD 14	0.05	0.3913	0.0276	0.9919
CD 34	0.14	0.0125	0.0002	0.9180
Colágeno I	0.05	0.4146	0.3622	0.3825
Colágeno III	0.02	0.8022	0.1804	0.9731
PCNA	0.16	0.0634	0.0068	0.6475
Tenascina C	0.19	0.0007	0.0004	0.0430
D2-40	0.06	0.3009	0.0532	0.6778

R² : Coeficiente de determinación. (p): p-valor significancia del análisis de varianza.

DISCUSION

La condición de Tendinopatía Mango Rotador del Hombro es una situación clínica común y compleja, crónica y evolutiva (1,2). Es necesario profundizar sobre su capacidad de cicatrización, ya que determina los resultados quirúrgicos. La tasa de recurrencias de rupturas es variada (5, 34) y se asocia a un tendón degenerado con capacidad reparativa disminuida (59).

Existen publicaciones que apoyan el uso de la terapia con Ondas de Choque como inductor biológico en tejidos tendíneos con alteración de sus capacidades reparativas. El tratamiento fue aplicado a pacientes con patología degenerativa y rotura del mango rotador del hombro.

La clasificación de Riley nos permite una adecuada caracterización de la enfermedad y siendo histológica con base en H-E resulta ser rápida, de bajo costo, no compleja y permite comparaciones. La distribución de nuestra muestra en base a la imagen histológica de colágeno y celularidad descrita por Riley, fue corroborada en lo sustancial. El análisis en conjunto de las características del colágeno descrito por Riley para las tendinopatías III y IV más la inmunohistoquímica de colágenos I y III, permite decir que las tendinopatías tipo III muestran mejor calidad y estructura de colágenos que la tipo IV, por lo tanto el daño es menos severo en la tipo III (degeneración moderada) que en la tipo IV (degeneración severa). La condición de éste componente resulta fundamental por un hecho basado en estudios de mecanotransducción: sólo un colágeno capaz de transmitir fuerzas a la interfase con tenocitos/tenoblastos es capaz de evitar su apoptosis (60). Estas consideraciones apoyan la clasificación seleccionada a la vez que indican, en general, que las técnicas inductoras de reparación tisular debieran ser aplicadas en las fases tempranas de la enfermedad tendinopática, donde existe un estroma y celularidad capaz de sostener ó permitir un esfuerzo reparativo conducente a una cicatrización estructural y funcional.

Seleccionamos los marcadores CD34 y CD14 para validar la presencia y comportamiento de células endoteliales progenitoras nuevas en los procesos de neovascularización tendínea del mango rotador tratados con Ondas de Choque. Las células

endoteliales maduras en vasos sanguíneos residentes que no participan del proceso de neovascularización tienden a disminuir la densidad del marcador CD34 (61).

La marcación inmunohistoquímica para antígenos CD14 y CD34 fue adecuada y no existió diferencia entre las distintas lecturas para cada uno de ellos, confirmado por el valor (p) observado en la lectura. Esto nos permite corroborar que no hubo alteraciones en el procedimiento de la toma de los datos entre los distintos tiempos. Sin embargo el bajo valor del coeficiente de determinación, que informa la capacidad del modelo para explicar la variación observada en los datos, nos plantea la posibilidad de que otras variables no fueran consideradas.

La expresión de CD34 en los pacientes no tratados es baja y disminuye más a medida que progresa la enfermedad desde un tipo III a un tipo IV de Riley, asociado a una alteración en el proceso reparativo, lo que estaría de acuerdo con la bibliografía, que señala la hipovascularidad como un factor característico de esta patología. Considerando nuestra cuantificación, esta marcación es significativamente diferente en los pacientes tratados con ondas de choque para el CD34, lo que nos permite inferir su rol como inductor de neoangiogénesis, observándose no solamente un mayor número de vasos, sino una marcación que impresiona corresponder a células inductoras de neo-vasos.

La marcación de CD14, expresado en células precursoras endoteliales, nos permite plantear su rol en el proceso de reparación tisular y en la respuesta neoangiogénica, sin embargo no existe una diferencia estadística significativa de su inducción por las ondas de choque.

