



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

[] Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Patologia

Regeneración de cartílago mediante el uso de células madre de pulpa dental humanas (hDPSCs)

María Oliver Ferrándiz

Directores:

Manuel Mata Roig

José Javier Martín de Llano

Programa de Doctorado en Medicina

Tesis doctoral, Valencia, noviembre 2020

TÍTULO DEL PROYECTO:

“Regeneración de cartílago mediante el uso de células madre de pulpa dental humanas (hDPSCs)”

DATOS DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN

Programa de Doctorado: 3139 MEDICINA

Línea de investigación: Histopatología e Ingeniería Tisular

DATOS DEL DOCTORANDO:

Apellidos: Oliver Ferrándiz

Nombre: María

D.N.I.: 48591810D

e-mail: oliverferrandizmaria@gmail.com

CODIRECTORES:

1- Manuel Mata Roig D.N.I.: 48341227B

Departamento: Patología

Centro: Facultad de medicina y odontología

2- José Javier Martín de Llano D.N.I.: 50698273V

Departamento: Patología

Centro: Facultad de medicina y odontología

D. **Manuel Mata Roig**, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València.

D. **José Javier Martín de Llano**, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Regeneración de cartílago mediante el uso de células madre de pulpa dental humanas (hDPSCs)”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **María Oliver Ferrándiz**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en

Valencia, a 17 de Noviembre de 2020.

Firmado:



Manuel Mata Roig



José Javier Martín de Llano

Para mí estos 5 años han sido probablemente de los mejores que he vivido en mi vida.

Si respiro y pienso en cómo era hace 5 años me doy cuenta que realmente soy una persona muy diferente tanto profesional como personalmente. Y por ello estoy inmensamente agradecida. Pero realmente todo lo vivido no tiene sentido sin todas esas personas que han formado parte de esos 5 años, que han estado junto a mí y me han ayudado, enseñado, apoyado, inspirado y confiado en mí.

Primero quiero agradecer a personas de los servicios de la universidad, con los que he tenido que contar durante la tesis y que han sido de gran ayuda; a Bea y Lupe por su paciencia y gran trabajo en cada medida que hacíamos en el citómetro; a Eva y Ana por enseñarme tanto y tan bien en nuestros encuentros en el animalario, sois muy bonitas y me ha encantado aprender de vosotras el buen trato de los animales en investigación.

He podido conocer a muchísima gente que ha pasado por el laboratorio durante todo este tiempo, y siempre ha sido un placer ayudar, enseñar y compartir momentos entre células y formol. Entre ellos se encuentran Javi y Néstor, doctorandos que han sufrido el mismo proceso que yo y siempre me han escuchado. También mis pequeñas Irene y Sara, estudiantes de TFG y TFM, os tengo adoración y os echo mucho de menos; y mis estudiantes de medicina favoritas, Nadia y Zaida, que vinieron para aprender y casi 4 años nos unen ya, vais a ser unas médicas maravillosas y reivindicativas, no puedo más

AGRADECIMIENTOS

que agradeceremos tantos ratos juntas y lo mucho que me habéis escuchado.

Sin duda hay personas que han estado cada día en ese lugar que tanto adoro, mi amado laboratorio, donde siempre que entro me encuentro como en mi casa, y donde he hecho muy buenos amigos. A Gema, millones de gracias por aguantarme, y aconsejarme tantas veces, por tus sonrisas por los pasillos y los almuerzos juntas. A Bea, por tus maravillosos abrazos que recargan de energía y amor, y por ayudarme tantísimo con la biología molecular, cuanta paciencia y cuanto me has enseñado mi cari. A Zaka, que aunque hace poco que nuestras vidas se han cruzado, me llenas los días de alegría y risas, enseñarte y pasar las horas junto a ti está siendo maravilloso. A Teresa (profe) gracias por los empujones y las sesiones de psicología, eres maravillosa. A Zahara, sin la cual algunas ideas y protocolos no serían posible, me has inspirado muchísimo y he aprendido una barbaridad de ti, espero seguir haciéndolo mucho tiempo. A Teresa, cuanto tiempo aprendiendo de ti, observándote y admirándote, no he conocido nunca una persona tan fiel a sus valores y principios, eres única. Y a Rubén, empezamos este camino juntos y aquí seguimos, cuantos dolores de cabeza hemos superado, cuantas risas, momentos frikis y portas voladores hemos compartido, cuanto hemos aprendido el uno del otro, simplemente gracias por todo.

Dentro de las personas de las cuales he aprendido muchísimo se encuentran los excepcionales profesores que pertenecen al departamento de morfología e histopatología. Amparo y Maria, gracias por vuestra sabiduría histológica y la paciencia enseñando a

una biotecnóloga. Y a Carmen, mil gracias por cada cosa que he aprendido de ti, que han sido muchas, pero sobre todo por las oportunidades que me has brindado durante todo este tiempo, infinitamente agradecida.

A Javier, codirector de mi tesis, un sabio de las células madre de pulpa dental entre otras cosas, muchísimas gracias por enseñarme tan bien como cuidar de estas maravillosas células, por tus enfoques, tus correcciones minuciosas que tanto me han ayudado y tus consejos en esta larga investigación.

No voy a negar que en muchos momentos ha sido duro, que he querido rendirme y cambiar de rumbo, que he tenido miedo de las decisiones que he ido tomando y he dudado de mi misma. Pero aun con todo eso, he sido muy feliz.

He sido tan feliz porque he aprendido muchísimo, he sido capaz de superarme como profesional, he encontrado trabas y problemas en el camino pero he podido solucionarlas o cambiar el enfoque. He sido tan feliz porque he conseguido cumplir un objetivo que había tenido que suprimir de mi lista de cosas que hacer en la vida. Pero la vida da muchas vueltas y a mi hace 5 años me llevó a la puerta de un despacho, un tanto enfadada, con ese carácter que me caracteriza y decidida a hablar con el profesor que no respondía a mis emails.

Y allí comenzó todo. Y cada día doy gracias al universo por haberme llevado a esa puerta. Porque ese día mi vida cambió radicalmente y nunca podre agradecer suficiente todo lo que me habéis dado. No puedo explicar muy bien lo que siento por la familia Mata-Milián, pero

AGRADECIMIENTOS

desde luego si algo sé después de estos 5 años, es que para mí sois mucho más que unos buenos amigos, sois la familia más maravillosa y genial que he conocido nunca (después de la mía), en definitiva os habéis convertido en parte de mi familia. De sobra sabéis que quiero y adoro a vuestros hijos como si fueran mis sobrinos, que los voy a consentir todo lo que quiera el resto de mi vida, y que haría cualquier cosa por ellos.

Santi, Pedro, Manuel y mi bolita de queso Alberto, siento muchísimo las múltiples veces que he requerido la atención de vuestros padres durante estos años, al fin voy a liberarlos, pero desde luego no dudéis ni un segundo que no os vais a poder librar de mi tan fácilmente, aquí tenéis a la tía Marieta (y a Nacho claro está) para lo que sea, siempre!

Lara, es infinito mi agradecimiento. Por todo lo que me has enseñado, que ha sido prácticamente todo; por la paciencia que has tenido; por las alegrías que hemos vivido juntas y también los momentos más bajoneros; por nuestras palabras inventadas; por aguantar mis neuras, locuras y mis dramas; por ser como eres: genial, maravillosa y genuina, GRACIAS AMIGA.

Manolo, eres un ser de luz y una de mis personas favoritas en el mundo. Te admiro como profesional y como persona. Si me paro a pensar en cuantas veces en estos 5 años te he sacado de quicio, cuantas veces he sido pesada como ninguna, me has dejado ganar discusiones, he llorado y me has tenido que consolar o hacerme ver tantas y tantas cosas que a veces no veo, cuantas veces has tenido que ayudarme a continuar en este duro camino. Has sido mi guía, mi

inspiración y desde luego siempre serás mi mentor y mi ejemplo a seguir. Cuan agradecida estoy a ese preciso instante en el que entré enfadada a tu despacho, tú soltaste una carcajada y mi vida cambio. Has logrado que evolucione muchísimo como investigadora, porque has confiado en mí y me has dejado probar, equivocarme y buscar la solución. Pero lo mejor que me llevo sin duda, además de formar parte de tu vida, es que has hecho que entienda lo que realmente importa, que comprenda que en un mundo un tanto oscuro se puede encontrar personas de luz, buenas, justas y con un corazón inmenso. Estoy casi segura, que si no hubieras entrado en mi vida, ahora mismo mi historia sería muy diferente. Darte las gracias siempre me va a parecer poco, así que no puedo hacer otra cosa que dedicarte el trabajo más grande que he hecho hasta ahora, esta tesis.

Confío en que nuestros caminos no se separen nunca, que podamos trabajar codo con codo el máximo tiempo posible y podamos celebrar el resto de nuestra vida juntos.

Y si la parte académica-profesional ha sido importante, la parte personal no se queda corta en mi caso. No sé qué habría sido de mí sin unos amigos que me escuchan divagar aunque no me entienden todas las veces, o sin una gran familia que se enorgullece de cada movimiento que hago, preocupándose siempre de que sea feliz. Gracias universo por ponerme en una familia tan bonita y que tanto se preocupan unos por otros y se quieren incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi bancrest favorito y mis asociadas preferidas, por soportar los 5 años, pero sobre todo por el apoyo de esta última etapa, os quiero infinito.

A mis tíos, gracias por cuidarme toda mi vida, os amo y adoro con devoción. Y a mis primos, ojala nunca dejemos de compartir nuestras vidas porque me llena de felicidad cada vez que estamos todos juntos.

A mi tía Bego, mi padre y mis hermanos del alma, gracias por mirarme siempre con tanto orgullo y amor, por quererme como soy, y formar parte de cada momento de mi vida, pocas personas entienden de lo que hemos sido capaces generando este vínculo tan especial, para mi sois indispensables.

A mi yayi, que me ha enseñado tanto en la vida, me ha cuidado y amado con todos mis defectos y virtudes. Ojala fueras eterna.

A mi bonita Ángela, la persona más fuerte que conozco en el mundo entero, de la que siempre estoy orgullosa, que ha estado en mis peores momentos, siempre ha creído en mí y me dice las cosas sin miramientos. No sé qué haría sin ti, gracias por absolutamente todo tía.

A dos personas con las que he compartido probablemente más del 75% de mi vida, mi Bea y mi Vicky. Sabéis de sobre lo que significáis para mí, cuanto os amo, y lo agradecida que estoy por ser vuestra hermana e hija. Sin vosotras todo esto no habría sido posible, ya que me empujasteis a tomar la decisión y siempre habéis apoyado cada

paso que he dado. Sé que soy quien soy gracias a vosotras. Os amo hasta la luna y volver.

Y por último pero no menos importante, a mi N, mi amor, la persona que entró en mi vida justo antes de empezar este camino, con la que he compartido cada día desde entonces, creando una familia con nuestra Leia (que tantos ratos ha estado sentada junto a mí y mi ordenador), y embarcándonos en un camino juntos. Siento muchísimo todo lo que has tenido que aguantar, que muchas veces no me hayas entendido y las formas nos hayan perdido, sé que a veces ha sido difícil, pero también sé que sin tu empuje y motivación estar aquí hoy sería imposible. Gracias por creer en mi por los dos y luchar siempre por nosotros, sabes de sobra que esto no se para, y que nuestra aventura no ha hecho más que empezar. Os quiero con todo mi corazón a los dos.

En resumen, GRACIAS universo por todas estas personas que forman parte de mi vida, y han estado junto a mi durante esta fase, ahora toca empezar una etapa nueva, confío que igual o más feliz.

¡Que la fuerza nos acompañe!

Marieta

“Todos nuestros sueños pueden convertirse en realidad si tenemos la valentía de perseguirlos”. W. Disney

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por las subvenciones MAT2016-76039-C4-2-R (investigadora principal María Sancho-Tello Valls) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España y por la subvención PI16-01315 del ISCIII (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, España, investigador principal Manuel Mata Roig).

RESUMEN

Introducción: el tejido cartilaginoso es un tejido fundamental, puesto que proporciona sostén a nuestro organismo. Cuando el cartílago articular se lesiona experimenta una regeneración compleja y limitada. Por ello es importante buscar alternativas y ampliar las soluciones que se están utilizando actualmente para tratar enfermedades en las que se produce la alteración del cartílago articular, como la osteoartritis. Con la base en esta idea, recientemente la ingeniería tisular ha desarrollado distintas herramientas para tratar de regenerar el cartílago cuando la regeneración por otras vías no es posible. Dentro de las estrategias que existen, se ha potenciado el uso de hidrogeles combinados con condrocitos y/o células madre de diferentes orígenes.

Objetivo: nuestro objetivo en este trabajo fue diseñar un constructo basado en un hidrogel, inicialmente de alginato y posteriormente una mezcla de alginato-agarosa, combinado con condrocitos o células madre de pulpa dental humanas (hDPSCs), con capacidad de inducción condrogénica.

Material y métodos: se aislaron y caracterizaron condrocitos primarios y células madre de pulpa dental humanas. Se puso a punto un sistema de cultivo que favoreciese la diferenciación condral, primero en dos dimensiones y después en tres dimensiones. Se fabricaron y caracterizaron biológica y biomecánicamente hidrogeles de alginato y copolímeros de alginato-agarosa. Se optimizó el cultivo de condrocitos

y hDPSCs en dichos soportes y se evaluó tanto en un modelo animal como *in vitro* la capacidad regenerativa de los mismos.

Conclusión: los resultados presentados indican el potencial condrogénico de las hDPSCs como alternativa a los condrocitos primarios para la regeneración condral. Así mismo, proponemos un constructo basado en un copolímero alginato-agarosa con propiedades biomecánicas adecuadas para ser utilizado en modelos de regeneración de cartílago articular.

PALABRAS CLAVE: agarosa, alginato, cartílago articular, células madre de pulpa dental humanas, condrocitos, hidrogel, ingeniería tisular, osteoartritis.

RESUM

Introducció: el teixit cartilaginós és un teixit fonamental, ja que proporciona sustentació al nostre organisme. Quan el cartílag articular es lesiona experimenta una regeneració complexa i limitada. Per això és important buscar alternatives i ampliar les solucions que s'estan utilitzant actualment per a tractar malalties en les quals es produeix l'alteració del cartílag articular, com la osteoartritis. Amb la base en aquesta idea, recentment l'enginyeria tissular ha desenvolupat diferents eines per a tractar de regenerar el cartílag quan la regeneració per altres vies no és possible. Dins de les estratègies que existeixen, s'ha potenciat l'ús d'hidrogels combinats amb condrocits i/o cèl·lules mare de diferents orígens.

Objectiu: el nostre objectiu en aquest treball va ser dissenyar un constructe basat en un hidrogel, inicialment d' alginat i posteriorment una mescla d' alginat-agarosa, combinat amb condrocits o cèl·lules mare de polpa dental humanes (hDPSCs), amb capacitat d'inducció condrogénica.

Material i mètodes: es van aïllar i van caracteritzar condrocits primaris i cèl·lules mare de polpa dental humanes. Es va posar a punt un sistema de cultiu que afavorira la diferenciació condral, primer en dues dimensions i després en tres dimensions. Es van fabricar i van caracteritzar biològica i biomecànicament hidrogels d'alginat i copolímers d'alginat-agarosa. Es va optimitzar el cultiu de condrocits i

hDPSCs en aquests suports i es va avaluar tant en un model animal com in vitro la capacitat regenerativa d'aquests.

Conclusió: els resultats presentats indiquen el potencial condrogénic de les hDPSCs com a alternativa als condrocits primaris per a la regeneració condral. Així mateix, proposem un constructe basat en un copolímer alginat-agarosa amb propietats biomecàniques adequades per a ser utilitzat en models de regeneració de cartílag articular.

PARAULES CLAU: agarosa, alginat, cartílag articular, cèl·lules mare de polpa dental humanes, condrocits, hidrogel, enginyeria tissular, osteoartritis.

ABSTRACT

Introduction: cartilage tissue is a fundamental tissue, since it provides support to our body. When the articular cartilage is injured it undergoes complex and limited regeneration. For this reason, it is important to look for alternatives and expand the solutions that are currently being used to treat diseases in which the alteration of the articular cartilage occurs, such as osteoarthritis. Based on this idea, tissue engineering has recently developed different tools to try to regenerate cartilage when regeneration by other means is not possible. Among the existing strategies, the use of hydrogels combined with chondrocytes and / or stem cells of different origins has been promoted.

Objective: our objective in this work was to design a construct based on a hydrogel, then alginate and later an alginate-agarose mixture, combined with chondrocytes or human dental pulp stem cells (hDPSCs), with chondrogenic induction capacity.

Material and methods: primary chondrocytes and stem cells from human dental pulp were isolated and characterized. A culture system was developed to favor chondral differentiation, first in two dimensions and then in three dimensions. Alginate hydrogels and alginate-agarose copolymers were biologically and biomechanically characterized and manufactured. The culture of chondrocytes and hDPSCs on said supports was optimized and their regenerative capacity was evaluated both in an animal model and in vitro.

Conclusion: the results send indicate the chondrogenic potential of hDPSCs as an alternative to primary chondrocytes for chondral regeneration. Likewise, we propose a construct based on an alginate-agarose copolymer with suitable biomechanical properties to be used in joint cartilage regeneration models.

