

Advancing tendon-to-bone enthesis repair

Citation for published version (APA):

Peniche Silva, C. J. (2024). *Advancing tendon-to-bone enthesis repair: from biomimetic materials to microRNA modulation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240417cs>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20240417cs](https://doi.org/10.26481/dis.20240417cs)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 9

Public Summary

PUBLIC SUMMARY

Tendons connect muscle to bone and therefore, they are of paramount importance for the movement and the stabilization of joints. The interphase tissue connecting muscles and tendons is called myotendinous junction, and the interphase between tendons and bones is called enthesis. The tendon-to-bone enthesis is perhaps one of the most challenging interphase tissues to study and treat upon injury. This is due to the fact that the enthesis connects two tissues with very different mechanical properties.

The soft-to-hard transition found at the tendon-to-bone enthesis consists of opposite gradients of collagen alignment and mineralization that allow for a smooth stress transfer from tendons to bone. However, the physiology of the tendon-to-bone enthesis makes this tissue often a site of injury. Unfortunately, the healing process of the enthesis often yields scar tissue with poor mechanical properties, which increases the chance of re-injury of the affected tissue.

The currently available therapies and surgical approaches to treat enthesis injuries suffer from significant failure rates and patients from tendon or enthesis injuries are likely to suffer from re-injuries in the future, even after surgical intervention to reintegrate the tendon to the bone.

Advances in tissue engineering offer the hope of developing novel strategies to enhance the regeneration of the tendon-to-bone attachment site while minimizing scar formation and maximizing the recapitulation of the native morphological and mechanical features of the injured tissue. In **Chapter 2** of this book, we summarized the state of the art in terms of current tendon and enthesis therapies and the use of biomaterials to enhance and promote the healing and regeneration of the enthesis. Furthermore, we stress the potential of silk biomaterials in tendon- and enthesis-tissue engineering applications. Silk is an attractive biocompatible and cost-effective biomaterial with mechanical properties comparable to those of the tendon. Additionally, silk-based biomaterials can be combined with other elements and materials to create hybrid constructs to improve biocompatibility and to better mimic the micro- and macro-environment of the tendon-to-bone attachment site. However, in our bodies, we count hundreds of tendon-to-bone entheses, each one of them with highly specialized morphology, specifically tailored for their anatomical localization and physiology. Thus, in **Chapter 3** we investigated the mechanical properties, histological features, and gene expression levels of several tendon and enthesis markers in three of the most clinically relevant anatomical localizations of enthesis injury. By doing so, we improved our understanding of the biology and morphology of the native tissue at the supraspinatus enthesis,

the patellar tendon enthesis, and the Achilles tendon enthesis. Moreover, from such characterization, we selected the patellar tendon enthesis as our model for future enthesis studies. This selection was mostly based on the adequate mechanical properties of the enthesis at this localization and the large cross-sectional area of the tendon-to-bone insertion site, which facilitated the handling and access to the tissue.

Following the characterization of the three different anatomical localizations, we investigated the regeneration of a tendon-to-bone attachment in a rodent model for enthesis regeneration. This is described in **Chapter 4**. There, a defect was created in rat patellar enthesis and subsequently treated with two versions of a biphasic silk fibroin scaffold. The scaffolds were designed to mimic the tendon-to-bone transition. However, one scaffold exhibited a smooth, interconnected transition between the phases, similar to the native transition characteristic of the healthy patellar enthesis while the second version showed an abrupt transition. The results of this *in vivo* study unequivocally demonstrated the superior capacity of the silk fibroin scaffold with the interconnected transition between the phases to promote the effective healing of the injured patellar enthesis in comparison to the scaffold with the abrupt transition. Hence, demonstrating the relevance of the morphological cues in the healing and regeneration of interphase tissues.

After demonstrating the positive effects that a biomimetic scaffold has in the process of healing and regeneration of an injured enthesis, we decided to research molecular cues that could further aid the regeneration of the enthesis. For this purpose, we dedicated **Chapter 5** to investigate the early healing response of an injured patellar enthesis. We looked into the development of fibrosis at the site of the injury and more specifically, into the potential role of microRNAs (miRNAs) in the regulation of fibrosis and the healing response. MicroRNAs are powerful epigenetic regulators of gene expression and they are known to intervene in many pathways and biological processes. By looking into the expression patterns of fibrosis-related miRNAs, we described a set of at least 13 miRNAs that were dysregulated within the first 10 days after an enthesis injury. Furthermore, target prediction analysis revealed that these miRNAs have the potential to regulate the mRNA expression of several tendon and enthesis markers. From this set of miRNAs, we selected one of the most dysregulated ones, miR-16-5p to investigate its potential use in tendon and enthesis healing applications.