La utilización de los anticuerpos monoclonales para Colágeno I y III permiten apreciar en forma directa la estructura de la matriz y su relación al grado de daño según la Clasificación de Riley. Se observó una adecuada marcación para ambos colágenos, especialmente para Colágeno I, sin embargo al comparar los grupos, los valores promedio de los tratados fue menor que los controles, entregando una significancia estadística al análisis cuantitativo. El Colágeno III no mostró esta diferencia y su marcación presentó valores bajos y de difícil comparación, lo que sugiere que su determinación mediante técnicas de inmunohistoquímica no permite una adecuada caracterización de esta molécula involucrada en los procesos de regeneración de matriz extracelular.

Nosotros pudimos observar una mayor aparición de ambos tipos de colágeno asociados a los focos de neovascularización inducidos por las Ondas de Choque, situación descrita por Kirckpatrick (27) donde demuestra que la célula endotelial del brote vascular es capaz de inducir la polimerización del tropocolágeno inmediatamente adyacente a ella, planteando que también es capaz de sintetizar Colágeno I. Asimismo, Berta (62), aplicando Ondas de Choque in-vitro a fibroblastos, obtiene mayor expresión de Colágeno I a los seis días y de Colágeno III al noveno día junto a una mayor expresión de TGF- β 1 (mRNA) para el período; una situación interesante la constituye el hecho que analiza sus resultados con igual herramienta estadística utilizada por nosotros. Es posible que el bajo valor de marcación de Colágeno III y la falta de diferencia estadística se deba a que el procedimiento no fue realizado en el periodo de mayor expresión de la proteína.

El marcador D2-40 de reciente liberación, permite identificar la presencia de vasos linfáticos por marcación de células endoteliales linfáticas (66). Lo seleccionamos buscando evidenciar si las Ondas de Choque inducían, junto a la neo-vascularización, a vasos linfáticos que pudieran explicar el comportamiento de las tendinopatías cálcicas del mango rotador cuando se le aplica esta terapia. En estos casos se observa una reabsorción del depósito cálcico en términos de 60 a 80 días en forma importante, por lo menos en el 75% de las poblaciones tratadas en nuestro medio en los últimos años. La correlación de nuestros hallazgos clínicos e inmunohistoquímicos nos permiten sugerir que las ondas de choque modulan el mecanismo de reabsorción de los depósitos cálcicos, a través del desarrollo de nuevos vasos linfáticos en el tendón del mango rotador. En la historia natural de la enfermedad se produce la licuefacción del depósito hacia la bursa subacromial, para así iniciar su reabsorción, esta vez desde linfáticos bursales.

El análisis de los valores medios entre casos y controles para las lesiones grado III muestra una diferencia significativa de presencia de linfáticos después de ondas de choque; el mismo análisis sobre diferencias entre tendinopatías III y IV para controles, presenta valores diferentes con un p cercano a lo estadísticamente significativo ($p=0,0532$). Pusztaszeri M.P (66) realiza una investigación de la expresión espontánea de marcadores endoteliales incluyendo a D2-40 en tejidos humanos, calificando a D2-40 como un

marcador sensible y relativamente específico para endotelio linfático, pero no incluye en su estudio la expresión de éste marcador en tejidos conjuntivos tendíneos.

El anticuerpo monoclonal PCNA reconoce un antígeno nuclear, el cual se expresa en las células proliferantes, aportando una evidencia indirecta sobre número de células estromales activadas para división celular ó diferenciación. El análisis estadístico indica que el valor medio registrado de PCNA entre casos y controles es significativo ($p < 0,05$), mostrando un aumento de éste marcador en la población tratada. La activación celular así inducida, permitiría sugerir que existe mayor actividad metabólica celular de poblaciones celulares activadas a la mitosis y posiblemente diferenciación estromal. Según estos datos, el marcador PCNA puede ser considerado un elemento de análisis inmunohistoquímico que permita inferir actividad anabólica. Diversos estudios realizados en animales y humanos a los que se les han aplicado Ondas de Choque, son consistentes en demostrar aumentos estadísticamente significativos de la expresión de esta molécula y ésta investigación obtiene similares resultados (11, 16, 20) para este marcador.