KEY WORDS: agarose, alginate, articular cartilage, human dental pulp stem cells, chondrocytes, hydrogel, tissue engineering, osteoarthritis.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Aparato locomotor. Sistema articular | 3 |
| 1.1.1. Definición..... | 3 |
| 1.1.2. Diartrosis | 5 |
| 1.1.3. Componentes de las diartrosis..... | 8 |
| 1.2. Tejido cartilagenoso..... | 14 |
| 1.2.1. Componente celular | 17 |
| 1.2.2. Matriz condral..... | 19 |
| 1.2.3. Pericondrio | 21 |
| 1.2.4. Organización..... | 23 |
| 1.2.5. Condrogénesis, crecimiento y regeneración condral | 25 |
| 1.3. Cartílago articular..... | 28 |
| 1.3.1. Organización..... | 29 |
| 1.4. Patologías del cartilago articular..... | 35 |
| 1.4.1. Osteoartritis articular..... | 35 |
| 1.4.2. Lesiones condrales..... | 40 |
| 1.5. Tratamiento de las lesiones condrales | 42 |
| 1.6. Ingeniería tisular del cartílago articular..... | 47 |
| 1.6.1. Estrategias terapéuticas..... | 48 |
| 1.6.2. Biomateriales utilizados para regeneración condral..... | 52 |
| 1.6.2.1. Colágeno..... | 57 |
| 1.6.2.2. Gelatina..... | 57 |
| 1.6.2.3. Fibrina..... | 58 |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1.6.2.4. Ácidos polilácticos (PLA) y poliglicólicos (PGA) | 59 |
| 1.6.2.5. Hialuronano..... | 60 |
| 1.6.2.6. Quitosano..... | 61 |
| 1.6.2.7. Agarosa..... | 62 |
| 1.6.2.8. Alginato..... | 63 |
| 1.6.2.9. Copolímeros | 66 |
| 1.6.3. Células utilizadas para regeneración condral | 68 |
| 1.6.3.1. Condrocitos y células condroprogenitoras | 68 |
| 1.6.3.2. Células madre mesenquimales (MSCs) | 70 |
| 1.6.3.2.1. Células madre de la medula ósea (BM- MSCs)..... | 71 |
| 1.6.3.2.2. Células madre adiposas (ADSCs) | 72 |
| 1.6.3.2.3. Células madre derivadas de la sangre del cordón umbilical (CB-MSCs)..... | 73 |
| 1.6.3.2.4. Células madre de sangre periférica (PB- MSCs)..... | 74 |
| 1.6.3.2.5. Células madre de membrana sinovial (SM- MSCs) y del líquido sinovial (SF-MSCs)..... | 75 |
| 1.6.3.2.6. Células madre de pulpa dental (DPSCs) | 76 |
| 1.6.4. Factores de crecimiento y diferenciación | 78 |
| 1.6.4.1. Familia de TGF- β | 80 |
| 1.6.4.2. Familia BMPs..... | 80 |
| 1.6.4.3. Familia FGFs..... | 82 |
| 1.6.4.4. Familia IGFs | 84 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 87 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 93 |
| 3.1. Material..... | 95 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.1. Medios y soluciones..... | 95 |
| 3.1.1.1. Medios..... | 95 |
| 3.1.1.2. Soluciones..... | 96 |
| 3.1.2. Reactivos | 98 |
| 3.1.3. Material Fungible | 110 |
| 3.1.4. Equipos y programas | 112 |
| 3.2. Métodos..... | 115 |
| 3.2.1. Diseño experimental..... | 115 |
| 3.2.2. Construcción de esferas de alginato..... | 117 |
| 3.2.3. Construcción de cilindros de alginato..... | 118 |
| 3.2.4. Construcción de constructos de alginato-agarosa..... | 118 |
| 3.2.5. Caracterización biomecánica de los hidrogeles fabricados..... | 119 |
| 3.2.6. Ensayos de citotoxicidad..... | 123 |
| 3.2.7. Aislamiento, cultivo y caracterización de hDPSCs..... | 124 |
| 3.2.8. Aislamiento y cultivo de condrocitos primarios..... | 129 |
| 3.2.9. Encapsulación de células en esferas de alginato | 130 |
| 3.2.10. Encapsulación de células en cilindros de alginato | 131 |
| 3.2.11. Encapsulación de células en constructos de alginato/agarosa..... | 132 |
| 3.2.12. Modelo de experimentación animal en lagomorfo.... | 134 |
| 3.2.13. Técnicas histoquímicas realizadas en constructos de alginato/agarosa..... | 136 |
| 3.2.14. Técnicas histoquímicas realizadas en el modelo de experimentación animal desarrollado en rodilla de conejo..... | 139 |

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| 3.2.15. Determinación inmunohistoquímica de colágeno tipo II en modelo experimental de conejo..... | 140 |
| 3.2.16. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y ACAN mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 2D..... | 141 |
| 3.2.17. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y ACAN mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 3D..... | 143 |
| 3.2.18. Extracción de RNA total de cultivos 2D..... | 144 |
| 3.2.19. Extracción de RNA total a partir de células encapsuladas en constructos de alginato/agarosa..... | 145 |
| 3.2.20. Síntesis de cDNA..... | 147 |
| 3.2.21. Preamplificación del cDNA..... | 148 |
| 3.2.22. <i>Real time</i> qPCR..... | 149 |
| 4. RESULTADOS..... | 155 |
| 4.1. Diseño y fabricación de constructo de alginato..... | 157 |
| 4.2. Aislamiento y caracterización de condrocitos primarios y de hDPSCs..... | 160 |
| 4.3. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y ACAN mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 2D..... | 163 |
| 4.4. Expresión génica relativa de genes implicados en diferenciación condral en cultivos bidimensionales de condrocitos primarios y de hDPSCs..... | 172 |
| 4.5. Cultivo de condrocitos y hDPSCs en esferas o cilindros de alginato..... | 177 |
| 4.6. Modelo de experimentación animal en lagomorfo..... | 180 |

| | |
|--|------------|
| 4.7. Caracterización biomecánica de los copolímeros alginato-agarosa | 186 |
| 4.8. Ensayos de citotoxicidad | 194 |
| 4.9. Cultivo de condrocitos y hDPSCs en constructos de alginato – agarosa | 201 |
| 4.10. Organización espacial y expresión de colágeno en condrocitos cultivados en constructos de alginato/agarosa..... | 204 |
| 4.11. Organización espacial y expresión de colágeno en hDPSCs cultivadas en constructo de alginato/agarosa | 207 |
| 4.12. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y ACAN mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 3D con condrocitos | 210 |
| 4.13. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y ACAN mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 3D con hDPSCs..... | 215 |
| 4.14. Citoarquitectura de condrocitos cultivados en hidrogeles | 219 |
| 4.15. Citoarquitectura de hDPSCs cultivadas en hidrogeles | 222 |
| 4.16. Expresión génica relativa de genes implicados en diferenciación condral en cultivos tridimensionales de alginato-agarosa con condrocitos primarios y hDPSCs | 224 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 229 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 251 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 257 |

ÍNDICE ABREVIATURAS

% - porcentaje/por cien

µg – microgramo

µl – microlitro

µm – micrómetro

18S – gen del 18s ribosomal

2D – 2 dimensiones

3D - 3 dimensiones

Å – armstrong (unidad de medida)

ACAN – gen agrecano

ACI - *autologous chondrocyte implantation*

ADAMTS - desintegrina y metaloproteinasa con motivos de tipo trombospondina

ADSCs - células madre adiposas

AMIC - *autologous matrix induced chondrogenesis*

AP - fosfatasa alcalina

BaCl₂ – cloruro de bario

B-ACT - gen beta actina

BM – médula ósea

BM-MSCs - células madre mesenquimales de la medula ósea

BMP - proteína morfogenética ósea

BSA – albúmina de suero bovino

Ca²⁺ - ion calcio

CaCl₂ – cloruro de calcio

CB-MSCs – células madre que recubren el hueso compacto

CD - cúmulo de diferenciación, antígenos o marcadores de superficie

cdNA – DNA complementario / ácido desoxirribonucleico complementario

CD-RAP - proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago

CHT – quitosano

cm – centímetros

cm² – centímetros cuadrados

CN - control negativo

CO₂ – dióxido de carbono

Col – colágeno

Col 11a2 – gen/proteína colágeno tipo 11, cadena alfa 2

COL I – colágeno de tipo I

COL II – colágeno de tipo II

COL10A1 – gen colágeno tipo 10 cadena alfa 1

COL1A1 - gen colágeno tipo 1, cadena alfa 1

COL2A1 - gen colágeno tipo 2, cadena alfa 1

COMP - proteína oligomérica del cartílago

CP - control positivo

DAPI - 4, 6-diamidino-2-fenilindol

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetill sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxinucleósidos trifosfato

DPSCs - células madre de pulpa dental

E - módulo de tracción

ECM –matriz extracelular

EDTA - ácido etilendiaminotetracético

FBS - *fetal bovine serum*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FGF - factor de crecimiento de fibroblastos

FGFR – receptor de la proteína FGF

FGFR-HS – receptor de heparán sulfato de la proteína FGF

fig. - figura

FITC - isotiocianato de fluoresceína

g - fuerza centrífuga relativa o fuerza g (RCF)

g - gramo

G - módulo de cizalladura

G' – módulo de almacenamiento

G'' – módulo de pérdidas

GAG – glucosaminoglucanos

GAPDH – gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

G-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos

h – horas

H₂O₂ – peróxido de hidrógeno

HA - ácido hialurónico

HCl – ácido clorhídrico

hDPSCs – células madre de pulpa dental humanas

HIF1A – gen codifica la subunidad alfa del factor 1 de transcripción inducible por hipoxia

HRP - peroxidasa de rábano

hWJ-MSCs - células madre humanas de la gelatina de Wharton

Hz – hercio

ICRS - *International Cartilage Repair Society*

IFN - interferón

IGF - factor de crecimiento similar a la insulina

IGFBPs - proteínas de unión IGF

IgG – inmunoglobulina G

IL – interleucina

ITS - insulina transferrina

kg – kilogramo

MACI - *matrix-assisted autologous chondrocyte implantation*

MEC – matriz extracelular

Mg²⁺ – ion magnesio

mg – miligramo

min – minuto

ml - mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

mm³ – milímetros cúbicos

MMP – proteínas metaloproteinasas

MMP1 – gen de la metaloproteinasa de matriz 1

MMP13 – gen de la metaloproteinasa de matriz 13

MMP2 – gen de la metaloproteinasa de matriz 2

MSCs – células madre mesenquimales

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazolio

NaCl – cloruro sódico

NAD - nicotinamida adenina dinucleótido

NaOH – hidróxido de sodio

N-CAM - molécula de adhesión celular neural

NEEA – aminoácidos no esenciales

nm – nanómetro

O₂ – Oxígeno

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OARSI - *Osteoarthritis Research Society International*

°C – grados Celsius

PB - sangre periférica

PBS - *phosphate Buffered Saline*

PCL - policaprolactona

PCR - reacción en cadena de la polimerasa

PGA – ácido poliglicólico

PLA - ácido poliláctico

PPARGC1 – gen *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*

rpm – revoluciones por minuto

RER – retículo endoplasmático rugoso

RNA – ácido ribonucleico

RT-PCR – reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RT-qPCR – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

RUNX1 – gen del factor de transcripción 1 de la familia RUNX.

SF-MSC – células madre del líquido sinovial

SMAD - proteínas homólogas a la proteína MAD de la mosca *Drosophila* y a la proteína SMA del nematodo *Caenorhabditis elegans*

SM-MSCs – células madre de la membrana sinovial

SNC – sistema nervioso central

Sox-5 – factor de transcripción SOX-5

Sox-6 - factor de transcripción SOX-6

Sox- 9 - factor de transcripción SOX-9

SPARC – gen que codifica la proteína asociada a la matriz, ácida y rica en cisteína

TGF- β – factor de crecimiento transformante beta

TIMP – proteínas inhibidoras de las metaloproteinasas de la matriz

TIMP1– gen de la familia TIMP, inhibidor de las metaloproteinasas de la matriz 1

TNF - factor de necrosis tumoral

UCIM - unidad central de investigación de la Facultat de Medicina i Odontologia de València

VEGFA – gen del factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Clasificación de las lesiones del cartílago articular según la gravedad..... | 42 |
| Tabla 2. Requisitos de una matriz..... | 53 |
| Tabla 3. Tipos de matrices según su naturaleza química | 55 |
| Tabla 4. Reactivos para el medio de proliferación de condrocitos ... | 99 |
| Tabla 5. Reactivos para el medio de proliferación de hDPSCs..... | 100 |
| Tabla 6. Reactivos para el medio de diferenciación condrogénica...100 | |
| Tabla 7. Reactivos utilizados en técnicas de cultivos celulares..... | 101 |
| Tabla 8. Reactivos utilizados para realizar la citometría de flujo..... | 102 |
| Tabla 9. Reactivos utilizados en las técnicas de fabricación de constructos y en el ensayo de citotoxicidad | 103 |
| Tabla 10. Reactivos utilizados para la inmunofluorescencia en 2D y 3D | 104 |
| Tabla 11. Reactivos utilizados en las técnicas histoquímicas..... | 105 |
| Tabla 12. Reactivos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica | 106 |
| Tabla 13. Reactivos utilizados para la extracción de RNA en 2D y en 3D, y para la RT-PCR..... | 107 |
| Tabla 14. Reactivos utilizados en la PCR Real Time Cuantitativa | 118 |
| Tabla 15. Material fungible utilizado en la presente tesis..... | 110 |
| Tabla 16. Equipos con su respectiva casa comercial empleados en los diferentes ensayos experimentales | 112 |
| Tabla 17. Programas con su respectiva casa comercial empleados en esta tesis..... | 114 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 18. Concentraciones de los biomateriales estudiados en el ensayo reológico | 122 |
| Tabla 19. Parámetros utilizados en el estudio reológico..... | 123 |
| Tabla 20. Marcadores de superficie utilizados en la tesis | 128 |
| Tabla 21. Genes estudiados en los diferentes ensayos de biología molecular | 150 |
| Tabla 22. Resultados citometría de flujo para hDPSCs..... | 161 |
| Tabla 23. Resultados estudio de viabilidad y apoptosis hDPSCs | 161 |
| Tabla 24. Resultados del estudio reológico de los diferentes constructos en el torque 50 | 188 |
| Tabla 25. Análisis histomorfométrico de condrocitos cultivados en constructo de alginato 3% - agarosa 1%..... | 221 |
| Tabla 26. Análisis histomorfométrico de hDPSCs cultivados en constructo de alginato 3% - agarosa 1%..... | 223 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Composición del cartílago | 16 |
| Figura 2. Cartílago articular de una articulación de un dedo (humano) | 34 |
| Figura 3. Vías de señalización y cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis | 39 |
| Figura 4. Diferencias entre una articulación normal, una con OA y otra con AR | 40 |
| Figura 5. Diferentes estrategias terapéuticas para la reparación de cartílago | 50 |
| Figura 6. Estructuras moleculares de biopolímeros..... | 66 |
| Figura 7. Secuencia de eventos que conducen a la diferenciación de MSCs hacia condrocitos | 79 |
| Figura 8. Reómetro utilizado para realizar el estudio reológico | 120 |
| Figura 9. Técnica histológica manual | 137 |
| Figura 10. Programa utilizado para la PCR..... | 147 |
| Figura 11. Morfología de esferas de alginato 3% | 158 |
| Figura 12. Morfología de cilindros de alginato 3% polimerizados con distintas concentraciones de CaCl_2 | 159 |
| Figura 13. Estudio del medio de diferenciación sobre los dos tipos celulares..... | 162 |
| Figura 14a. Tinción con faloidina-rodamina de cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 164 |
| Figura 14b. Inmunofluorescencia para Colágeno tipo I en cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 165 |

| | |
|--|-----|
| Figura 14c. Inmunofluorescencia para Colágeno tipo II en de cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 166 |
| Figura 14d. Inmunofluorescencia para Agrecano (ACAN) en de cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 167 |
| Figura 15a. Tinción con faloidina-rodamina de cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo | 168 |
| Figura 15b. Inmunofluorescencia para Colágeno tipo I en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 169 |
| Figura 15c. Inmunofluorescencia para Colágeno tipo II en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 170 |
| Figura 15d. Inmunofluorescencia para Agrecano (ACAN) en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo..... | 171 |
| Figura 16a. Resultados biología molecular del cultivo de condrocitos en 2 dimensiones | 174 |
| Figura 16b. Resultados biología molecular del cultivo de hDPSCs en 2 dimensiones..... | 176 |
| Figura 17a. Cultivo de condrocitos en alginato 3%..... | 178 |
| Figura 17b. Cultivo de hDPSCs en alginato 3%..... | 179 |
| Figura 18. Cirugía en rodillas de conejos..... | 181 |
| Figura 19. Estudio macroscópico de los defectos osteocondrales en conejo | 182 |
| Figura 20. Estudio histológico de los defectos osteocondrales..... | 185 |
| Figura 21. Reología de constructos de alginato y agarosa..... | 187 |
| Figura 22a. Módulo de almacenamiento (G') calculado de los diferentes constructos analizados | 191 |
| Figura 22b. Módulo de pérdidas (G'') calculado de los diferentes constructos analizados | 193 |

| | |
|--|-----|
| Figura 23a. Estudio citotóxico de diferentes concentraciones de CaCl_2 sobre las células | 196 |
| Figura 23b. Estudio citotóxico de los constructos sobre los condrocitos (barras negras)..... | 198 |
| Figura 23c. Estudio citotóxico de los constructos sobre las hDPSCs (barras blancas)..... | 200 |
| Figura 24a. Cultivo de condrocitos embebidos en constructos de 3% alginato - 1% agarosa..... | 202 |
| Figura 24b. Cultivo de hDPSCs embebidas en constructos de 3% alginato - 1% agarosa..... | 204 |
| Figura 25. Estudio histológico de constructos con condrocitos | 206 |
| Figura 26. Estudio histológico de constructos con hDPSCs | 209 |
| Figura 27. Estudio histomorfológico de constructos con condrocitos en medio de proliferación | 212 |
| Figura 28. Estudio histomorfológico de constructos con condrocitos en medio de diferenciación | 214 |
| Figura 29. Estudio histomorfológico de constructos con hDPSCs en medio de proliferación | 217 |
| Figura 30. Estudio histomorfológico de constructos con hDPSCs en medio de diferenciación | 219 |
| Figura 31. Imágenes representativas del estudio morfométrico del cultivo de condrocitos en constructo de alginato 3% - agarosa 1%.. | 221 |
| Figura 32. Imágenes representativas del estudio morfométrico del cultivo de hDPSCs en constructo de alginato 3% - agarosa 1%..... | 224 |
| Figura 33. Resultados de la biología molecular del cultivo en 3D | 227 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aparato locomotor. Sistema articular

1.1.1. Definición

El aparato locomotor es el conjunto de sistemas y tejidos que debido a su composición y disposición en los seres vivos les permite interactuar con el medio que les rodea mediante el movimiento o locomoción al mismo tiempo que les sirve de sostén y protección al resto de órganos del cuerpo. Su funcionamiento es posible gracias a la coordinación que le proporciona el sistema nervioso, generando y transmitiendo las órdenes motoras.