In **Chapter 6**, we loaded a tendon-mimetic magnetic-responsive GelMa hydrogel with mimics or inhibitors of miR-16-5p and human mesenchymal stem cells (hMSCs). We then investigated the expression patterns of its direct target SMAD3 on the encapsulated cells. The 3D-transfections with the miR-16-5p mimic resulted in the sustained downregulation of SMAD3, whilst transfections with the

miR-16-5p inhibitor resulted in the upregulation of this target gene. Moreover, the presence of miR-16-5p mimics promoted the sustained upregulation of key tendon markers such as tenomodulin, tenascin-C, and decorin while decreasing the expression of collagen III. The opposite pattern was observed when the encapsulated cells were transfected with the miR-16-5p inhibitor. The results from this chapter highlight a probable tenogenic role for miR-16-5p that should be further investigated.

All in all, the work comprised in this thesis delves into the intricate world of tendons and entheses healing and the role of different morphological and molecular cues in the healing and regeneration process. The results herein described not only deepen our understanding of the healing mechanisms in play at the tendon and in particular the entheses upon injury, but also pave the way for innovative tissue engineering solutions to address their injuries and enhance their regeneration.

CHAPTER 9

Publieke Samenvatting

PUBLIEKE SAMENVATTING

Pezen verbinden spieren met botten en zijn daarom onontbeerlijk voor de beweging en de stabilisatie van gewrichten. Het weefsel dat spieren en pezen verbindt, wordt myotendineuze verbinding genoemd, en de interfase tussen pezen en botten wordt entheses genoemd. De pees-bot-entheses is misschien wel een van de meest uitdagende interfase-weefsels om te bestuderen en te behandelen bij letsels. Dit komt door het feit, dat de entheses twee weefsels met zeer verschillende mechanische eigenschappen verbindt.

De overgang van zacht naar hard bij de pees-bot-entheses bestaat uit tegengestelde gradiënten van collageen-architectuur en mineralisatie, die een soepele spanningsoverdracht van pezen naar bot mogelijk maken. De fysiologie van de pees-bot-entheses zorgt er echter voor, dat dit weefsel vaak verwond wordt. Helaas levert het genezingsproces van de entheses vaak littekenweefsel op met slechte mechanische eigenschappen, wat de kans op hernieuwd letsel van het aangetaste weefsel vergroot.

De momenteel beschikbare therapieën en chirurgische oplossingen voor de behandeling van enthesesletsels hebben een aanzienlijk percentage mislukkingen. Patiënten met pees- of enthesesletsels zullen in de toekomst waarschijnlijk opnieuw letsels oplopen, zelfs na een chirurgische ingreep om de pees en het bot te reintegreren.

Vooruitgang op het gebied van weefselmanipulatie biedt de hoop nieuwe strategieën te ontwikkelen om de regeneratie van de pees-bot-aanhechtingsplaats te verbeteren, terwijl littekenvorming wordt geminimaliseerd en het herstel van de oorspronkelijke morfologische en mechanische kenmerken van het beschadigde weefsel wordt gemaximaliseerd. In **hoofdstuk 2** van dit boek hebben we de stand van zaken samengevat betreffende de huidige pees- en entheses-therapieën en het gebruik van biomaterialen om de genezing en regeneratie van de entheses te bevorderen. Bovendien benadrukken we het potentieel van zijdebismaterialen in het tissue engineering van pees- en enthesesweefsel. Zijde is een aantrekkelijk biocompatibel en kosteneffectief biomateriaal met mechanische eigenschappen, die vergelijkbaar zijn met die van de pees. Bovendien kunnen op zijde gebaseerde biomaterialen worden gecombineerd met andere elementen en materialen om hybride constructies te creëren om de biocompatibiliteit te verbeteren en om de micro- en macro-omgeving van de pees-bot-overgang beter na te bootsen. In ons lichaam tellen we echter honderden pees-bot-entheses, elk met een zeer gespecialiseerde morfologie, specifiek afgestemd op hun anatomische lokalisatie en fysiologie. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** de mechanische eigenschappen, histologische

kenmerken en genexpressieniveaus van verschillende pees- en enthesemarkers onderzocht in drie van de meest klinisch relevante anatomische lokalisaties waar letsel van entheses voorkomt. Door dit te doen, verbeterden we ons begrip van de biologie en morfologie van het natuurlijke entheseweefsel van de supraspinatus-entheses, de patellapees-entheses en de achillespees-entheses. Bovendien hebben we op basis van deze karakterisering de patellapees-entheses geselecteerd als ons model voor toekomstige enthesestudies. Deze selectie was grotendeels gebaseerd op de adequate mechanische eigenschappen van de entheses op deze lokalisatie en het grote dwarsdoorsnedeoppervlak van de pees-bot-entheses, wat het hanteren van en de toegang tot het weefsel zal vergemakkelijken.