La Tenacina C es una glicoproteína de matriz extracelular con un importante rol estructural y regulador celular. Sus multidominios le confieren múltiples sitios de interacción con otras proteínas de matriz extracelular. Es expresada en una variedad de tejidos y se le han atribuido variadas funciones. Su efecto en la proliferación celular de osteoblastos fue estudiada (64) evidenciándose que inhibe la proliferación celular en una de las tres líneas celulares utilizadas. Tenascina C presentaría diferentes efectos respecto de la proliferación dependiendo de la etapa de diferenciación del osteoblasto. Otro estudio, en tejido articular y periarticular de rata, demostró que su expresión está restringida dependiendo del tipo celular y su grado de diferenciación, disminuyendo su marcación a medida que maduraba el tejido. De esta manera cambia su distribución con el desarrollo y la maduración (63). El marcador Tenascina-C permite reconocer la expresión de esta glicoproteína de la matriz del tejido tendíneo, la que en condiciones normales, contribuye a la estructura de la misma e influencia la conducta de las células en contacto con la matriz extracelular (31, 32). Su expresión es regulada por stress mecánico, demostrándose mayor actividad en heridas y tejidos inflamados que están en fase de remodelación (33), los que

presentan así mayor actividad de ella asociada a los focos de neoangiogénesis espontánea e inducida (34, 35). Nosotros observamos que incluso se puede encontrar expresión de Tenascina-C cómo una débil tinción inicial asociada a una filopodia de la célula endotelial, haciéndose más intensa a medida que el vaso se estructura completamente y madura con el adosamiento de células pericitos, descrito de similar manera por Riley (67). Nosotros encontramos una menor marcación de Tenascina C en los casos tratados con Ondas de Choque, comparándolo con los controles y su diferencia fue significativa, al análisis de imágenes, en las lesiones tendinopáticas grado III para casos y controles, como así también al comparar lesiones tipo III y IV en el grupo control. Una posible explicación es que Tenascina C presente un rol inhibitorio en tenocitos diferenciados y en etapas avanzadas de degeneración tisular, sin descartar un rol proliferativo en los focos de angiogénesis donde evidenciamos una adecuada marcación. Es posible sugerir que Tenascina C es un elemento de análisis adecuado para categorizar el metabolismo de matriz y su actividad de reparación, sin embargo se requiere de herramientas de mayor diferenciación para establecer su rol. Considerando su marcación en relación a los focos de angiogénesis sugerimos que su expresión indica un proceso de neoangiogénesis adecuado en los casos tratados con Ondas de Choque, apreciándose alrededor de toda la nueva población de neovasos inducida por el tratamiento. De acuerdo con lo anterior, podemos afirmar que sí existe neovascularización inducida por las Ondas de Choque en los tendones del mango rotador afectados por el proceso de tendinosis.

El análisis de las distintas áreas expuestas en éste trabajo, nos sugieren que la capacidad de reparación del tendón está íntimamente asociada a las condiciones de su matriz que permita el desarrollo de un proceso de neoangiogénesis y posterior repoblamiento celular reparativo y en ése sentido, las poblaciones de tendinopatías tipo III muestran claras diferencias con las IV tratadas ó no, sugiriendo una aplicación de inductores biológicos más temprano que tarde.

A lo largo de la investigación se apreció la existencia de limitaciones que afectan el nivel de resultados alcanzados y serán expuestos en forma sumaria. El número de casos insuficiente para el grupo de Ondas de Choque, se debió a que la selección de participación

correspondía a los pacientes y se desarrolló en base a gratuidad, obtenida para cada uno de los participantes. La distribución aleatoria de los pacientes, observando solo una única tendinosis tipo IV de Riley, en la serie casos tratados.

CONCLUSIÓN

Al considerar el comportamiento de PCNA, Tenascina C y CD34, luego de aplicar el tratamiento Ondas de Choque, indica que el tejido muestra una mayor capacidad metabólica, con alta probabilidad de mejorar su capacidad cicatricial considerando su aumento de neoangiogénesis y celularidad activa. Así es posible también plantear, que la aplicación de Ondas de Choque en Tendinopatías tipo III de Riley sin rupturas ecográficas permitiría modular su evolución y observar mejorías clínico-ecográficas, lo que debiera ser corroborado por bien diseñados estudios clínicos.

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir una propiedad de inducción de endotelio linfático luego de la aplicación de Ondas de Choque, a través del marcador D2-40. Se requieren de estudios dirigidos sobre éste punto a objeto de apoyar ésta hipótesis interesante.

El análisis en conjunto indica que las Ondas de Choque presentan una capacidad de inducción de neovascularización y celularidad activa, cuando son aplicadas a lesiones degenerativas tempranas del Mango Rotador en el hombre.