Este aparato está compuesto por la interacción de dos componentes diferentes. Por un lado, una parte pasiva que está formada por diferentes tipos de tejido conjuntivo y de sostén, entre ellos los huesos, las articulaciones y los ligamentos, es decir el denominado sistema osteoarticular. Por otro lado, una parte activa compuesta por el sistema muscular, donde los tendones proporcionan la unión entre los músculos esqueléticos y los huesos.

Ambas partes están secundadas por órganos asistentes que pertenecen a los sistemas vascular y nervioso, pero que también corresponden a estructuras sensoriales y a componentes del sistema endocrino (1).

Las articulaciones (latín: *articulatio*, partes unidas de un todo) son elementos constituyentes del componente pasivo del sistema locomotor las cuales permiten la unión entre dos huesos o entre un hueso y un cartílago (2). Podemos distinguir dos tipos de articulaciones: sinartrosis y diartrosis. Las sinartrosis (griego: *syn*, junto a; *athros*, articulación) se conocen también como falsas articulaciones, dado que vinculan de forma continua los elementos esqueléticos, uniéndolos mediante un tejido de relleno (el tejido conjuntivo o tejido cartilaginoso) de modo que solo permite movimientos escasos (1). En función de la naturaleza de dicho tejido, podemos distinguir cinco subtipos de sinartrosis como son las sindesmosis (conectadas por tejido conjuntivo fibroso denso no orientado), las sincondrosis (conectadas por tejido cartilaginoso), las sinostosis (tejido óseo) o las sínfisis (conectadas mediante una fina capa de cartílago hialino que recubre los extremos óseos articulados, unido mediante tejido conectivo muy fibroso, que penetra en el cartílago hialino por una zona de transición de cartílago fibroso) y la gonfosis (la articulación entre el diente y el hueso alveolar). Las diartrosis, por el contrario, vinculan elementos óseos de manera discontinua, permitiendo movimientos libres de amplitudes diversas. Se denominan también articulaciones verdaderas o sinoviales, dado que los huesos que conectan

quedan separados por una cavidad denominada cavidad sinovial.

1.1.2. Diartrosis

Las diartrosis (griego: *dia*, separa; *arthros*, articulación) están formadas por tres elementos fundamentales, que incluyen a las superficies articulares cartilaginosas, la propia cavidad sinovial y una cápsula de tejido conjuntivo denso e irregular que se continua con el periostio adyacente y que permite la inserción de ligamentos (1). Anatómicamente son muy complejas y se pueden clasificar en los siguientes tipos (3):

- Articulaciones planas (artrodias): vinculan huesos cuyas superficies son planas o ligeramente curvadas y con un tamaño aproximadamente similar, permitiendo movimientos de deslizamiento al desplazarse un hueso sobre la superficie de otro. Este movimiento se ve limitado por los ligamentos circundantes. Algunas de estas articulaciones pueden tener múltiples movimientos como la rotación, flexión, extensión, haciendo que puedan ser clasificadas como multiaxiales. Pero no ocurre con todas las articulaciones planas. Algunos ejemplos son la articulación acromioclavicular, las articulaciones intercarpianas de la muñeca o las intertarsianas del pie.

- Articulaciones en bisagra (trocleartrosis): en ellas, el extremo convexo de un hueso se articula con el extremo cóncavo del hueso contiguo, permitiendo el desplazamiento en torno a un eje transversal a la articulación regulando así los movimientos de flexión y extensión a lo largo de un solo eje. Ejemplos de estas articulaciones son la articulación del codo (humerocubital) o la rodilla.
- Articulaciones en pivote (trocoideas): este tipo de articulación está conformada por una parte redondeada del hueso encerrada en una cavidad formada en parte por la articulación de otro hueso adyacente y parcialmente unida mediante ligamentos. Permiten el movimiento en torno a un eje que atraviesa en sentido longitudinal la diáfisis del hueso; regula la rotación (por ejemplo en la articulación atlantoaxial). Se clasifica funcionalmente como una diartrosis uniaxial, puesto que rota alrededor de un solo eje.
- Articulaciones bicondileas: permiten principalmente el movimiento en torno a un eje, con una rotación limitada en torno a un segundo eje, formadas por dos cóndilos convexos que se articulan con superficies cóncavas o planas (por ejemplo en la rodilla).

- Articulaciones condileas (elipsoides o condilartrosis): en este caso la depresión poco profunda en el extremo de un hueso se articula con otra estructura redondeada de otro hueso o huesos adyacentes. Son biaxiales ya que permiten el movimiento en torno a dos ejes que se hallan en ángulo recto uno respecto del otro; regulan movimientos de flexión, extensión, abducción y circunducción (por ejemplo en la articulación de la muñeca).
- Articulaciones en silla de montar o de encaje recíproco: en ellas, las superficies óseas tienen forma de silla de montar, con lo cual los huesos encajan y permiten el movimiento en torno a dos ejes que se hallan en ángulo recto uno respecto del otro; regulan movimientos de flexión, extensión, abducción, aducción y circunducción (por ejemplo en la articulación carpometacarpiana del pulgar).
- Articulaciones esféricas (glenoideas o enartrosis): son aquellas que permiten mayor amplitud de movimiento debido a la forma en la que encaja la cabeza redondeada de un hueso (bola) en la parte cóncava del hueso adyacente (receptáculo). Se consideran por tanto multiaxiales por que permiten el movimiento en torno a

múltiples ejes; regulan movimientos de flexión, extensión, abducción, aducción, circunducción y rotación. Las únicas dos articulaciones del cuerpo que son esféricas son la articulación de la cadera y la articulación glenohumeral (hombro).

1.1.2.1. Componentes de las diartrosis

Todas las diartrosis, al margen de su mayor o menor complejidad anatómica, están constituidas por tres elementos básicos: la cápsula articular, la cavidad sinovial y las superficies de los huesos que conectan (complejo osteocondral).

La **cápsula articular** es una estructura formada por tejido conectivo denso con forma de manguito o capa exterior consistente localizada alrededor de la articulación (2) y cuya función es aportar estabilidad, firmeza y flexibilidad. La cápsula fija sus dos bordes a los extremos de la articulación a lo largo de una línea de inserción, por la que penetra al periostio y está compuesta por la membrana fibrosa (estrato fibroso), situada en el lado externo y formada por tejido conjuntivo denso, y la membrana sinovial (estrato sinovial), de ubicación interna (1).

La **membrana fibrosa** está en continuidad con el tejido conjuntivo denso del periostio y contribuye a la estabilidad de la articulación. La **membrana sinovial**, que forma pliegues y

vellosidades de configuraciones múltiples que protruyen en la cavidad articular, está compuesta por la íntima sinovial (capa de revestimiento sinovial) interna y la capa subintimal (subsinovial) externa. La **íntima sinovial** posee 1-4 capas de células sinoviales de revestimiento (**sinoviocitos**), que no son células epiteliales y por tanto no constituyen un epitelio. Entre los sinoviocitos se pueden distinguir dos tipos celulares distintos: las células A o de tipo macrófágico, que pueden fagocitar y predominan en los adultos, y las células B o de tipo fibroblástico, que poseen una maquinaria secretora desarrollada y producen la matriz conjuntiva típica con fibrillas colágenas, así como algunos de los componentes del líquido sinovial. El **tejido conjuntivo subintimal**, contiene vasos sanguíneos y linfáticos abundantes y muchos adipocitos, además de fibras nerviosas vegetativas y algunos corpúsculos sensoriales. A las fibrillas colágenas hay que sumarles las fibras elásticas, necesarias para que los pliegues sinoviales no queden aprisionados entre las superficies articulares. En los lugares donde la cápsula articular se encuentra bajo presión el tejido subintimal es muy delgado y no contiene adipocitos (1).

Los vasos y nervios articulares perforan la cápsula, que además puede presentar aberturas con evaginaciones de la membrana sinovial. A menudo la cápsula fibrosa contiene varios engrosamientos de haces de fibras paralelas, los filamentos

articulares o ligamentos, que también pueden transcurrir con independencia de la cápsula, ya sea por su parte externa o dentro de la articulación (2).

El espacio que se interpone entre las superficies articulares de los huesos se denomina **cavidad articular** y contiene el líquido sinovial transparente y filante, que está compuesto por plasma sanguíneo dializado y por productos de secreción de los sinoviocitos, principalmente de las células B (de tipo fibroblástico). Este líquido contiene sobre todo proteínas, hialuronano, glucosa y agua; posee funciones lubricantes y amortiguadoras (antichoque) y nutre el cartílago articular (1). La lubricina (glucoproteína mucoide producida por los sinoviocitos fibroblásticos) se encarga de aumentar la capacidad de deslizamiento de la superficie del cartílago articular. En el líquido sinovial aparecen células aisladas, sobre todo linfocitos.

Las superficies óseas de los huesos conectados por diartrosis están recubiertas por una forma especial de tejido cartilaginoso hialino que se denomina **cartílago articular** y forma junto con las mismas el **complejo osteocondral**. Las características estructurales de dicho tejido de sostén se describen en el apartado tercero de esta introducción.

Junto a estos elementos básicos, en las articulaciones encontramos una serie de estructuras accesorias fundamentales para el correcto funcionamiento de las mismas como son los

meniscos, los ligamentos intra- o extra-articulares o la rótula. Los **meniscos** se componen de cartílago fibroso y de tejido conjuntivo fibrosos denso desorganizado. Su forma es similar a una semiluna y su función es rellenar los espacios comprendidos entre superficies articulares del cuerpo, estabilizando la articulación y generando una protección extra en los movimientos bruscos, además de absorber el impacto de choque entre las superficies articulares, aumentando la superficie de contacto entre los huesos y la disminución del desgaste del cartílago, al distribuir mejor las presiones. En el ser humano, los meniscos están localizados en la articulación temporomandibular, la rodilla, la acromioclavicular, la esternoclavicular, la muñeca y las costillas en su unión con las articulaciones transversas vertebrales. Encontramos meniscos completos, como ocurre en las articulaciones esternoclavicular y de la muñeca, o discos parciales, como en las articulaciones de la rodilla y acromioclavicular. Bien es cierto que en la articulación temporomandibular, el disco puede ser parcial o completo (3). En la rodilla encontramos el menisco medial localizado en la parte interna de la rodilla y el menisco lateral en la parte externa. Los meniscos se encuentran fijados a la parte superior de la tibia y también están en contacto con el fémur, ejerciendo de amortiguador en el momento que la rodilla soporta una carga. Mediante el ligamento meniscal se adhieren a la periferia del

platillo tibial. Los meniscos permiten una mejor distribución de la carga, gracias a que aumentan la superficie articular de los platillos tibiales y la congruencia entre la tibia y los cóndilos femorales. Tienden a desplazarse hacia atrás en la flexión y hacia delante en la extensión; el menisco medial tiene menos movilidad que el menisco lateral. Cada uno posee una forma característica y su grosor puede ser homogéneo, aunque por regla general son más gruesos en la periferia y más delgados en su borde interno. Cuando se realizan movimientos de flexo-extensión y cargas y descargas de peso los meniscos ayudan a distribuir el líquido sinovial que liberan las células sinoviales favoreciendo a la lubricación y nutrición de la articulación (3,4).

Los **ligamentos** se componen de fibras gruesas de colágena y fibroblastos dispuestos de forma paralela, de una naturaleza similar a los tendones (5). La función de los ligamentos es la unión y estabilización de estructuras anatómicas. Lo más común es encontrarlos entre los huesos y cartílagos del organismo, especialmente en aquellos que forman articulaciones, donde permiten y facilitan el movimiento dentro de las direcciones anatómicas naturales, mientras que restringen aquellos movimientos que son anatómicamente anormales, impidiendo protrusiones o lesiones que podrían surgir por este tipo de movimientos (4). Los ligamentos extracapsulares e intracapsulares se pueden encontrar en muchas articulaciones

sinoviales. Los extracapsulares, como bien indica su nombre, están fuera de la cápsula articular y como ejemplos tenemos los ligamentos colaterales tibial y peroneo de la articulación de la rodilla. Los intracapsulares están dentro de la cápsula articular, pero excluidos de la cavidad sinovial por pliegues de la membrana sinovial. Como ejemplos tenemos los ligamentos cruzados posterior y anterior de la articulación de la rodilla (3).

La **rótula** (patella) es un hueso sesamoideo que encontramos situado en el plano anterior de la articulación de la rodilla, y que está engastada en el tendón del cuádriceps. Tiene una forma triangular con vértice inferior y está aplanada, además su eje mayor mide unos 5 cm. Los tendones del cuádriceps se unen al borde superior (base) y a la cara anterior, y de su vértice parte el ligamento rotuliano que continúa al tendón del cuádriceps. La cara posterior (cara articular) posee la superficie articular para el fémur y, por debajo, tiene una zona rugosa conformada por las formaciones adiposas de la articulación de la rodilla. La superficie articular consta de dos vertientes laterales, separadas por una cresta roma central, que se adaptan a la superficie rotuliana del fémur. Es considerado el hueso sesamoideo más grande del cuerpo humano (3,4).

1.2. Tejido cartilaginoso

El cartílago articular, como ya hemos dicho, es una forma especializada de cartílago hialino. Dado que esta tesis está centrada en la construcción de andamiajes para la regeneración de dicho tejido, procederemos a continuación a describir las principales características del mismo. El tejido cartilaginoso es una forma especializada de tejido conjuntivo modelado cuya principal función es la de sostén y cuyas propiedades están determinadas por los componentes de su matriz extracelular (MEC). El cartílago es rígido, elástico, deformable y cortable (1). En función de la disposición de las células y las características de la MEC podemos distinguir cuatro variantes (1):

- Cartílago fetal: contiene abundantes células cartilaginosas fusiformes, redondeadas o estrelladas, que están distribuidas de modo uniforme en la matriz y no forman condronas. Se denomina cartílago epiteloideo y presenta vasos sanguíneos en continuidad de las células y matriz condral.
- Cartílago hialino: es el más abundante y representativo, por lo que lo describiremos con más detalle en esta sección.
- Cartílago elástico: es similar al cartílago hialino, pero con la diferencia de que posee abundantes redes de fibras

elásticas que rodean las condronas, que atraviesan la matriz interterritorial y establecen contacto con fibras elásticas del pericondrio. Es, por tanto, un tejido elástico. Posee una coloración amarillenta pálida. Los condrocitos frecuentemente se agrupan formando hileras perpendiculares al pericondrio y las condronas suelen ser más pequeñas que en el caso del cartílago hialino.

- Cartílago fibroso: se asemeja al tejido conjuntivo fibroso denso desorganizado debido a la abundancia de sus haces no enmascarados de fibras de colágeno tipo I. Entre los resquicios de las fibras se encuentran las condronas, pequeñas, o los condrocitos individuales inmersos en la matriz cartilaginosa que contiene colágeno tipo II.

El tejido cartilaginoso maduro es un tejido compuesto por condrocitos y matriz extracelular abundante, sólida y firme, que resiste la tensión (estiramiento), la compresión y el cizallamiento (tracción en direcciones opuestas), pero también un tanto maleable, lo que condiciona su elasticidad (5). Se diferencia de otros tejidos conectivos en que no posee nervios ni vasos sanguíneos. El hecho de que no tenga irrigación sanguínea es debido a que secreta un factor antiangiogénico, una sustancia que impide el crecimiento de los vasos. Como no existe una red vascular dentro del tejido, la composición de la

matriz extracelular es decisiva para la supervivencia de los condrocitos. La gran proporción de glucosaminoglucanos (GAG) con respecto al colágeno tipo II en la matriz cartilaginosa permite la difusión de sustancias desde los vasos sanguíneos (5). El cartílago puede resistir mucha más tensión que los tejidos conectivos laxo y denso. Su fuerza se debe a sus fibras de colágeno, y su flexibilidad, es decir la capacidad que tiene de retornar a su forma original tras ser deformado, se debe al condroitín-sulfato.

Debido a sus propiedades, el cartílago desempeña un papel importante como tejido de sostén del cuerpo, además de ser el precursor del tejido óseo y formar parte de casi todo el esqueleto embrionario. Está compuesto por células y una MEC característica, denominada matriz condral (5).

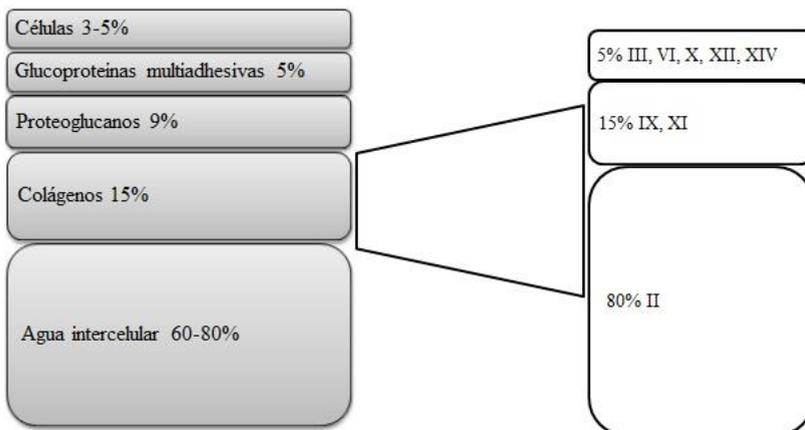


Figura 1. Composición del cartílago hialino. M.Oliver

1.2.1. Componente celular

En el interior y en la superficie de la matriz condral, podemos distinguir dos tipos celulares característicos del tejido cartilaginoso: los condroblastos y los condrocitos. Los condroblastos se diferencian a partir de células mesenquimatosas dentro del centro de condricación o de células condrogénicas de la capa celular interna del pericondrio, la capa de tejido conjuntivo fibroso denso desorganizado que envuelve el cartílago hialino. Los **condroblastos** son células basófilas con una elevada actividad secretora. Las micrografías electrónicas de estas células muestran una red rica de Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), un complejo de Golgi bien desarrollado, múltiples mitocondrias y abundancia de vesículas secretoras. Son células aplanadas con abundantes filamentos de actina y miosina, e incluso filamentos intermedios de vimentina, que le aportan cierta contractibilidad. Poseen un núcleo redondo situado en el centro de la célula donde se puede observar un nucléolo evidente. Los condroblastos secretan matriz condral activamente y tienen gran capacidad mitótica. Se ubican cerca del pericondrio en espacios o lagunas condrales aplanadas en sentido paralelo a la superficie (2). Debido a su gran capacidad secretora, quedan incluidas totalmente en la matriz condral, momento en el cual sufren una serie de cambios morfológicos, tras los cuales pasan a denominarse condrocitos.