Na de karakterisering van de drie verschillende anatomische lokalisaties onderzochten we de regeneratie van een pees-bot-aanhechting in een knaagdiermodel voor entheseregeneratie. Dit wordt beschreven in **hoofdstuk 4**. Daar werd een defect gecreëerd in de patella-entheses van ratten en vervolgens behandeld met twee versies van een bifasische zijde-fibroïne-implantaat. De implantaten zijn ontworpen om de overgang van pees naar bot na te bootsen. Eén implantaat vertoonde echter een vloeiende, onderling verbonden overgang tussen de fasen, vergelijkbaar met de oorspronkelijke overgang, die kenmerkend is voor de gezonde patella-entheses, terwijl de tweede versie een abrupte overgang vertoonde. De resultaten van dit *in vivo* onderzoek hebben ondubbelzinnig het superieure vermogen aangetoond van het zijde-fibroïne-implantaat met de onderling verbonden overgang tussen de fasen om de effectieve genezing van de beschadigde patella-entheses te bevorderen in vergelijking met het implantaat met de abrupte overgang. Hiermee wordt de relevantie van de morfologische opbouw voor de genezing en regeneratie van interfase-weefsels aangetoond.

Nadat we de positieve effecten hadden aangetoond, die een biomimetisch implantaat heeft in het proces van genezing en regeneratie van een beschadigde entheses, besloten we moleculaire signalen te onderzoeken die de regeneratie van de entheses verder zouden kunnen helpen. Voor dit doel hebben we **hoofdstuk 5** gewijd aan het onderzoeken van de vroege genezingsreactie van een beschadigde patella-entheses. We hebben gekeken naar de ontwikkeling van fibrose op de plaats van het letsel en meer specifiek naar de potentiële rol van microRNA's (miRNA's) in de regulatie van fibrose en de genezingsreactie. MicroRNA's zijn krachtige epigenetische regulatoren van genexpressie en het is bekend dat ze ingrijpen in veel routes en biologische processen. Door te kijken naar de expressiepatronen van fibrose-gerelateerde miRNA's, beschreven we een reeks van ten minste 13 miRNA's die binnen de eerste 10 dagen na een enthesesbeschadiging ontregeld waren. Bovendien onthulde de analyse van mogelijke mRNA doelwitten, dat deze miRNA's het potentieel hebben om de mRNA-

expressie van verschillende pees- en enthesemarkers te reguleren. Uit deze reeks miRNA's hebben we een van de meest ontregelde miRNA's geselecteerd, miR-16-5p, om het potentiële gebruik ervan bij toepassingen voor pees- en entheseregeneratie te onderzoeken.

In **hoofdstuk 6** hebben we een pees-imiterende, magnetisch reagerende GelMa-hydrogel beladen met imitatiemoleculen of remmers van miR-16-5p en humane mesenchymale stamcellen (hMSCs). Vervolgens onderzochten we de expressiepatronen van het directe doelwit SMAD3 op de ingekapselde cellen. De 3D-transfecties met de miR-16-5p-imitatie resulteerden in de aanhoudende onderdrukking van SMAD3, terwijl transfecties met miR-16-5p-remmer resulteerden in de versterkte expressie van dit doelgen. Bovendien bevorderde de aanwezigheid van miR-16-5p-imitatie de aanhoudende expressie van belangrijke peesmarkers zoals tenomoduline, tenascin-C en decorine, terwijl de expressie van collageen III werd verminderd. Het tegenovergestelde patroon werd waargenomen, toen de ingekapselde cellen werden getransfecteerd met de miR-16-5p-remmer. De resultaten uit dit hoofdstuk benadrukken een waarschijnlijke tenogene rol voor miR-16-5p, die verder onderzocht moet worden.

Al met al duikt het werk in dit proefschrift in de ingewikkelde wereld van pezen en bekrachtigt genezing en de rol van verschillende morfologische en moleculaire signalen in het genezings- en regeneratieproces. De hierin beschreven resultaten verdiepen niet alleen ons begrip van de genezingsmechanismen die een rol spelen bij de pees en in het bijzonder de enthesen bij letsels, maar maken ook de weg vrij voor innovatieve oplossingen voor weefselmanipulatie om verwondingen aan te pakken en weefselregeneratie per se te verbeteren.