REFERENCIAS

1. Van der Windt D. et al. Shoulders disorders in general practice: incidence, patient characteristics, and management. *Ann Rheum Dis* 1995 ; 54 : 959 – 964..
2. Riley G. Tendinopathy- from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Feb;4 (2) 82-9 .
3. Maffulli N., et al. Movin and Bonar Scores Asses the same Characteristics of Tendon Histology. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Jul;466 (7):1605-11 . Epub 2008 Apr 25.
4. Maffulli N., Khan K.M., Puddu G. Overuse Tendon Conditions: Time to Change a Confusing Terminology. *Arthroscopy*. 1998 Nov-Dec;14(8):840-3.
5. Cummins C.A., Murrell G.A.C. Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery. *J Shoulder Elbow Surg* 2003; 12 : 128 – 133.
6. Longo U.G., et al. Light microscopic histology of supraspinatus tendon ruptures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* (2007) 15:1390-1394.
7. Hijioka A., Suzuki T., Nakamura T., Hojo T. Degenerative change and rotator cuff tears. An anatomical study in 160 shoulders of 80 cadavers. *Arch Orthop Trauma Surg* (1993) 112 : 61-64.
8. Longo U.G., Franceschi F. et al. Histopathology of the Supraspinatus Tendon in Rotator Cuff Tears. *Am J Sports Med* . 2008 vol 36 (3):533-8.
9. Caplan A.I. Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine. *J. Cell. Physiol*. 213:341-347, 2007.
10. Wang L. et al. Extracorporeal Shock Wave Therapy in Treatment of Delayed Bone Tendon Healing. *Am. J. Sports Med*. 2008; 36:340-347.
11. Wang C-J., et al. The effect of shock waves treatment at the tendon-bone interface: an histomorphological and biomechanical study in rabbits. *J Orthop Res*. 2005 ; 23 (2) :274 – 280.
12. Orhan Z., et al. An experimental study on the application of extracorporeal shockwaves in the treatment of tendon injuries : preliminary report. *J Orthop Sci* (2001) 6:566-570 .
13. Orhan Z., et al.. The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis. A histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg [B]* 2004;86-B:613-8.
14. Brañes M., et al. Tendinosis of the Shoulder and Related Entities Treated with ESWT. *Histopathological and Clinical Correlation*. *ISMST News Letter* May 2007 vol 3, Issue 1:9-10.
15. Birnbaum K et al. Use of extracorporeal shock-wave therapy in the treatment of non-unions (200) *Arch Orthop Trauma Surg* 122:324-330
16. Chen YJ. et al. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression. *Journal of Orthopaedic Research* 22 (2004) 85&861
17. Gerdesmeyer L et al. Extracorporeal Shock Wave Therapy for the Treatment of Chronic Calcifying Tendonitis of the Rotator Cuff (2007) *JAMA*. 2003;290(19):2573-2580
18. Xu Y., Murrell G.A. The Basic Science of Tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* (2008) 466:1528-1538.
19. Lee T-C. et al. Application of extracorporeal shock wave treatment to enhance spinal fusion: a rabbit experiment. *Surgical Neurology* 70 (2008) 129 – 134.
20. Wang C-J., et al . Extracorporeal shockwave therapy shows regeneration in hip necrosis. *Rheumatology* 2008; 47:542-546.
21. Stojadinovic A. et al. Angiogenic response to extracorporeal shock wave treatment in murine skin isografts. *Angiogenesis* (2008) 11 : 369 – 380.
22. Magra M, Maffulli N Matrix metalloproteases: a role in overuse tendinopathies. *Br J Sports Med* . 2005 Nov;39(11):789-91
23. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*. 2004 Apr;84 (2):649-98 . Review.