Los **condrocitos** (*chondros* cartílago + *kytos* célula) se corresponden por tanto con la forma madura de los condroblastos. Son indispensables, ya que se encargan de mantener la matriz cartilaginosa, a través de la producción de sus principales compuestos: colágeno y proteoglicanos. La densidad de condrocitos es $1,4 \times 10^7$ células/cm³ en el cartílago maduro (6), es decir, conforman menos del 5 % del tejido cartilaginoso, pero son esenciales para producir y mantener la MEC durante toda la vida. El requerimiento nutricional de los condrocitos metabólicamente activos es elevado, y aunque es adecuado para ambientes con poco oxígeno por la ausencia de vasos sanguíneos, bien es cierto que consume oxígeno a tasas más bajas que otros tipos celulares, y son susceptibles al daño causado por el estrés oxidativo (7). Ocupan un espacio denominado laguna condral y pueden aparecer aislados o en grupos, habitualmente de dos a cuatro células, denominados grupos isogénicos o condronas. A medida que los condrocitos forman matriz se van alejando y formando nuevas lagunas y, por tanto, nuevos grupos isogénicos. Sus características microscópicas dependen de su grado de actividad. Así, los activos son más basófilos y exhiben un RER y un Golgi más desarrollados que los no activos, que son menos basófilos. Son células esféricas con superficie irregular y tienen aproximadamente 40 μm de diámetro. En su superficie tienen

una gran cantidad de microvellosidades irregulares que se introducen en la matriz. El núcleo es excéntrico y en el citoplasma encontramos abundancia de cisternas del RER, desarrolladas y dilatadas, un aparato de Golgi extenso, muchas mitocondrias, y vesículas de secreción (5). Los filamentos intermedios compuestos por vimentina son abundantes. Se puede observar con regularidad grandes inclusiones lipídicas y abundante glucógeno. Junto a la superficie celular hay fibrillas finas, compuestas de tipos de colágeno poco frecuentes, que la protegen contra la compresión mecánica. Los condrocitos vivos adoptan la forma de las lagunas que ocupan, pero en los preparados observados con el microscopio óptico suelen estar contraídos por la deshidratación de la muestra durante la preparación (2), dando la impresión de que las lagunas condrales son espacios vacíos.

1.2.2. Matriz condral

La matriz del cartílago hialino es amorfa y homogénea, además de tener un aspecto vítreo. Es un tejido vivo complejo, cuyas funciones son participar en la lubricación de las articulaciones sinoviales, proveer una superficie de baja fricción y distribuir las fuerzas aplicadas al hueso subyacente (5). Los condrocitos son los encargados de producir la matriz condral, la cual contiene tres clases principales de moléculas.

El principal componente de la matriz son las **moléculas de colágeno**. Dentro de los más de 20 tipos de colágenos que existen, cinco son los que participan en la formación de una red tridimensional de fibrillas matriciales cortas y bastante delgadas (20 nm de diámetro). El colágeno tipo II es el que forma parte de la mayoría de las fibrillas mientras que el colágeno tipo IX se encarga de facilitar la interacción de las fibrillas con los proteoglucanos. Por otro lado, el colágeno tipo XI es el encargado de regular el tamaño de las fibrillas, las cuales forman una red hexagonal tridimensional, que resulta decisiva para una función mecánica eficaz, organizada por el colágeno tipo X, que resulta decisiva para una función mecánica eficaz. Además, en la periferia de los condrocitos encontramos colágeno tipo VI, que contribuye en la adhesión de estos a la matriz condral. Por tanto, estos 5 tipos de colágenos son los llamados colágenos específicos de cartílago.

Los **proteoglucanos** son los que conforman la sustancia fundamental del cartílago hialino. El hialuronano, el condroitín-sulfato y el queratán-sulfato son los tres tipos de glucosaminoglucanos (GAG) más abundantes. El condroitín-sulfato y el queratán-sulfato son los que se unen a una proteína central para formar un monómero de proteoglucanos. El monómero de proteoglucanos más importante en el cartílago hialino es el agregano, que contiene aproximadamente unas 100

cadena de condroitín-sulfato y hasta 60 moléculas de queratán-sulfato, con una masa molecular de 250 kDa (5). A causa de la gran cantidad de moléculas de sulfato que posee, el agregano tiene una elevada carga negativa y gran afinidad por las moléculas de agua. Asimismo, una gran cantidad de moléculas de agregano están unidas al hialuronano por medio de proteínas de enlace en el extremo N-terminal de las moléculas, formando grandes agregados de proteoglicanos. A su vez, estos agregados con carga negativa están unidos por fuerzas electrostáticas y proteínas multiadhesivas a las fibrillas de colágeno. Otros proteoglicanos, como decorina, biglicano y fibromodulina, están unidos a las moléculas, contribuyendo a estabilizar la matriz condral.

Las **glucoproteínas multiadhesivas** son las encargadas de influir en las interacciones entre los condrocitos y las moléculas de la matriz. Algunos ejemplos de glucoproteínas son la ancorina CII, una molécula pequeña (34 kDa) que sirve de receptor de colágenos en los condrocitos, o la tenascina y la fibronectina, cuya función es contribuir a la fijación de los condrocitos a la matriz cartilaginosa.

1.2.3. Pericondrio

Es un tejido conjuntivo fibroso denso desorganizado, de límites poco nítidos. El pericondrio recubre el cartílago, rodeándolo y

funciona como fuente de células condrales nuevas (5). Al ser tejido conjuntivo está vascularizado y sus vasos proporcionan los nutrientes a las células del cartílago. Además de condrocitos, puntualmente en el pericondrio, también encontramos células madre, condroblastos y ocasionalmente alguna célula clástica. Cuando existe crecimiento activo el pericondrio está dividido en una capa interna celular o estrato condrógeno, que es la que está directamente en contacto con el cartílago y la que genera las células nuevas, y otra capa externa o estrato fibroso. En la zona limítrofe con el pericondrio, el cartílago no está todavía organizado en condronas (1). Dicha división no es apreciable si el pericondrio no está produciendo cartílago activamente o si el crecimiento del tejido es muy lento. A partir del pericondrio se produce la regeneración cartilaginosa, pero en una extensión limitada y escasa, sobre todo en cartílago adulto. Hay que destacar que el pericondrio se encuentra en los cartílagos elásticos y en la mayoría de los hialinos, pero no existe en el cartílago fibroso o fibrocartílago, en el cartílago hialino articular ni en los discos epifisarios.

En la estructura del pericondrio vamos a encontrar además de una importante proporción de fibras gruesas de colágeno tipo I, para la protección, una red de vasos sanguíneos y linfáticos, así como terminaciones nerviosas. Todos estos sistemas son imprescindibles para el correcto funcionalismo del tejido

cartilaginoso, ya que en el interior de las piezas cartilaginosas faltan tanto los vasos como los nervios.

1.2.4. Organización

Los condrocitos dentro del cartílago pueden distribuirse de manera aislada o en agrupaciones llamadas grupos isogénicos. Estas agregaciones se forman cuando acaban de dividirse, pero conforme van sintetizando y rodeándose de matriz extracelular, estos condrocitos que habían sido productos de la división celular empiezan a dispersarse. Otro factor que ayuda a esta separación entre células es el hecho de que los condrocitos secretan metaloproteinasas al exterior, que son enzimas que se encargan de degradar la matriz cartilaginosa para así permitir que las células se expandan y puedan experimentar una reubicación del grupo isogénico, que continúa creciendo (5). La composición de la matriz condral no es homogénea, de manera que podemos diferenciar una serie de zonas en la misma, como son (5):

- **Matriz capsular o pericelular:** también denominada cápsula condrocítica, que se corresponde con un anillo de matriz justo alrededor del condrocito, que se tiñe con mayor intensidad. En esa zona se encuentra la concentración más elevada de proteoglicanos sulfatados, hialuronano, biglicanos, decorina y diversas

glucoproteínas multiadhesivas como la fibronectina y laminina. En esta matriz se encuentran casi exclusivamente fibrillas de colágeno tipo VI, formando redes compactas alrededor de los condrocitos para fijarlos a la matriz extracelular. Además, existe una gran cantidad de colágeno tipo IX para estabilizar la red de fibras de colágeno tipo II. Según parece a esta zona le corresponde una función protectora contra la compresión y la tracción.

- **Matriz territorial:** se ubica más alejada de la zona inmediatamente contigua de los condrocitos. Se encarga de rodear al grupo isogénico y en su mayoría son fibras de colágeno tipo II con una menor cantidad de colágeno tipo IX. Su concentración de proteoglicanos sulfatados es menor, siendo menos basófila y metacromática.
- **Matriz interterritorial:** es la región que rodea a la matriz territorial y ocupa el espacio entre los grupos isogénicos. Es la zona de menor basofilia y metacromasia.

El conjunto formado por un grupo isogénico y la matriz condral asociada se denomina **condrona**.

1.2.5. Condrogénesis, crecimiento y regeneración condral

La condrogénesis es el proceso de desarrollo del cartílago y, por tanto, la primera fase del desarrollo esquelético. El cartílago es una variedad del tejido conjuntivo que deriva del mesénquima, salvo en alguna región como la cefálica en la que el origen es ectomesenquimático (8). A partir de la cuarta semana de vida ya se diferencian zonas en las cuales las células del mesénquima forman esos cúmulos celulares, llamados núcleos cartilaginosos o centros de condricación (2). Por tanto, estos cúmulos de células mesenquimáticas o ectomesenquimáticas son los que señalan el sitio de formación del cartílago hialino. La expresión del factor de transcripción SOX9 desencadena la diferenciación de estas células a condroblastos, siendo necesaria para la expresión del gen del colágeno tipo II (Col2a1), así como otras proteínas de la matriz específicas del cartílago como Col 11a2 (9). Dentro de la familia SOX, existen dos miembros que se coexpresan con Sox-9, Sox-5 y Sox-6, en el proceso de diferenciación de los condrocitos, y que son necesarios para la expresión del Col9a1, el agregano y proteínas de enlace, así como Col2a1 (10).

Por tanto, la aparición de Sox-9 coincide con la secreción de colágeno tipo II, puesto que cuando los condroblastos secretan

matriz condral estos genes se coexpresan y cuando los condrocitos se vuelven hipertróficos en los cartílagos de la placa de crecimiento, se inhiben (10,11). Conforme aumenta la cantidad de matriz, el tejido se hace más elástico y firme, y las células se ubican en las lagunas.

La condrogénesis está regulada tanto por diferentes moléculas, entre las que se encuentran los ligandos extracelulares, los receptores nucleares, factores de transcripción, moléculas adhesivas y proteínas de la matriz, como por fuerzas biomecánicas, que regulan la forma, regeneración y envejecimiento de este, además de modificar las interacciones entre célula – matriz extracelular (5). En el momento en que se forman las primeras células cartilagosas a partir del mesénquima se produce el consiguiente crecimiento del cartílago siguiendo un patrón tanto intersticial como aposicional. El crecimiento intersticial del cartílago se produce por divisiones mitóticas de los condrocitos, que origina nuevos grupos isogénicos a partir de las células hijas, generando matriz entre ellas y separándolas de forma que cada una de ellas ocupa su propia laguna y, a su vez, deshaciendo matriz con las metaloproteinasas que sintetizan los propios condrocitos para abrirse paso a través de la matriz, dividirse y generar nuevo cartílago. Esto ocurre porque los condrocitos retienen la capacidad de dividirse y porque la matriz cartilaginosa es

distensible, lo que permite la actividad secretora adicional (5). Este crecimiento solo tiene lugar en el cartílago joven. El cartílago también crece de manera aposicional a partir de condroblastos, derivados de precursores pericóndricos, que generan matriz condral nueva que se deposita sobre la superficie del cartílago preexistente. El crecimiento aposicional ocurre durante toda la vida fetal y, de forma más reducida, en el periodo de la infancia y la pubertad.

Tras estas fases el cartílago hialino del adulto tiene una capacidad regenerativa limitada debido probablemente a la ausencia de vasos sanguíneos, la inmovilidad de los condrocitos y su escasa capacidad proliferativa. En cierto modo, el único grado de regeneración o reparación que es posible se encuentra si el defecto ocurre cerca del pericondrio, gracias a las células pluripotentes que se encuentran en su interior. Pero aun así las células cartilaginosas que se producen son escasas, y la reparación en realidad comprende la producción de tejido conjuntivo fibroso denso desorganizado donde se genera un equilibrio tentativo entre el depósito de colágeno tipo I en la forma de tejido cicatrizal y la restauración por la expresión de los colágenos condroespecíficos del cartílago. No obstante, en adultos es común que se formen vasos sanguíneos en el lugar de la herida condral durante el proceso de curación, lo cual estimula

el desarrollo del tejido óseo reparativo en lugar de una verdadera regeneración del tejido cartilaginoso (5).

1.3. Cartílago articular

El cartílago articular es el nombre que recibe el cartílago hialino que recubre las superficies articulares de las diartrosis o articulaciones móviles. En los adultos mide entre 2 y 5 mm de espesor (5). Este tejido muestra una serie de características diferenciales con otros cartílagos, como son la ausencia de pericondrio, así como una arquitectura y composición características. El cartílago articular está por tanto en contacto directo con el líquido sinovial por una cara y vinculado directamente con el hueso subcondral por la opuesta, siendo por tanto elemento del complejo osteocondral. Su arquitectura y composición características le proporcionan unas propiedades viscoelásticas únicas, además de una superficie lisa que permite el roce sin fricción entre las superficies articulares, lo cual facilita la transmisión de cargas a la zona de hueso subyacente. Así, este tejido tiene una estructura bifásica basada en una fase fluida, formada por agua y electrolitos, y una fase sólida, compuesta por el resto de los elementos de la matriz condral. Cuando se produce una carga axial de fuerzas sobre el cartílago, aumenta la presión intersticial, facilitando la salida del componente fluido de la MEC. En cambio, cuando cesa la carga, se produce la

entrada de líquido, favoreciendo así la nutrición del cartílago hialino que como hemos mencionado anteriormente es avascular. La baja permeabilidad del tejido evita la salida excesivamente rápida del líquido, y la deformación mecánica del cartílago que soporta, puntualmente, las cargas, se previene gracias al cartílago de áreas contiguas y el hueso subcondral subyacente.

1.3.1. Organización

Con respecto al contenido de la matriz condral del cartílago articular, destacamos la peculiar organización y características de las fibras de colágeno II que forman parte de la composición de dicha matriz. En función del grosor y disposición de las mismas, podemos diferenciar 4 zonas que detallaremos a continuación (figura 2).

La **zona I o zona superficial** (tangencial) (fig. 2; 2) es la zona que está en contacto con el líquido articular y una de sus características más importantes es su gran resistencia a la compresión. Además de ser de gran interés el hecho de que sus células sintetizan muy poco o prácticamente nada de polisacáridos aniónicos, tal como muestran las tinciones metacromáticas. Tampoco sintetizan polisacáridos sulfatados, lo que lleva a deducir que en esta zona los condrocitos no están activos. Morfológicamente tampoco poseen la apariencia de un

condrocito activo, ya que su forma es alargada y aplanada. Esta zona puede tener un grosor de entre 200 y 600 micras, según en qué parte de la articulación se mida dicho grosor. En ocasiones se pueden observar depresiones en la superficie de 0,3 a 1,5 micras de profundidad. Y, cubriendo toda la superficie, encontramos una capa de 3 micras de grosor formada por fibras muy finas y fibrillas filamentosas con ausencia de células, llamada lamina "splendens" (12). En esta zona, las fibras de colágeno tipo II se organizan en haces paralelos a la superficie libre, estrechamente espaciadas y separadas por poca o ninguna sustancia amorfa interpuesta. Los condrocitos tienen una forma elipsoide, en algunos casos alargados, y comparten las siguientes características: la membrana celular no posee grandes invaginaciones, aunque sí que tienen vesículas micropinocíticas y acantosomas en el interior. Las pocas vacuolas que tienen contienen material similar a las fibrillas filamentosas de la matriz extracelular. El citoplasma contiene filamentos intracelulares de 70 Å de diámetro por el área perinuclear. Tiene un RER mucho menos desarrollado o escaso, con pequeñas y pocas mitocondrias, y un aparato de Golgi pequeño con numerosos sáculos aplanados. Todo esto indica que son células prácticamente inactivas, donde se ve reducida la síntesis de proteínas y con un nivel bajo de actividad metabólica; por todo ello son tan diferentes a las de las otras zonas (12). Dentro de la

Zona I podemos encontrar otra pequeña zona (Zona ID) que se corresponde con una zona de transición hacia la zona II, conteniendo haces pequeños y espaciados de fibras de colágeno II entre los que encontramos condrocitos más grandes y redondeados, pudiendo apreciarse grupos isogénicos formados por dos células, exhibiendo además orgánulos más desarrollados, reflejo por tanto de una mayor actividad secretora.

La zona II o zona intermedia (transicional) (fig. 2; 3), se ubica justo por debajo de la zona I y contiene fibras de colágeno tipo II de diámetro variable de 300 a 600 Å. En general, las fibras están orientadas aleatoriamente, mucho menos organizadas y tienen poca tendencia a formar haces, pero en las proximidades de las células se observa cómo una gran cantidad de las fibras parecen estar dispuestas en una dirección paralela a la superficie articular. Los condrocitos se encuentran formando grupos isogénicos pares, tienen una forma redondeada y un tamaño más grande que en la zona ID. La membrana celular es altamente irregular debido a la fusión de vesículas y vacuolas de gran tamaño, con la consecuente exocitosis de elementos constituyentes de la matriz condral. Debido a este continuo movimiento de vesículas, los condrocitos poseen en el interior vesículas micropinocíticas y acantosomas. Sus orgánulos están muy bien desarrollados, con un retículo endoplasmático rugoso

extenso y repleto de ribosomas, y un complejo de Golgi con muchos sáculos y vesículas o vacuolas. En estas vacuolas grandes podemos encontrar material amorfo y fibrillas intracelulares de 40 Å de diámetro que también están presentes en el citoplasma, cercanas al aparato de Golgi y con frecuencia justo inmediatamente debajo de la membrana celular. Debido a la gran actividad que exhiben, las células de esta zona tienen abundantes mitocondrias. También hallamos grandes depósitos de glucógeno y, en ocasiones, gotas de lipoproteínas (12).

Por debajo de la zona II encontramos la **zona III o zona profunda (radial)** (fig. 2; 4), donde las fibras de colágeno poseen la mayor variación de diámetro, ya que pueden medir desde 400 a 800 Å, y su periodicidad es diferente a 640 Å. Las células en esta zona se caracterizan por ser más pequeñas y hallarse dispuestas en columnas cortas perpendiculares a la superficie del cartílago. Tienen abundante RER, un aparato de Golgi grande y mitocondrias, pero estos orgánulos son menos extensos que en los condrocitos de la Zona II. En esta capa los condrocitos poseen glucógeno y una gran cantidad de filamentos citoplasmáticos intracelulares de 70 Å de diámetro (12).

La última zona del cartílago articular se denomina **zona IV o zona calcificada** (fig. 2; 6) y, tal y como hace referencia su nombre, la matriz está calcificada, ubicada sobre el hueso subcondral (fig. 2;

7), y los condrocitos que posee son pequeños y muchos están muertos. Este estrato cumple una función en la transmisión de presiones y al parecer impide que el cartílago se separe del hueso. En los niños en esta zona ocurre la osificación endocondral. De manera que, incluso después de finalizado el crecimiento, en este estrato puede haber neoformación y remodelado óseo. Limitando las zonas III y IV se encuentra una línea regular, ondulada y calcificada, que recibe el nombre de marca de marea (5) (fig. 2; 5). Mide entre 2-5 μm de espesor y destaca por tener una abundancia de calcio. Es por encima de esta línea donde ocurre la proliferación de los condrocitos dentro de las lagunas generando las células nuevas para el crecimiento intersticial.

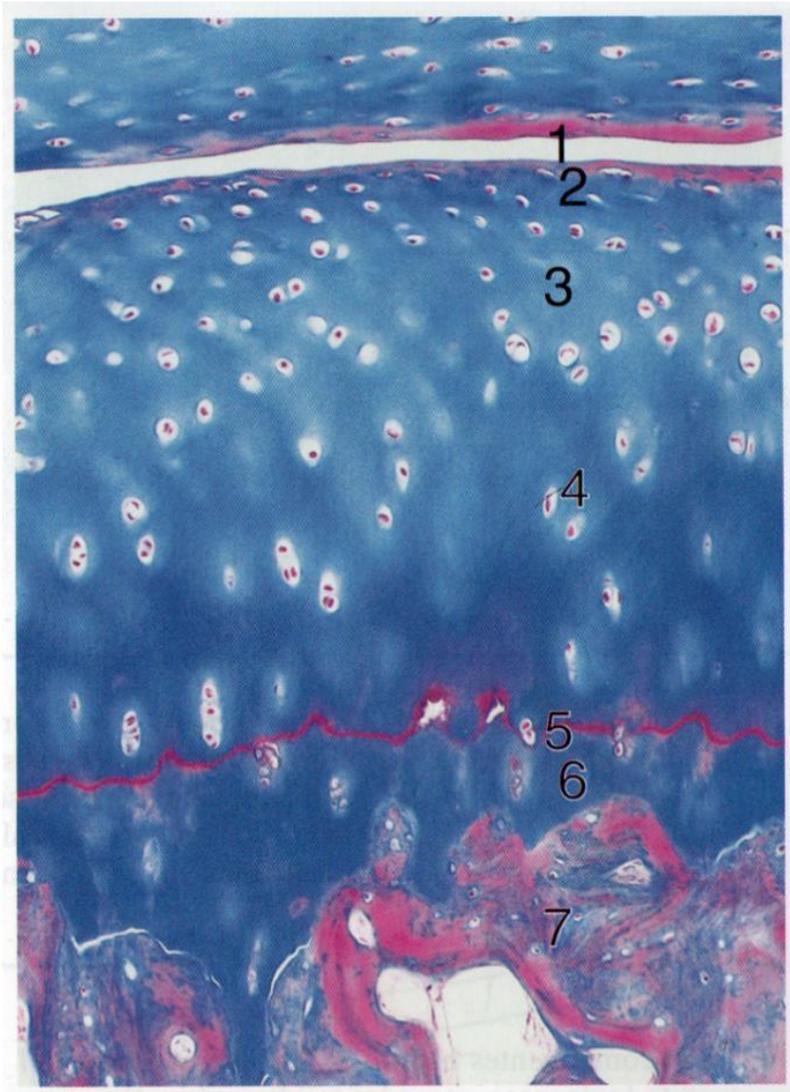


Figura 2. Cartílago articular de una articulación de un dedo (humano).

1 Cavidad articular; 2 Zona tangencial; 3 Zona de transición; 4 Zona radial; 5 Marca de marea; 6 Zona de cartílago calcificado; 7 Hueso laminillar subcondral. Tricrómico de Masson; 250×. Fotografía del libro Histología, Sobotta (1).

1.4. Patologías del cartílago articular

1.4.1. Osteoartritis articular

La degeneración del cartílago articular puede ocurrir como consecuencia de diferentes patologías, incluyendo traumatismos, acondroplasia, tumores diversos o la osteoartritis articular (13). De entre todos ellos, la patología más prevalente es la osteoartritis, por lo que merece especial mención en este documento.

La osteoartritis es una afección común e incapacitante que representa una carga de salud sustancial y creciente con implicaciones notables para las personas afectadas, para los sistemas de atención médica y para los costes socioeconómicos (14,15). La osteoartritis articular es la consecuencia de la combinación del envejecimiento y el aumento de la obesidad en la población mundial, junto con un conjunto de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y la artritis gotosa, y un número creciente de lesiones en las articulaciones. Se está volviendo cada vez más frecuente, con estimaciones mundiales que sugieren que actualmente hay alrededor de 250 millones de personas afectadas (13).

La osteoartritis articular afecta sobre todo a la articulación de la rodilla. Está condicionada por diferentes factores de riesgo como

son el sexo, la contribución genética, la raza, la edad, la obesidad, las lesiones previas, la debilidad muscular extensora, una actividad de trabajo pesada y los deportes de riesgo (16). La osteoartritis articular es una enfermedad crónica compleja de toda la articulación, que implica alteraciones estructurales en el cartílago articular, el hueso subcondral, los ligamentos, la cápsula articular, la membrana sinovial y los músculos periarticulares (17,18). Dicha complejidad implica factores mecánicos, inflamatorios y metabólicos que desencadenan la destrucción estructural y el fallo de la articulación sinovial. Se genera cuando hay una alteración dinámica y activa que surge de un desequilibrio entre la reparación y la destrucción de los tejidos articulares, cambiando la composición y alterando por tanto la integridad del cartílago y haciéndole susceptible a la interrupción por fuerzas físicas (19–21).

Aunque la osteoartritis articular de rodilla está estrechamente relacionada con el envejecimiento, es importante tener en cuenta que no es simplemente una consecuencia del envejecimiento. Puede aumentar el riesgo de padecer OA con la edad, pero también puede ocurrir en otras circunstancias, como por ejemplo como consecuencia de un daño articular. Esto se ve respaldado por las diferencias observadas en el cartílago con osteoartritis y envejecimiento. Además, las enzimas responsables de la degradación del cartílago se expresan en

mayores cantidades en la osteoartritis de rodilla, mientras que están en niveles normales en el cartílago de envejecimiento normal (16). Estas enzimas son las metaloproteasas de la matriz (MMP), que al sobreexpresarse alteran el equilibrio, ocasionando una pérdida general de colágeno y proteoglucanos. En las primeras etapas de la osteoartritis, los condrocitos secretan inhibidores tisulares de MMP (TIMP) e intentan aumentar la síntesis de proteoglucanos para que coincida con el proceso de degradación. Sin embargo, este proceso reparativo no es suficiente. La pérdida del equilibrio da como resultado una disminución de la cantidad de proteoglucanos a pesar del aumento de la síntesis, el aumento del contenido de agua, el patrón desorganizado de colágeno y, en última instancia, la pérdida de la elasticidad del cartílago articular. Macroscópicamente, estos cambios provocan grietas y fisuras en el cartílago y finalmente erosión de la superficie articular (22).

Las erosiones iniciales del cartílago articular se localizan solo en la superficie del mismo. Posteriormente se convierten en fisuras más profundas que llegan hasta el cartílago calcificado. Es en ese momento cuando los condrocitos, hipertróficos en un esfuerzo por reparar el daño, aumentan su actividad sintética, generando productos de degradación de la matriz y mediadores proinflamatorios que desregulan su propia función condrocítica, haciendo que actúen sobre la membrana sinovial adyacente,

estimulando así respuestas proliferativas y proinflamatorias. A esta liberación de productos proinflamatorios se unen los sinoviocitos, y a este proceso le acompaña la hipertrofia tisular y el aumento de la vascularización. Además, se produce una reparación y remodelación ósea cuando aumenta el recambio óseo, y se produce una invasión vascular, desde el hueso subcondral, a través de la marca de marea, y hacia el cartílago. Debido a la activación de la osificación endocondral se desarrollan osteofitos en los márgenes de las articulaciones y se ven fuertemente afectados por factores biológicos inflamatorios, pero también por la sobrecarga y la cinemática anormal de las articulaciones (figura 3) (23,24).

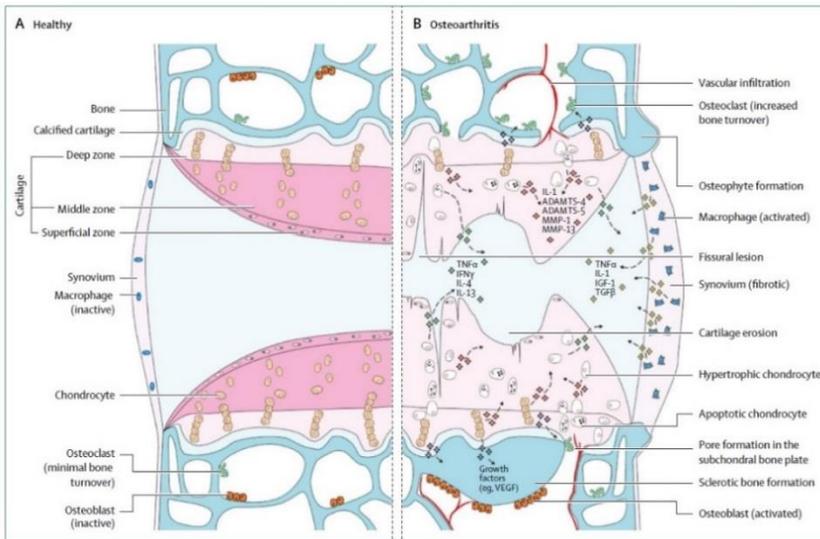


Figura 3. Vías de señalización y cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis (24).

La osteoartritis articular de rodilla se puede clasificar como primaria o secundaria. La primaria es el resultado de la degeneración idiopática del cartílago articular, mientras que la secundaria es el resultado de la degeneración del cartílago articular debido a una razón conocida (25,26). Todas las posibles causas de la osteoartritis articular secundaria pueden encontrarse en varias enfermedades, como el raquitismo, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, escoliosis, acromegalia, hemofilia, enfermedad de Paget, enfermedad de células falciformes, necrosis avascular, ocronosis, condrocalcinosis, artritis reumatoide, artritis psoriásica o gota. Además, puede ser causada por lesiones traumáticas o debido a

una cirugía, así como por malformaciones congénitas o una mal posición de la extremidad (16) (figura 4).

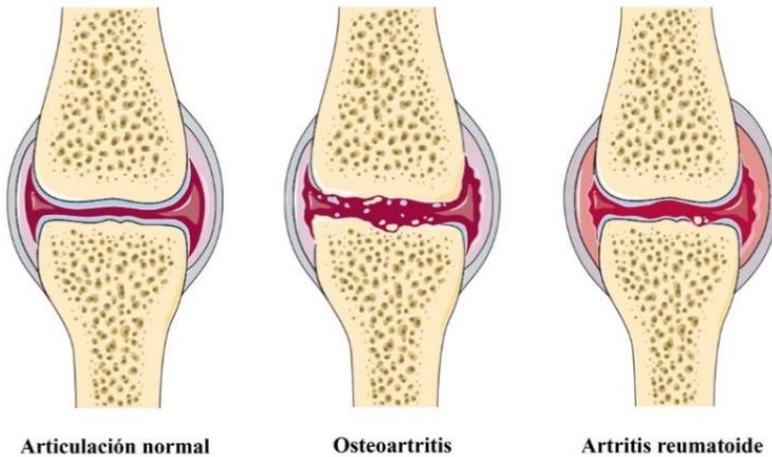


Figura 4. Diferencias entre una articulación normal, una con osteoartritis articular y otra con artritis reumatoide. (M.Oliver)

1.4.2. Lesiones condrales

Las lesiones que afectan al cartílago articular, independientemente de su origen, constituyen un grupo de lesiones heterogéneo que es preciso clasificar a fin de proporcionar al paciente un tratamiento efectivo.

Una de las clasificaciones más comúnmente utilizada para caracterizar las lesiones condrales es la clasificación *Outerbridge*, la cual se basa en la visualización directa, bien sea por

artroscopia o por artrotomía. Permite diferenciar 5 grados de lesión según la profundidad de esta, desde el grado 0, que se trata del cartílago articular normal, sin daños, hasta el grado IV con lesiones del espesor completo y exposición ósea (27) (tabla 1).

De forma similar, existe la clasificación propuesta por la Sociedad Internacional para la Reparación del Cartílago o ICRS (*International Cartilage Repair Society*) que fundamenta su clasificación en función del grosor del cartílago afectado, siendo el grado 0 el cartílago intacto, grado I para las lesiones con afectación superficial, el grado II para lesiones que afectan a menos de la mitad del grosor, el III para las que afectan a más de la mitad del grosor y grado IV para las que incluyen la zona del hueso subcondral (28) (tabla 1).

Por otro lado, existen otras escalas que a pesar de ser similares en cuanto a los grados y correspondencia histológica, se centran en el pronóstico y la posibilidad de desarrollar como secuela una osteoartritis, como por ejemplo el sistema OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*) (29).

Tabla 1. Clasificación de las lesiones del cartílago articular según la gravedad (fuente: Campbells, Orthopaedics, 11th edition, 2008).

| Grado | Outerbridge | Outerbridge modificado | ICRS |
|------------|---|--|--|
| o | Cartílago normal | Cartílago intacto | Cartílago intacto |
| I | Edema y adelgazamiento | Adelgazamiento condral o ampollas con la superficie intacta | Superficial (indentación suave o fisuras y cracks superficiales) |
| II | Fragmentación y fisuras <1,25cm de diámetro | Ulceración superficial, fibrilación o fisuras de <50% del espesor del cartílago | Lesiones de menos de la mitad del espesor del cartílago |
| III | Fragmentación y fisuras >1,25cm de diámetro | Ulceración profunda, fibrilación, fisuras o colgajos condrales de >50% del espesor del cartílago sin exposición ósea | Lesiones de más de la mitad del espesor del cartílago |
| IV | Exposición del hueso subcondral | Desgaste de todo el espesor del cartílago con exposición del hueso subcondral | Lesión que llega hasta el hueso subcondral |

1.5. Tratamiento de las lesiones condrales

La baja capacidad del cartílago para regenerarse o repararse, tal como se ha relatado con anterioridad, provoca que las lesiones condrales u osteocondrales sean complejas y difícil de manejar. Por ello, a lo largo de la historia estas lesiones han tenido mal pronóstico. Si la lesión es condral posee una escasa capacidad de regeneración; en cambio, si la lesión es osteocondral, al generarse un daño en el hueso, se produce un coágulo de fibrina

y a través de ese daño migran células madre mesenquimales desde la médula ósea del hueso subcondral o desde la sinovial para cicatrizar, formando fibrocartílago (30). El fibrocartílago o cartílago fibroso es un tipo de cartílago formado por la combinación de tejido conjuntivo fibroso denso no organizado y cartílago hialino. Posee pocos condrocitos y se disponen formando filas entre las fibras de colágeno, entre las que abundan las de colágeno tipo I. Dicho cartílago tiene su función específica y se encuentra formando parte de discos intervertebrales, meniscos y en las inserciones tendinosas, pero cuando es el resultado de la cicatrización del cartílago articular hialino empeora las propiedades biomecánicas y viscoelásticas de este cartílago, provocando su degeneración (31).

El tratamiento de las lesiones condrales es heterogéneo y depende tanto de la profundidad como del tipo de lesión condral. Así, encontramos tanto tratamientos restringidos al cartílago articular, como el lavado y artroscopia, el desbridamiento artroscópico o la condroabrasión, como tratamientos dirigidos a generar un sangrado desde el hueso subcondral, como las microfracturas, perforación Pridie o la espongiolización entre otros, que se basan en la regeneración de la lesión mediada por las células madre mesenquimales. El resultado de esta reparación espontánea es la formación de un tejido cartilaginoso de tipo fibroso de composición, estructura y

durabilidad variable, que parece conferir solo beneficios a corto plazo. Muchas de las estrategias de la ingeniería tisular destinadas a la regeneración del cartílago articular tienen su base en este mismo principio.

Mención especial requieren en este apartado los trasplantes de tejido autólogo, debido al enorme impulso del conocimiento que han generado en lo relativo a los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regeneración condral. Entre ellos destacamos los injertos pericondrales/periósticos, la mosaicoplastia o el uso de aloinjertos.