24. Wang JH, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol.* 2006 Mar;5(1):1-16.
25. Matthews TJ, Smith SR, Peach CA, Rees JL, Urban JP, Carr AJ. In vivo measurement of tissue metabolism in tendons of the rotator cuff: implications for surgical management. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 May;89(5):633-8.
26. Seta N., Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med.* 2007 Jun; 56 (2) :41-7 . Review.
27. Kirkpatrick N.D., et al. Live imaging of collagen remodeling during angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292; H3198-H3206, 2007.
28. Asahara T., Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 : C572-C579,2004.
29. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan;292(1):H1-18. Review.
30. Biberthaler P. et al. Microcirculation Associated with Degenerative Rotator Cuff Lesions. In vivo assessment with Orthogonal Polarization Spectral Imaging during arthroscopy of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Mar;85-A(3):475-80.
31. Shiu Y-T., et al. The role of Mechanical Stresses in Angiogenesis. *Crit Rev Biomed Eng.* 2005;33(5):431-510. Review.
32. Kovacevic D., Rodeo S. Biological Augmentation of Rotator Cuff Tendon Repair. *Clin Orthop Relat Res* (2008) 466:622-633
33. Andres B.M., Murrell G. Treatment of Tendinopathy. *Clin Orthop Relat. Res* (2008) 466:1539-1554.
34. Galatz L.M. et al. Characteristics of the rat supraspinatus tendon during tendon-to-bone healing after acute injury. *J Orthop Res* 24 : 541 – 550 , 2006.
35. Kazuyoshi H. et al. Spontaneous healing process of a supraspinatus tendon tear in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* (2004) 124:374-377.
36. Koike Y., Trudel G., Uthoff H.K. Formation of a new enthesis after attachment of the supraspinatus tendon : A quantitative histologic study in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 1433 – 1440.
37. Gimbel J.A. et al. Supraspinatus tendon organizational and mechanical properties in a chronic rotator cuff tear animal model. *Journal of Biomechanics* 37 (2004) 739 – 749.
38. Uthoff H.K., Trudel G., Himori K. Relevance of pathology and basic research to the surgeon treating rotator cuff disease. *J Orthop Sci* (2003) 8 : 449 – 456.
39. Bi Y. et al. Identification of tendon stem / progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine* (2007) October 13 (10): 1219 – 1227.
40. Blevins F.T. et al. Biology of the rotator cuff tendon. *Orthop Clin North Am.* 1997 Jan;28(1):1-16. Review.
41. Warden SJ. Animal models for the study of tendinopathy. *Br. J. Sports Med.* 2007 ; 41 : 232 – 240.
42. Lewis JS. Rotator Cuff Tendinopathy : A Review. *Br J Sports Med.* 2008; 0: bjsm.2008.052175v4
43. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. *Rheumatology* 2004 ; 43 : 131 – 142.
44. Goutallier D. et al. Histological lesions of supraspinatus tendons in full thickness tears of the rotator cuff. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 2005 Apr;91(2):109-13.
45. Sharma P., Maffulli N. Tendon Injury and Tendinopathy : Healing and Repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Jan;87(1):187-202. Review
46. Clark J.M., Harryman D.T. Tendons, Ligaments, and Capsule of the Rotator Cuff. *J Bone Joint Surg* vol.74-A, N° 5, June 1992 : 713-725.
47. Riley G.P., Goddard M.J., Hazleman. Histopathological assessment and pathological significance of matrix degeneration in supraspinatus tendons. *Rheumatology* 2001 ; 40 : 229 – 230.
48. Matthews T.J.W. et al. Pathology of the torn rotator cuff tendon. Reduction in potential for repairs as tear size increases. *J Bone Joint Surg (Br)* vol.88-B, N° 4, April 2006 : 489 – 495.
49. Neer C.S. *Shoulder Reconstruction*, pp:41 a 142. W.B. Saunders Company, 1990

50. Bigliani L.U. Rotator Cuff Repair, Chapter 4, pp. 133 a 165 in Post M., Bigliani L.U., Flatow E., Pollock R. The Shoulder Operative Technique. Williams & Wilkins , 1998.
51. Ogden JA. Principles of Shock Wave Therapy. Clin Orthop Relat Res 2001. 387: 8-17
52. Fenwick S et al The vasculature and its role in damaged and healing tendon. Review (2002) Arthritis Research 4, 4: 252-259
53. Kraushaar, B. and Nirschl, R.P. (1999) Current Concepts Review - Tendinosis of the Elbow (Tennis Elbow). Clinical Features and Findings of Histological, Immunohistochemical, and Electron Microscopy Studies *J Bone Joint Surg Am.*; 81: 259-78.
54. Contreras HR et al. The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol.* 2010 Sep-Oct;28(5):534-40. Epub 2009 May 17.
55. Ledezma et al. Shift of expression pattern of syndecans 1 and 2 predicts biochemical recurrence in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology.* 2011
56. Ruifrok, A.C. and D.A. Johnston, Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 2001. 23(4): p. 291-9.
57. Elsheikh E. et al. Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity *Blood*, 2005. Volume 106, number 7
58. Pita Fernández S. Tipos de estudios epidemiológicos Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. En: Tratado de Epidemiología. Universidad de Alicante: 1995. p. 25-47.
59. Matthews T. et al. Prediction of rotator cuff repair failure by histological analysis. *Shoulder & Elbow* 2009 1, pp. 10 - 14.
60. Arnoczky S.P. et al. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? . *Int J Exp Pathol* 2007 Aug; 88 (4):217-26.
61. Yin A.H. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, Vol 90, N° 12, 1997: pp. 5002-5012.
62. Berta L. et al. Extracorporeal shock waves enhance normal fibroblast proliferation in vitro and activate mRNA expression for TGF- β 1 and for collagen types I and III. *Acta Orthopaedica* 2009; 80 (5): 612-617.
63. Mackie and Ramsey. Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth. *J. Anat.* 1996. 188, pp. 157-165.
64. Mackie and Ramsey. Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *Journal of Cell Science.* 1996. 109, 1597-1604.
65. Albert JD et al. High Energy Extracorporeal Therapy for Calcified Tendinitis of the Rotator Cuff. *J Bone Joint Surg. (Br.)* 2007; 89-B: 335-41.
66. Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand Factor and Fli-1 in normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* Vol 54 (4): 385-395, 2006.
67. Riley GB et al. Tenascin C and Human Tendon Degeneration. *Am J Pathol.* 1996. 149: 933-943

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA**

COMITÉ DE ETICA DE LA INVESTIGACION EN SERES HUMANOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto

Nombre del Investigador principal: Dr. Julián Brañes

Institución: Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de Medicina

Teléfonos: 678 6862 – 678 6861

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación **Evaluación del efecto de tratamiento con ondas de choque extracorpóreas en tendinopatías del mango rotador en el hombre.**

Objetivos: Esta investigación tiene por objetivo evaluar el efecto biológico inducido por la Terapia de Ondas de Choque extracorpórea aplicada en forma previa a la cirugía, en una población de pacientes tendinósicos con ruptura del mango rotador del hombro.

Procedimientos: Si Ud. Acepta dar su consentimiento, una vez realizado el tratamiento, sólo aprovecharemos que a usted se le realizará una biopsia de tendón según dictamine su propio médico tratante y realizaremos las determinaciones de las moléculas explicadas anteriormente.

Riesgos: Su consentimiento para utilizar una biopsia de tendón en el presente proyecto no representará ningún riesgo para usted.

Costos: Su consentimiento para utilizar una biopsia de tendón en el presente proyecto no representará ningún costo para usted.

Beneficios: Los resultados de este estudio pueden traer mejoramientos en el diagnóstico y tratamiento de la patología y beneficiar a los pacientes con esta enfermedad a estudiar.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su consentimiento.

Confidencialidad: Toda información personal será conservada con estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional: Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos que pudiesen ser de utilidad en algún futuro tratamiento de su enfermedad.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información acerca de este estudio puede llamar a:

Académico Asesor Héctor Contreras Muñoz. PhD. .
Laboratorio de Andrología Celular y Molecular.
Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de
Medicina. Universidad de Chile. Independencia 1027. Casilla
70005, Santiago. Chile.
Fonos: 678 6863 / 6861. Fax: 777 6916.
E-mail: hcontrer@med.uchile.cl

Asesor Clínico: Dr. Manuel Brañes
Ortopedia y Traumatología.
Clínica Arauco Salud.
Profesor Adjunto
Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
F: 229 9202

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para autorizar el uso de una biopsia de tendón en el proyecto **Evaluación del efecto de tratamiento con ondas de choque extracorpóreas en tendinopatías del mango rotador en el hombre.**

Nombre del sujeto Firma Fecha

Nombre de informante Firma Fecha

Dr. Julián Brañes
Nombre del investigador Firma Fecha

Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



18 OCT. 2010

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 18 OCT. 2010

PROYECTO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTO CON ONDAS DE CHOQUE EXTRACORPÓREAS EN TENDINOPATÍAS DEL MANGO ROTADOR EN EL HOMBRE

INVESTIGADOR RESPONSABLE: SR. JULIÁN BRAÑES

INSTITUCIÓN: PROYECTO DE TESIS PROG. DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS CON MENCIÓN FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Con fecha 12 de octubre de 2010, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada con fecha 27 de septiembre de 2010. Se adjunta aprobación del Consentimiento Informado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



18 OCT 2010

INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

NOMBRE	CARGO	RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Sra. Marianne Gaudlitz	Vicepresidente	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dr. Leandro Biagini	Miembro	Sí
Dra. Lucia Cifuentes	Miembro	Sí
Sra. Nina Horwitz	Miembro	Sí
Dra. María Eugenia Pinto	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No

Santiago, 13 de octubre de 2010.


Dr. Manuel Oyarzún G.
Presidente

MOG/mva
c.c: Archivo Proy. N°094-2009.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: celha@med.uchile.cl