Los **injertos pericondrales o periósticos** comenzaron a utilizarse en la década de los 70 del siglo pasado como material de autotrasplante para reparar los defectos del cartílago articular (32–34). Su fundamento radica en colocar un injerto de la capa germinativa de tejido pericondrial sobre la lesión condral. Dicha capa debería tener una intensa actividad condrogénica (u osteogénica) continua y duradera, debido a la actividad de células madre adultas o multipotentes residentes (35,36). Esta técnica, aunque prometedora, no está exenta de complicaciones como, por ejemplo, el desprendimiento del injerto o la calcificación incontrolada de los injertos que se observa con frecuencia y probablemente contribuye a la tasa de pérdida. Bien es cierto que, a pesar de todo, se ha informado que el alivio

sintomático del dolor y las mejoras en la funcionalidad de las articulaciones son buenas, pero lamentablemente no se han realizado ensayos clínicos prospectivos, doble ciego y comparativos, para evaluar si esta técnica es más eficaz que el resto de medidas quirúrgicas más simples, con tasas de éxito similares. Por tanto, no se puede definir hasta qué punto es una técnica satisfactoria (13).

La mosaicoplastia se introdujo en la práctica clínica en 1992 y se basa en la extracción de un cilindro de una zona osteocondral sana del paciente que no se vea sometida a carga (por ejemplo, de las zonas sin contacto articular en el cartílago del fémur distal), para posteriormente injertarlo en el defecto existente. El cartílago hialino trasplantado es capaz de sobrevivir y produce una superficie más duradera que el tejido fibroso que se formaría por sí solo en el daño articular. Entre los efectos adversos de esta técnica destacamos la posibilidad de inducir degeneración en una zona articular que estaba sana. Por otra parte, por motivos que no se conocen en profundidad, la translocación de tejido de un área de bajo peso a una de alto peso invariablemente conduce a su degeneración, como consecuencia de la sobrecarga que experimenta en la posición nueva (13). Este tipo de tratamiento actualmente está indicado para lesiones condrales y osteocondrales de pequeño tamaño, entre 1 y 3 cm², en cóndilos femorales y en las lesiones

femoropatelaes en pacientes menores de 50 años, con lesiones focales sintomáticas *Outerbridge* grado III y IV, con articulaciones estables y sin alteraciones del eje mecánico (8).

Los **injertos osteocondrales alogénicos** se han utilizado para rellenar defectos del cartílago articular durante varias décadas. Inicialmente el enfoque no intenta inducir una respuesta de reparación, sino sustituir el tejido perdido con cartílago articular sano, generalmente de cadáveres. Se trata de una operación para reconstruir un área dañada o enferma de una articulación utilizando trasplante de hueso y cartílago. Las células del cartílago pueden sobrevivir al trasplante solo si el tejido es fresco, es decir, no ha experimentado ninguna fijación ni congelación prolongada. Al ser aloinjertos en fresco existen algunos condicionantes en cuanto a los tiempos de conservación máximos, la disponibilidad debe ser previa y se necesita una coordinación con el banco de donantes, además de todos los protocolos que debe cumplir el personal hospitalario (8). Hay que sumar a todo esto los problemas inmunológicos que suponen la donación de otro ser humano y la posible transmisión de enfermedades (13). Es cierto que el cartílago ocupa una posición inmunológicamente privilegiada dentro de la articulación pero, no obstante, en estudios realizados en ratas se determinó que los trasplantes de cartílago sobreviven más tiempo bajo condiciones inmunosupresoras y con la

compatibilidad de histocompatibilidad optimizada para reducir la citotoxicidad experimentada por las células (37,38).

Además, se comprobó que la criopreservación del tejido conduce a la muerte de los condrocitos, contribuyendo al deterioro y la reducción de la competencia mecánica (39,40). En humanos, en comparación con estudios animales, se observa que los trasplantes osteocondrales sobreviven por periodos más largos, incluso tras criopreservarse o liofilizarse. Y la tasa de éxito oscila entre el 65 y el 85 %, inclusive después de 10 años (41,42). Esta técnica se plantea en pacientes con defectos osteocondrales grandes, como los que se generan por la resección tumoral, osteonecrosis, traumatismo extenso, OA focal amplia u osteocondritis disecante (13).

1.6. Ingeniería tisular del cartílago articular

La ingeniería tisular es un campo relativamente nuevo que utiliza células, materiales biocompatibles y factores bioquímicos y físicos adecuados, así como combinaciones de los mismos, para crear estructuras similares a los tejidos (43). En la regeneración de cartílago la ingeniería tisular tiene un creciente interés debido a que, aunque existen múltiples técnicas terapéuticas para poder tratar las lesiones condrales, tal como se ha visto previamente, ninguna de ellas ofrece resultados completamente satisfactorios a medio y largo plazo, porque ninguna de ellas

parece poder reproducir un tejido de cartílago hialino similar al nativo (8).

1.6.1. Estrategias terapéuticas

Englobadas en esta etiqueta de Ingeniería de Tejidos, podemos encontrar actualmente tres tratamientos para la regeneración del cartílago que ya se ponen en práctica, y son técnicas como la implantación de condrocitos autólogos (*autologous chondrocyte implantation* – ACI), la condrogénesis asistida por matriz o andamiajes (*autologous matrix induced chondrogenesis* - AMIC) y, por último, la suma de estas dos técnicas para formar una nueva en la cual se cultivan condrocitos autólogos dentro de andamiajes preconformados (*matrix-assisted ACI* - MACI) (figura 5).

La **implantación de condrocitos autólogos (ACI)** se fundamenta en la obtención mediante artroscopia de fragmentos de cartílago de zonas que no soporten mucho peso para posteriormente aislar y cultivar los condrocitos autólogos del paciente durante de 3 a 5 semanas, obteniendo entre 5 y 10 millones de células. Tras la multiplicación celular, el paciente se somete a una segunda cirugía donde se inyectan los condrocitos bajo una membrana colocada cubriendo el defecto articular (figura 5A). Aunque esta técnica está considerada una de las mejores

opciones, dado que se acerca bastante más a lograr regenerar el cartílago en comparación con otras técnicas, posee alguna desventaja, como son lo costoso que resulta llevarla a cabo o la necesidad de realizar diferentes operaciones, debido a complicaciones derivadas de la hipertrofia del parche utilizado para cubrir el defecto (44).

La **condrogénesis autóloga inducida por matriz (AMIC)** es una técnica de un solo paso para reparar lesiones condrales y subcondrales profundas, que consta de una intervención quirúrgica para eliminar los fragmentos de cartílago dañado y realizar microfracturas para estimular un nivel controlado de sangrado y que se liberen MSCs del hueso y la medula ósea. La diferencia con la técnica de microfractura estándar es que se utiliza o bien una membrana de colágeno que se sutura o fija con fibrina al defecto, o bien un hidrogel, que deben servir de soporte para el coágulo de sangre y de ayuda a las MSCs para la regeneración de la matriz (figura 5B).

Las ventajas que se encuentran en este proceso son, por un lado, el hecho de que sea una técnica de una sola intervención, que no existe la demora por tener que cultivar las células en un laboratorio y que el implante es reabsorbido por el cuerpo (44).

La **AMIC inducida por matriz (MACI)** es el resultado de la combinación de las dos técnicas anteriores para potenciar lo

bueno que tiene cada uno de los procesos, aumentando así la posibilidad de éxito en la regeneración de cartílago articular. Se trata de la obtención de condrocitos autólogos mediante una primera artroscopia para limpiar de fragmentos de cartílago, tras lo cual se realiza el cultivo de las células obtenidas para poder tener entre 3 y 5 millones de células, que se incluirán en el constructo elegido con las mejores cualidades, para introducirlo en la totalidad del defecto del cartílago, existiendo la posibilidad de que se genere un coágulo de sangre que penetre también en el constructo, de manera que para la condrogénesis poseerá doble acción, la de los condrocitos cultivados y la que genere las MSCs que pertenezcan al daño subcondral (figura 5C)(44).

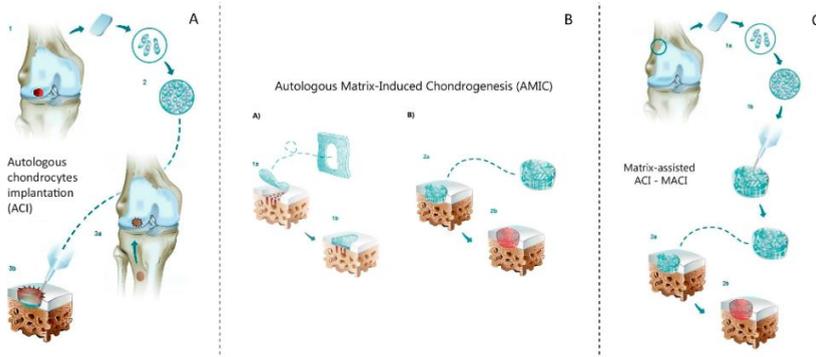


Figura 5. Diferentes estrategias terapéuticas para la reparación de cartílago. A. Técnica ACI - 1. Extracción de los condrocitos. 2. Expansión. 3a. Colocación de parche de contención de periostio. 3b. Administración del preparado de condrocitos. **B. Técnica AMIC.** A) 1a. Utilización de una membrana para cubrir el defecto con microfracuras

1b. La membrana crea una cámara biológica para que los condrocitos autólogos crezcan y regeneren el cartílago. B) 2a. Utilización de un constructo realizado con biomaterial integrándolo en toda la lesión 2b. El bioconstructo estimula al cuerpo para que sus propias células invadan el biomaterial y regeneren el tejido **C. Técnica MACI**. 1a. Extracción de los condrocitos. 1b Expansión e inyección del cultivo de condrocitos en el andamiaje. 2a. Integración de la matriz junto con las células en todo el defecto del cartílago 2b. Se embebe la matriz del coágulo que posee además MSCs para favorecer la condrogénesis y la reparación del cartílago (modificada de la web de la ICRS - <https://cartilage.org>).

La base de esta técnica consiste en utilizar una matriz o andamio que proporcione un ambiente en 3D adecuado, células que puedan diferenciarse en condrocitos y mantener dicho fenotipo, y factores solubles que induzcan el crecimiento y la diferenciación y modulen el proceso de la regeneración (45).

Y en esencia, aunque están muy bien definidos los términos teóricos de la Ingeniería de tejidos, no se puede olvidar el hecho de que simular el microambiente dentro de los tejidos maduros para diferenciar células, posee muchas dificultades añadidas debido a la complejidad del propio microambiente.

Sin olvidar el problema añadido que encontramos en la escasez de poblaciones de células precursoras adultas, junto con la

premisa de que si se utilizan células embrionarias o fetales, se observa que aunque estos tipos celulares y los adultos comparten las mismas moléculas de señalización, realmente sus reactividades son distintas ya que van cambiando a lo largo del proceso ontogénico. Por tanto, para poder encontrar una técnica de ingeniería de tejidos en organismos adultos exitosa, se necesitará conocer, ajustar y modificar correctamente los componentes (13).

1.6.2. Biomateriales utilizados para regeneración condral

A lo largo de la investigación en ingeniería tisular se han probado y estudiado muchos tipos de constructos o *scaffolds* diferentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, bien sea en animales de experimentación o en pacientes humanos. No se debe olvidar que las matrices, incluso usándose sin células ni sustancias de señalización, son dispositivos portadores de información y, por tanto, serán activos biológicos que provocarán una respuesta dentro de los tejidos, dato que se debe tener siempre en cuenta al utilizarlas, bien para modularlas de forma que se evite esa respuesta, bien para poder entender los resultados obtenidos (13,46). Existen numerosos requisitos para conseguir un constructo ideal para el entorno biológico, que se recogen resumidos en la siguiente tabla (tabla 2).

Tabla 2. Requisitos de una matriz (13).

| Propiedades de la matriz | Bases biológicas |
|---------------------------------|---|
| 1. Porosidad | Migración celular |
| 2. Capacidad de transportar | Alojamiento y liberación de sustancias de señalización |
| 3. Adhesión | Fijación celular |
| 4. Biodegradabilidad | Remodelación fisiológica |
| 5. Estabilidad del volumen | Contorno de superficie lisa del tejido de reparación a ras del cartílago articular nativo |
| 6. Biocompatibilidad | Buen contacto con el compartimento de tejido nativo |
| 7. Vinculación | Mejora la integración interfacial entre las fibrillas de colágeno en reparación y compartimentos de tejidos nativos |
| 8. Cohesión interna | Prevención del flujo de salida de la matriz |
| 9. Elasticidad | Resistencia durante y después de la deformación dinámica o estática |
| 10. Anisotropía estructural | Promoción de la organización nativa del tejido anisotrópico |

De existir un soporte mecánico que asistiera a la condrogénesis sin la necesidad de un cultivo previo o recurrir a cirugía en una zona donante, se reduciría la iatrogenia y todos los costes asociados en lo referente a paliar la enfermedad crónica que suponen estas enfermedades o daños, y en lo referente a las técnicas que se están utilizando actualmente como posible solución. Así, se lleva décadas estudiando los materiales para realizar combinaciones y modificaciones y así poder obtener la matriz ideal. Pero a día de hoy no existe suficiente evidencia sobre este aspecto, ya que los estudios realizados y los resultados obtenidos son muy heterogéneos, y no existen grandes series de comparaciones de las matrices de igual composición ni idénticas estimulaciones, como puede ser el tipo celular o los medios y sus factores condrogénicos (47,48).

La correcta fijación del constructo con los bordes de la lesión, evitando que no se desprenda o se contraiga es uno de los problemas que se encuentran en el uso de matrices. De momento, la literatura al respecto no ofrece resultados concluyentes, existiendo resultados muy heterogéneos de los diferentes métodos utilizados, como por ejemplo la fijación a presión, por sutura, o el uso de pegamentos de fibrina (49,50).

Las matrices se pueden clasificar según su naturaleza química en polímeros a base de proteínas, a base de carbohidratos,

polímeros realizados con materiales sintéticos y combinaciones o modificaciones de todos ellos (Tabla 3).

Tabla 3. Tipos de matrices según su naturaleza química.

| | |
|---|--------------------------------------|
| 1. Polímeros a base de Proteínas | Fibrina |
| | Colágeno |
| | Gelatina |
| 2. Polímeros a base de Carbohidratos | Ácido poliláctico |
| | Ácido poliglicólico |
| | Hialuronano |
| | Agarosa |
| | Alginato |
| | Quitosano |
| 3. Polímeros Artificiales | Dacron (tereftalatos de polietileno) |
| | Teflón (politetrafluoroetileno) |
| | Fibras de carbono |
| | Poliesteruretano |
| | Ácido polibutírico |
| | Polietilmetacrilato |

No solo es de suma importancia la naturaleza del biomaterial. También se han desarrollado otros tipos de constructos, como los andamios biomiméticos zonales y andamios nanofibrosos / nanoporosos, para superar los inconvenientes asociados con los andamios convencionales, a saber, la compatibilidad y las

propiedades funcionales, porque todo indica que la forma de la estructura tridimensional condiciona el éxito de la regeneración (51). Los andamios zonales involucran diferentes zonas, es decir, capas distintas con o sin las células que se asemejan al cartílago natural. Este sistema zonal imita las propiedades físicas del cartílago articular nativo y las células, si están implantadas, secretan MEC que se asemeja a la de las diferentes capas de cartílago (52). La tecnología biomimética del andamio zonal, aunque prometedora, todavía está en sus fases iniciales y se requieren más investigaciones con relación a la tecnología de su diseño y fabricación. Los andamios no fibrosos / nanoporosos debido a su tamaño nanométrico imitan las propiedades biológicas y fisicoquímicas de la MEC nativa nanométrica y, por lo tanto, desempeñan un papel clave en el crecimiento de células madre y / o condrocitos, así como en la regeneración de tejidos (53). En la fase preclínica, las células se encapsulan en andamios nanofibrosos fabricados por electrohilado. Sin embargo, el principal problema que surge es la homogeneidad celular, ya que las células se agrupan en este tipo de fabricación (54). Para evitar la acumulación de células, otras técnicas de fabricación (lixiviación de partículas, grabado químico, impresión 3D y separación de fases) justifican la investigación. A continuación detallamos los biomateriales más utilizados en regeneración condral.

1.6.2.1. Colágeno

Las fibras de colágeno son al fin y al cabo uno de los componentes primordiales en la matriz extracelular del cartílago articular hialino y, por tanto, era de esperar que se propusiera como *scaffold*. No obstante, aunque lleva más de 3 décadas utilizándose en estudios de investigación con animales, con algunos resultados prometedores como el uso de matrices de colágeno en defectos osteocondrales en conejos o caballos, no se ha conseguido todavía implantar su utilización clínica en daños articulares humanos. Se ha demostrado que las mallas de colágeno mejoran la respuesta de reparación espontánea en los defectos osteocondrales, donde las células del propio sujeto invaden ese *scaffold*. Además, se ha ensayado como portador de condrocitos alogénicos o células mesenquimales. Es probable que este biomaterial no se haya convertido en un material ideal por su baja biocompatibilidad y sus pobres propiedades mecánicas (55), a pesar de ser un componente natural del cuerpo y de que sus productos de degradación no son tóxicos. Quizá al efectuar modificaciones estructurales menores se podría mejorar su biocompatibilidad (13).

1.6.2.2. Gelatina

La gelatina es producida o sintetizada a partir de la hidrólisis del colágeno animal. Se forma por la desintegración de la triple

hélice del colágeno, el principal componente del tejido conectivo, como el de la dermis, el hueso, etc. (56). Algunos estudios realizados con gelatina son los de Lee et al. (57) o Li et al. (58), donde investigaron la influencia de la viscosidad de hidrogeles de gelatina en las funciones de los condrocitos o compararon gelatinas con microporos y sin ellos para observar el efecto que tuvieron sobre los condrocitos, respectivamente.

1.6.2.3. Fibrina

En la sangre y formando parte de la matriz extracelular podemos encontrar tanto la fibrina como su forma monomérica, el fibrinógeno, componentes naturales con una función inductiva importante, puesto que facilitan y promueven actividades de curación de tejidos en el espacio extravascular (59,60). El fibrinógeno está en el torrente sanguíneo y se activa polimerizándose para formar una matriz sólida tridimensional de fibrina, cuando se producen lesiones vasculares. La fibrina además es proinflamatoria y tiene la capacidad de inducir su propia degradación para ser sustituida por componentes extracelulares. Se han utilizado tanto sin células como asociados a diferentes tipos celulares y factores de crecimiento, y se tiene que destacar ese importante papel cuando actúan como matriz dentro de los defectos del cartílago articular con un tamaño crítico, ayudando en la regulación de los procesos de reparación

espontánea (13,61,62). Sin embargo, en algunos casos se han observado algunas reacciones inmunológicas a la fibrina exógena en varios estudios con animales (63,64). No obstante, sus propiedades mecánicas son incluso más pobres que las del colágeno, por lo que se suelen utilizar en combinación con otros biomateriales para obtener constructos con propiedades mecánicas apropiadas.

1.6.2.4. Ácidos poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA)

Estos ácidos, tanto individualmente como en combinación, se fabrican a partir de α -hidroxipoliésteres, y son biocompatibles, biodegradables, con elevada capacidad para el soporte de cargas, poco irritativos y no inmunogénicos. Estos polímeros se elaboraron inicialmente como materiales de sutura quirúrgica (65), pero a lo largo de muchos estudios se ha podido evaluar su valor potencial en los procesos de reparación del cartílago (65–68).

De forma aislada no han tenido tanto éxito, puesto que poseen pobres propiedades de adhesión celular e integración tisular, junto con una baja biocompatibilidad. Pero sí que ha sido exitosa en muchos estudios *in vivo*, en animales de experimentación, la utilización de estos polímeros junto con diferentes tipos celulares, como pueden ser células pericondriales, condrocitos o

células madre mesenquimales (13), ya que tienen una elevada capacidad para el soporte de cargas, además de ser poco irritativos y no inmunogénicos (69). Actualmente ya han sido utilizados en la regeneración cartilaginosa y ósea como medicamento (70).

1.6.2.5. Hialuronano

El hialuronano, también conocido como ácido hialurónico (HA), es un polímero formado por la unión de unidades de los disacaridos N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico. En el cuerpo humano lo encontramos muy presente y distribuido por la MEC de la dermis, el humor vítreo y el cartílago (71). Dentro de la matriz extracelular es el componente mayoritario y desempeña un importante rol dentro de la transducción de señales celulares y la cicatrización de heridas. Forma macromoléculas de gran longitud y peso molecular elevado, con una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad (72). Al contrario que muchos mucopolisácaridos, no contiene grupos sulfato y posee un peso molecular muy diverso en función de su localización tisular. Es capaz de proporcionar un microambiente muy similar a las condiciones naturales, por ser uno de los compuestos mayoritarios en la MEC, y sería un biomaterial ideal para formar matrices para la reparación de cartílagos si se pudiera implantar en una forma no modificada. El conflicto aparece

cuando, para poder lograr las propiedades fisicoquímicas y la estructura necesarias para tal propósito, es necesario reticularlo por esterificación o realizar varias modificaciones sobre la molécula, como las modificaciones hidrofóbicas, hidroxílicas o carboxílicas (56). Estas modificaciones alteran sus propiedades, de manera que la biocompatibilidad se ve comprometida.

Hay diversos estudios, realizados tanto con el HA modificado como portador de condrocitos o factores de crecimiento, como combinado con otros compuestos para formar un hidrogel que lleve en el interior bien condrocitos, bien células madre mesenquimales (MSCs). Un ejemplo de estudios con combinación de biomateriales es el llevado a cabo por Liu et al. (73), en el que sintetizaron un hidrogel de HA para encapsular MSCs utilizando ácido hidrosulfónico, HA, gelatina y bisacrilamida-PEG para reparar un defecto completo de la tróclea femoral de conejos (73).

1.6.2.6. Quitosano

Otro material usado previamente en estudios sobre la regeneración cartilaginosa es el quitosano (CHT), también conocido como b-(1,4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa, que se encuentra en el caparazón de crustáceos e insectos y comercialmente se obtiene por la hidrólisis del grupo aminoacilo de la quitina. Es un mucopolisacárido que existe en la naturaleza

y que ha sido utilizado en forma de hidrogeles para aplicaciones biomédicas, gracias al parecido que posee con los GAG presentes en la matriz extracelular del cartílago hialino (74). Es un material de bajo coste, con ausencia de toxicidad (75), antibacteriano, hidrofílico, con capacidad de formar geles y con afinidad por proteínas. Una propiedad importante de este compuesto es su excelente biodegradación, causada por la lisozima, resultando en catabolitos que, según modelos teóricos, podrían estar involucrados en la formación *de novo* de queratán y condroitín sulfato (76), característica muy prometedora para facilitar la regeneración cartilaginosa. Estudios como los de Griffon et al. (77) o Zhao et al. (78) demostraron que el quitosano permite la adhesión, proliferación y secreción de MEC de los condrocitos implantados, permitiendo tanto la condrogénesis *in vitro* como *in vivo*.

1.6.2.7. Agarosa

La agarosa es un polisacárido compuesto por residuos que se alternan de D- galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa (figura 6A), que se aísla de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. La agarosa forma un gel agregando sus fibras hexagonales de seis hélices dobles y absorbiendo grandes cantidades de agua dentro de su red. Entre las características que le hacen un polímero con amplias aplicaciones están su capacidad de formación de geles,

la red polimérica hidrofílica, su inercia química y la posibilidad de controlar el tamaño de los poros generados. Además, otra propiedad que podemos destacar es su gran solubilidad en agua a temperaturas superiores a 65 °C, aunque siempre dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales, porque dichas sustituciones se pueden modificar para provocar que la temperatura de gelificación varíe entre los 17 y los 40 °C (79–81), propiedad muy útil cuando se necesita utilizar en cultivos celulares, debido a que las células no soportan temperaturas elevadas.

Es un biomaterial utilizado en gran cantidad de técnicas de biología molecular, que se ha ensayado también con cierto éxito como *scaffold* en ingeniería tisular. Como hidrogel para la regeneración del cartílago se ha utilizado como modelo para estudiar los efectos dinámicos, así como para determinar cómo afectan sus características al comportamiento celular (82–87). Además, también se ha utilizado en combinación con otros biomateriales, como la fibrina, con la finalidad de regenerar la córnea, nervios o cartílago (88–90).

1.6.2.8. Alginato

También llamado ácido algínico, el alginato es un polisacárido que se aísla de algas pardas, compuesto por residuos de 1,4-D-ácido manurónico y L-ácido gulurónico (figura 6B). Gracias a sus

propiedades viscoelásticas, su eficiencia para acomplejar iones y la buena biocompatibilidad que posee, el alginato puede utilizarse para encapsular células o fármacos (91). Además, un punto a su favor muy destacable es que está aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos para su uso en humanos. Asimismo, en comparación con otros polímeros o proteínas naturales, es económico, no es citotóxico y es de fácil manejo, formando esferas o *scaffolds* porosos en 3D en que quedan embebidas las células (92,93). No obstante, debido a la débil capacidad de adhesión que posee para las células dependientes de anclaje, no es aconsejable su utilización en solitario (56). Otros factores que pueden comprometer las propiedades del hidrogel son la concentración de la solución de alginato, la duración de la polimerización, la molaridad de la solución de polimerización y el método de esterilización (94). Estas propiedades de entorno del cultivo influyen drásticamente en la condrogénesis.

Debido a su facilidad para polimerizar y despolimerizar en presencia o ausencia de calcio, se convierte en un biomaterial de gran utilidad. Los primeros en introducir el cultivo de condrocitos en hidrogeles de alginato fueron Guo et al. (92). A lo largo de los años se ha demostrado que células adultas o condrocitos humanos adultos cultivadas con alginato sintetizan componentes de la MEC muy similares a los del tejido nativo

(95–97), favoreciendo la condrogénesis y el mantenimiento del fenotipo condrocítico al proporcionar un ambiente de cultivo tridimensional, por su falta de interacción con las integrinas celulares que ayuda a conservar la forma redondeada de las células cultivadas (98). De hecho, se ha observado que al embeber condrocitos desdiferenciados en hidrogeles de alginato son capaces de rediferenciarse fácilmente con la ayuda de los nutrientes exógenos. Pero a pesar de las buenas indicaciones *in vitro* que podemos encontrar en la bibliografía, no ocurre lo mismo con las aplicaciones *in vivo*. Si el alginato se implanta en solitario, inhibe las respuestas de reparación espontánea, provocando la generación de fibrocartílago (98), y cuando se implanta *in vivo* un hidrogel diseñado y cultivado previamente *in vitro*, induce reacciones inmunológicas severas de células gigantes a cuerpo extraño, además de sufrir una degradación al introducirse en defectos de gran espesor en animales de experimentación (98). Esto hace que sea recomendable combinar el alginato con otros biomateriales más estables y con más densidad, como puede ser la agarosa, para que el conjunto ofrezca mejores propiedades físicas, mejorando de esta forma su manejabilidad.

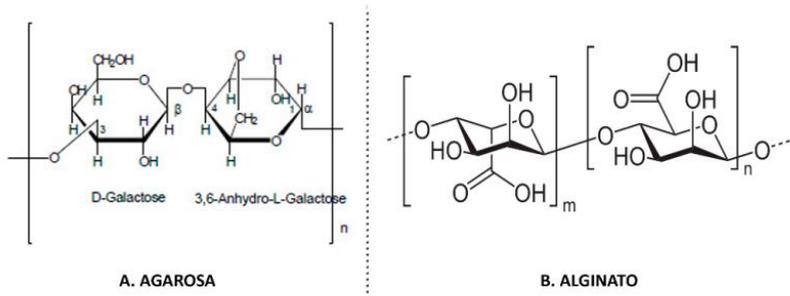


Figura 6. Estructuras moleculares de biopolímeros. Esquema de la agarosa (panel A) y del alginato (panel B).

1.6.2.9. Copolímeros

Además de los ya mencionados, se han utilizado infinidad de biomateriales en la regeneración condral, incluyendo fibras de carbono, el poliésteruretano, el ácido polibutírico o el polietilmetacrilato entre otros. Esta elevada diversidad encontrada en la literatura puede explicarse por la dificultad de reunir en un solo biomaterial todos los requisitos de la matriz condral. Con este propósito se está trabajando activamente en la generación de copolímeros, con la idea de combinar diferentes características a fin de obtener una matriz similar a la condral (99–101). Por tanto, se están empezando a proponer combinaciones entre varios de los compuestos descritos, formación de copolímeros y reticulación con varios sustratos, para poder compensar de este modo las propiedades que quizá utilizándolos en solitario serían insuficientes. Como opción a las

combinaciones también encontramos la posibilidad de realizar modificaciones químicas en alguno de los compuestos anteriormente explicados para mejorarlos, teniendo en cuenta que las modificaciones que se pueden llevar a cabo son muy diversas (56).

Existen estudios donde se combinan materiales sintéticos con naturales, combinando de esta forma las propiedades deseables de ambos biomateriales. Por ejemplo, PCL favorece el crecimiento de condrocitos cuando se combina con CHT, que aumenta la hidrofilia del PCL (100), o mejora las propiedades mecánicas al formar un constructo biomimético con péptidos autoensamblables RAD16-I que ayudan a restaurar el fenotipo condrogénico (102). Otra combinación ampliamente utilizada para múltiples usos, entre ellos la regeneración de cartílago, es la fibrina-agarosa como ya se ha dicho anteriormente (90,103–105).

Además, en algunos estudios se observa que, utilizando biomateriales híbridos, se superan algunos de los problemas que generan los constructos de un solo biomaterial. Como ejemplo, Levorson et al. (106) observaron, al comparar *scaffolds* de PCL frente a PCL/ECM con un cocultivo de condrocitos y MSCs, que la combinación provocaba un incremento de la expresión génica de colágeno tipo II y agregano en las MSCs.

1.6.3. Células utilizadas para regeneración condral

Son diversos los tipos celulares que se han utilizado tanto en sistemas con andamio como sin ellos para la generación de neocartílago. Las células candidatas para dicho propósito deben cumplir ciertas características, como ser fácilmente accesibles y exhibir tasas de proliferación y fenotipos estables. Teniendo en cuenta que el cartílago regenerado debe ser rico en agregano y colágeno tipo II, no inmunogénico y no tumorigénico (107), la fuente celular más obvia en la que se piensa es la del propio cartílago, los condrocitos. Pero debido a su baja tasa de crecimiento y desdiferenciación durante la expansión *in vitro* se comenzó a explorar el uso de diferentes células madre con potencial condrogénico (46,98,108,109).

1.6.3.1. Condrocitos y células condroprogenitoras

Obviamente, por ser las células del propio tejido que se pretende regenerar, han sido ampliamente estudiadas y utilizadas en investigación, por su capacidad de sintetizar MEC específica de cartílago tras ser estimuladas apropiadamente con un medio de cultivo específico y un entorno tridimensional (110). Las limitaciones que se encuentran con este tipo celular son, como ya se ha dicho, su pobre tasa de proliferación y la desdiferenciación que sufren durante los cultivos de expansión *in vitro*, perdiendo así su fenotipo condrogénico (99). Aunque es

posible rediferenciar las células usando factores de crecimiento apropiados en un entorno tridimensional, el fenotipo nativo no se restaura por completo, resultando en la formación de fibrocartílago en la mayoría de los casos (111). Jiang et al. (112) sugirieron que los condrocitos completamente diferenciados poseían una reserva de células madre que podía activarse en condiciones de cultivo específicas (como el cultivo en 2D con baja densidad y poca glucosa en el medio), promoviendo la expresión de CD166 (un marcador de superficie de MSCs en etapa temprana) *in vitro*. Las células condroprogenitoras derivadas de cartílago pueden crear tejido con las características del cartílago hialino cuando crecen en condiciones de cultivo específicas. Estas células exhiben un fenotipo similar al de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs), pero tienen un potencial condrogénico más alto y no inducen hipertrofia, tal y como hacen las BM-MSCs (113).

Una fuente prometedora de condrocitos debido a su potencial condrogénico inherente es el cartílago septal nasal, ya que los condrocitos obtenidos de la zona superficial del tabique nasal son positivos para los marcadores MSC, mantienen la capacidad condrogénica *in vitro* hasta el pase 35 de cultivo y proliferan más rápido que los condrocitos articulares. Curiosamente, estas células también sintetizan GAG sulfatados, grandes cantidades de colágeno tipo II y (en menor medida) colágeno tipo I durante

el cultivo de *pellets*, sin la adición de TGF- β o BMPs al medio de cultivo (114).

Pero a pesar de los avances significativos con relación al uso de condrocitos para la reparación del cartílago, siguen existiendo varios problemas que dificultan su uso. Primero, la morbilidad es bastante alta al ser necesarias dos cirugías, una para obtener cartílago no dañado, bien sea de la articulación o de otras fuentes como el septo nasal, y otra para la implantación de condrocitos expandidos *in vitro* en el defecto del cartílago. Además, en pacientes de edad avanzada, tanto la cantidad como la calidad de los condrocitos son menores que en pacientes más jóvenes (115).

1.6.3.2. Células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs son una fuente celular valiosa, con características como su adherencia a la superficie de plástico del frasco de cultivo, su morfología fibroblástica, su capacidad de proliferación prolongada en cultivo manteniendo sus características de células madre, su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células de origen mesodérmico (condrocitos, adipocitos, osteoblastos) y el que no expresan antígenos típicos del linaje hematopoyético, como CD31 y CD45. Además, se han relacionado diferentes marcadores de superficie con las MSC. Entre los más ampliamente utilizados están Stro-1, CD44, CD73,

CD90, CD105 y CD146 (116). A todo lo anterior se le suma su potencial condrogénico y el hecho de que pueden aislarse de varios tejidos, tal y como se describe a continuación, haciendo que sean una alternativa útil para la ingeniería de cartílago.

1.6.3.2.1. Células madre de la médula ósea (BM-MSCs)

La médula ósea (BM) es una de las fuentes más conocidas de MSC, que se ha utilizado ampliamente para la regeneración del cartílago, ya sean solas o sembradas en constructos, facilitando la implantación en defectos (45). Ambos enfoques han tenido éxito en el laboratorio y la clínica, encontrando mejoras en la calidad de vida y la función articular al rellenar los defectos con tejido similar al cartílago hialino (113). Las BM-MSCs se usan cuando se aplica la técnica de microfractura; las células fluyen hacia el defecto y luego se diferencian en condrocitos si el microambiente y la estimulación mecánica son apropiados (48,117). Sin embargo, algunos estudios no encontraron beneficios notables cuando se usaron BM-MSCs para reparar defectos del cartílago, ya que obtuvieron un nuevo cartílago de naturaleza fibrocartilaginosa o incluso calcificado. Además, la proporción de MSC en BM es baja (0.01 % - 0.001 %), y su potencial de diferenciación disminuye conforme se alcanza una mayor expansión *in vitro*. Finalmente, la morbilidad asociada a la

obtención de estas células hace necesario buscar otras fuentes de MSCs (113).

1.6.3.2.2. Células madre adiposas (ADSCs)

Las ADSCs tienen el potencial para diferenciarse en condrocitos, adipocitos u osteoblastos, entre otros tipos de células (118). Una de las grandes ventajas de este tipo de MSCs es que son fácilmente accesibles, ya que pueden aislarse del tejido adiposo disponible de forma rutinaria después de una cirugía de liposucción y expandirse rápidamente *in vitro* (119,120). Otra ventaja es el rendimiento, puesto que con una cantidad de 100 g de tejido adiposo se obtienen 300 veces más células que con 100 ml de BM.

En cuanto al potencial condrogénico, existe gran diversidad de resultados, en ocasiones controvertidos, puesto que, por un lado, existen varios estudios *in vitro* que han observado que las ADSCs exhiben diferenciación condrogénica cuando se cultivan por primera vez en condiciones 2D apropiadas y luego en un entorno 3D con factores condrogénicos específicos que incluyen TGF- β 1, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), y BMP-6 (113). Por otro lado, Afizah et al. (121) concluyeron que se obtienen mejores resultados *in vitro* utilizando BM-MSCs, ya que los análisis histológicos, inmunohistoquímicos y de GAG mostraron que el colágeno tipo II y los proteoglucanos eran

sintetizados por las BM-MSCs pero no por las ADSCs. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de células (122). Estudios clínicos recientes han resaltado el uso de ADSCs, y los ensayos de fase I y II han demostrado que la inyección intraarticular de ADSCs produce cartílago blanco brillante, similar al cartílago nativo, aunque queda por determinar el número óptimo de células que se deben inyectar (123).

1.6.3.2.3. Células madre derivadas de la sangre del cordón umbilical (CB-MSCs) y de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJ-MSCs)

En los últimos años, varios investigadores han utilizado esta nueva fuente de células madre para la regeneración del cartílago, tanto *in vitro* como *in vivo* (114). En términos de condiciones de cultivo, los efectos de la hipoxia o la normoxia en la hipertrofia de los condrocitos derivados de CB-MSCs son controvertidos. Gómez-Leduc et al. (124) determinaron que la normoxia inicial seguida de un período de hipoxia ayudó a la expresión de marcadores específicos de condrocitos, al igual que la adición de TGF- β 1 y BMP-2. La normoxia inicial favoreció la diferenciación condral y la hipoxia ayudó a estabilizar el fenotipo condrocítico. Otros estudios también enfatizaron la utilidad de la hipoxia, que mejoró la expresión de marcadores condrocíticos como Sox-9 y colágeno tipo II (125).

Sin embargo, Desancé et al. (126) no encontraron diferencias en los niveles de marcadores de condrocitos hipertróficos (colágeno X y MMP-13) en cultivos normóxicos o hipóxicos. Los estudios *in vivo* combinando CB-MSCs con hidrogeles de HA se han llevado a cabo tanto en modelos animales como clínicamente en pacientes con osteoartritis, observando cartílago rico en GAG y colágenos de tipo X y II desarrollado en los defectos (127). Además, la artroscopia reveló la formación de un cartílago hialino firme (128). Otro estudio interesante que utilizó un modelo de defecto osteocondral de conejo empleó células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (hWJ-MSCs), que son menos inmunogénicas que otras MSCs adultas. Se generó un neocartílago completamente integrado de tipo hialino usando hWJ-MSCs no diferenciadas. El cartílago era de mejor calidad que el obtenido usando hWJ-MSCs diferenciadas inducidas por TGF- β (129).

1.6.3.2.4. Células madre de sangre periférica (PB-MSCs)

La sangre periférica (PB) es una fuente de MSC de fácil acceso, útil en la regeneración del cartílago. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) enriquece eficazmente las PB-MSCs (130).

Varios estudios han comparado el potencial condrogénico de PB-MSCs con el de BM-MSCs. En términos de morfología y producción de GAG *in vitro*, ambos tipos de células exhibieron un comportamiento similar, pero las células derivadas de PB exhibieron un mayor potencial de diferenciación condrogénica que las BM-MSCs (131).

Los estudios clínicos en pacientes han confirmado la efectividad de las PB-MSCs inyectadas en combinación con HA (132,133). La evaluación histológica del cartílago regenerado y los datos de imágenes de resonancia magnética mostraron que los resultados fueron mejores que los proporcionados por HA solo. En resumen, son una opción prometedora para la regeneración del cartílago articular, ya que pueden obtenerse utilizando un método mínimamente invasivo y su potencial de diferenciación condrogénica parece ser comparable o incluso mayor que el de las BM-MSCs.

1.6.3.2.5. Células madre de membrana sinovial (SM-MSCs) y del líquido sinovial (SF-MSCs)

Las SM-MSCs ofrecen varias ventajas en términos de regeneración de cartílago, puesto que pueden expandirse *in vitro* durante períodos prolongados. Además, su capacidad de diferenciación multilínea no se ve afectada por la edad del donante o el número de pase celular. Estas células exhiben un

mayor potencial condrogénico en comparación con las BM-MSc *in vitro* y, por lo tanto, aunque los epítomos de superficie y el potencial de proliferación son similares, los *pellets* de cartílago derivados de la membrana sinovial fueron significativamente más grandes que los derivados de la BM provenientes del mismo paciente en condiciones de cultivo óptimas (cultivo de *pellets* con TGF- β , dexametasona y BMP-2) (113,134).

Además, las MSC, presentes en el líquido sinovial (SF-MSc) de la articulación de rodillas normales, aumentan en número después de una lesión y a medida que progresa la osteoartritis (113,135). Las SF-MSc comparten más antígenos y expresión de genes MSC con las SM-MSc que las BM-MSc. En un estudio reciente se observó que las SF-MSc exhiben potencial condrogénico en un modelo de reparación de defectos de cartílago de conejo, donde se detectó macroscópica e histológicamente cartílago de tipo hialino (113,136).

1.6.3.2.6. Células madre de pulpa dental (DPSCs)

Las células madre de pulpa dental humana (hDPSC) son MSC de renovación automática, ubicadas dentro del nicho perivascular de la pulpa dental (137). Poseen muchas características que las hacen idóneas para su utilización. Lo primero y más importante es que se obtienen fácilmente y de una forma menos invasiva (138). Además, al poder ser autólogas, disminuyen las

posibilidades de rechazo. En condiciones específicas, pueden diferenciarse *in vitro* en una gran variedad de tipos celulares, como son condrocitos, odontoblastos, osteoblastos, cardiomiocitos, neuronas y adipocitos (138–140). Las DPSCs normalmente permanecen quiescentes cuando están en la pulpa dental, pero responden rápidamente tras la cirugía. Tienen una capacidad proliferativa alta y se diferencian de inmediato en los distintos tipos celulares mencionados anteriormente (138). Algunos estudios han mostrado que las DPSC cultivadas en medio condrogénico expresan colágeno tipo I y II (141) junto con otros marcadores condrogénicos, como el agrecano, Sox9 y la fosfatasa alcalina (142). En un estudio reciente, fue evidente la regulación positiva significativa de genes condrogénicos tras el cultivo en constructos 3D con un copolímero de gelatina metacrilatada-HA; por lo tanto, de nuevo parece un requisito importante el entorno tridimensional para la diferenciación condrogénica tanto de DPSC como de otras células condrogénicas. En nuestro caso hemos podido comprobar cómo al introducir las hDPSCs en alginato e implantar el constructo en un modelo *in vivo* de daño articular en conejo, mostraron un recubrimiento completo del daño al cabo de 3 meses, con una apariencia macroscópica similar a la del cartílago hialino, además de mostrar fibras de colágeno tipo II (98).

1.6.4. Factores de crecimiento y diferenciación

Existen numerosos factores de crecimiento intrínseco o extrínseco que funcionan de manera independiente o se complementan entre sí para el mantenimiento de la homeóstasis del cartílago. En general estos factores de crecimiento estimulan la síntesis de la matriz condrocítica y disminuyen el efecto catabólico de las MMP y las citosinas, además de estimular la proliferación de MSCs, aumentando la producción de matriz y regulando negativamente la expresión génica de colágeno tipo I (52). Muchos factores, tanto de crecimiento como de diferenciación, están implicados en la regulación del desarrollo del cartílago y la homeostasis del cartílago articular maduro (figura 7) (143).

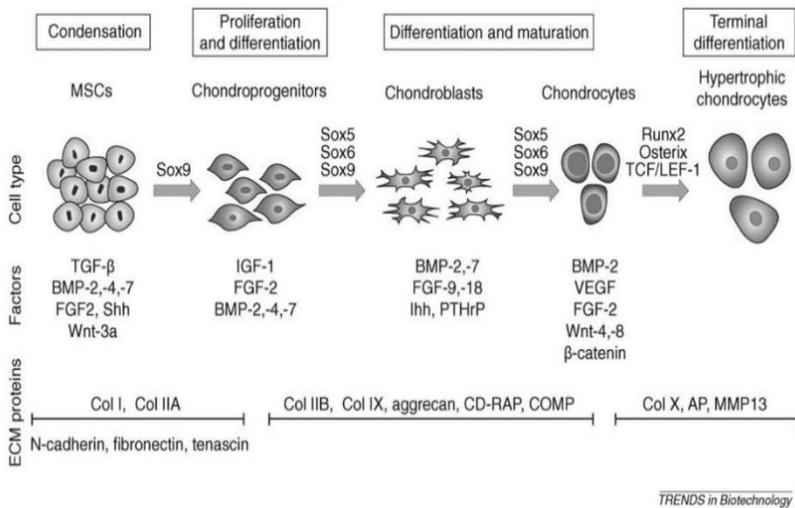


Figura 7. Secuencia de eventos que conducen a la diferenciación de MSCs hacia condrocitos. Las diferentes etapas de la condrogénesis están representadas esquemáticamente. Se muestran los perfiles de expresión temporal de los diferentes factores de crecimiento y diferenciación y se indican los principales factores de transcripción involucrados en cada etapa. Las proteínas que son características de la matriz extracelular (ECM) de las distintas etapas se destacan en la parte inferior de la figura (143).

A continuación enumeramos las principales familias de factores bioquímicos utilizados en ingeniería tisular condral que incluyen r TGF- β , proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), activinas e inhibinas (143).

1.6.4.1. Familia de TGF- β

Dentro de la familia de TGF- β s se incluyen más de 20 miembros en mamíferos (144) no obstante, existen 5 miembros que se encuentran predominantemente en cartílago y hueso (TGF- β 1-5), aunque son TGF- β -1, 2 y 3 los que estimulan la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II por los condrocitos e inducen la diferenciación condrogénica de las MSCs *in vitro* (145), siendo la isoforma TGF- β -3 la que posee el mayor potencial condrogénico (146). Aunque estudios *in vivo* han demostrado que TGF- β -1 induce la diferenciación condral de las MSCs, para formar cartílago ectópico, otros estudios encontraron que la inyección directa en las articulaciones desencadenó la formación de osteofitos, la inflamación del cartílago y la hiperplasia sinovial (147,148). Los receptores de la familia TGF-beta son heterodímeros, con un dominio extracelular que acepta la molécula BMP y un dominio intracelular unido a moléculas de las cascadas de señalización SMAD (144).

1.6.4.2. Familia BMPs

Las BMPs son moléculas homodiméricas (146) que constituyen una gran subclase de 20 polipéptidos con roles esenciales en la condrogénesis y osteogénesis durante el desarrollo del esqueleto, siendo de gran influencia en varias respuestas biológicas como el crecimiento celular, la proliferación, la

diferenciación y la apoptosis (143,146). El plegado de las dos subunidades separadas en la estructura terciaria no es espontáneo, sino que requiere una acción coordinada (149). Por ello, dentro del tejido las BMPs se encuentran en su pro-forma inactiva (144). Dado que se necesitan condiciones relativamente estrictas para solubilizar las BMP del tejido, es muy probable que esos factores estén unidos a estructuras moleculares como las fibras de colágeno y / o los agregados de proteoglicanos (150). Varias BMP, incluidas BMP-2, -4, -6 y -7, pueden estimular la diferenciación condrogénica de las MSC (151), ya que inducen la expresión de TGF- β (45), y mejorar la síntesis de colágeno II y agregano por los condrocitos *in vitro* (152). *In vivo*, la curación de defectos de cartílago de grosor completo en conejos mejoró cuando se combinaron microfracturas y BMP-7 recombinante (153). Sin embargo, cuando se implantan en localizaciones ectópicas, las BMP originan la formación de tejido óseo, lo que sugiere que, para una estrategia óptima de ingeniería de tejidos, las BMP deben estar bien reguladas, ya que de lo contrario favorecerían la osteogénesis. El margen de la dosis que tiene efecto regenerativo en el tejido es por tanto estrecho (45). El uso de BMP-2,-4 y -7 ha sido aprobado para algunas aplicaciones clínicas (154), pero su potencial para mejorar la reparación del cartílago aún debe ser validado en humanos.

1.6.4.3. Familia FGFs

En cuanto a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), cabe destacar que son 22 proteínas relacionadas estructuralmente que se unen a uno de los 4 receptores FGF (FGFR). La interacción entre FGF y FGFR-HS (receptores de FGF y heparán sulfato) estabiliza los FGF y activa múltiples vías de transducción de señales (143). Están involucradas en múltiples funciones como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la motilidad celular (144).

Uno de los factores mejor estudiados dentro de la familia FGF, en términos del efecto sobre los condrocitos y las células madre mesenquimales, es el FGF-2. Se sabe que este factor de crecimiento promueve la proliferación de condrocitos y células madre mesenquimales de diferente origen. Además, varios estudios proporcionan evidencias de que el tratamiento con FGF-2 durante la expansión de condrocitos no solo influye en la proliferación y diferenciación celular, sino también en el potencial de los condrocitos para rediferenciar y responder a moléculas reguladoras tras la transferencia a un entorno 3D.

Posiblemente, este efecto es inducido por la inhibición de la formación de los haces de fibras de estrés de actina F a través de FGF-2, que de otro modo se forman durante la expansión de la monocapa, que se mantienen durante el cultivo de tejidos y que

están asociados con una capacidad reducida de los condrocitos para volver a expresar su fenotipo diferenciado (155).

Las células madre mesenquimales humanas expandidas en medio suplementado con FGF fueron más pequeñas y proliferaron más rápidamente que las células madre expandidas en condiciones control. Los cultivos condrogénicos hechos con células madre tratadas con FGF formaron esferoides de cartílago más grandes y que contenían más proteoglicanos que los producidos con células control. Además, los agregados tridimensionales de las células tratadas con FGF-2 carecían de la capa externa en que estaba presente el colágeno tipo I y ausente el colágeno tipo II, característica de los agregados de células no tratadas (156). No obstante, también se ha observado que el FGF-2 puede antagonizar la síntesis de proteoglicanos y aumentar las MMP (52). Junto con FGF-2, que participa en la homeostasis del cartílago, se ha estudiado el FGF-18, que ejerce efectos anabólicos sobre el cartílago (146). Ambos exhiben potencial condrogénico tanto *in vitro* como *in vivo*, promoviendo la deposición de la matriz y la expresión de marcadores condrogénicos de MSC estimuladas cuando se utilizan solos o combinados con otros factores de crecimiento, como TGF- β o BMP-2 (45).

1.6.4.4. Familia IGFs

Otra de las familias estudiadas es la del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), que tiene un importante papel en el desarrollo del esqueleto, ya que estimula la proliferación celular y regula la apoptosis y expresión de los marcadores condrogénicos (146). Consta de los ligandos IGF-1 e IGF-2, los receptores IGF1R e IGF2R, al menos seis proteínas de unión IGF distintas (IGFBPs) y múltiples proteasas IGFBP, las cuales regulan la actividad IGF. En lo que respecta a la IGF-2, principalmente tiene un papel en el desarrollo embrionario y fetal, mientras que IGF-1 es más relevante en la reparación del cartílago (143). IGF-1 se considera por tanto un mediador esencial de la homeostasis del cartílago a través de su capacidad para estimular la síntesis de proteoglicanos y promover la supervivencia y proliferación de condrocitos (157). IGF-1 también induce la diferenciación de MSC hacia el fenotipo condrocítico (158), ya que se ha podido constatar cómo mejoró la formación de cartílago *in vitro* en constructos y en *pellets* de MSC transfectadas con IGF-1 (159) y promovió la reparación de defectos de cartílago articular *in vivo* (52).

Los factores de crecimiento, cuando se usan en combinación, funcionan sinérgicamente, como BMP-7 e IGF-1, que conducen a una síntesis mejorada de la matriz del cartílago (160). IGF-1,

FGF-2 y TGF- β en condiciones *in vitro* regulan su propia expresión y la producción de proteínas de cada uno (161). También se demostró que la combinación de IGF-1 y TGF- β tiene un mayor potencial de curación en comparación con el efecto individual de IGF-1, involucrado en la protección de la membrana sinovial, mostrando un engrosamiento reducido que representa la falta de inflamación crónica (157)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Tal y como se ha mencionado en el apartado de Introducción de la presente tesis, el tejido cartilaginoso posee ciertas propiedades debidas a la composición de la matriz condral que, como ya se ha explicado, es secretada y mantenida por los condrocitos, y que a su vez es la responsable de las diferentes funciones.

Otro punto en el que se apoya nuestra tesis es en la gran variedad de alteraciones que sufre dicho tejido, con multitud de orígenes, como procesos fisiológicos derivados del envejecimiento, alteraciones patológicas relacionadas con enfermedades infecciosas e inmunológicas, e incluso traumas o lesiones relacionadas con el crecimiento tumoral. Además, las lesiones de alto grado generalmente se resuelven mal, generándose en muchos casos un tejido fibrótico que no sustituye adecuadamente al tejido lesionado, con la consecuente afectación de la salud del paciente. En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos desde la ingeniería tisular para generar sustitutos funcionales del cartílago. Pero existen varias dificultades, como la obtención de condrocitos que sintetizen una matriz condral adecuada o la lenta división de estas células obtenidas a partir de biopsias de cartílago, siendo difícil obtenerlas en grandes cantidades. Por otra parte, sufren procesos de desdiferenciación hacia estirpes con rasgos

fibroblásticos, que terminan generando un tejido fibroso rico en colágeno tipo I, cuando se utiliza cultivo en monocapa, *in vitro*.

Otra posibilidad para regenerar cartílago es la diferenciación condrogénica de células madre adultas. Existen diferentes publicaciones que demuestran cómo pueden diferenciarse las células madre de médula ósea a partir de precursores aislados de la médula o de tejido óseo. Mientras que en el primero de los casos es difícil la obtención del tejido, en el segundo caso los condrocitos diferenciados expresan colágeno I, produciendo una matriz condral muy divergente de la característica del cartílago hialino.

En esta tesis proponemos como alternativa para la regeneración condral el empleo de células madre de pulpa dental (hDPSCs), planteando la hipótesis de que su uso puede permitir obtener un tejido cartilaginoso funcional sin que se den los inconvenientes anteriormente citados. Son células madre mesenquimáticas y pueden ser fácilmente aisladas de elementos dentarios, habiéndose demostrado su capacidad de diferenciarse en células osteogénicas, células de Schwann, fibras musculares esqueléticas, etc. No obstante, su capacidad de diferenciación a estirpes condrales no se conoce con profundidad, por lo que inicialmente se necesitará caracterizar las hDPSCs, diferenciarlas

en células condrogénicas y compararlas con condrocitos, para definir si son útiles en la regeneración del cartílago.

Además, estudiaremos el efecto que diversos soportes tienen sobre las células (hDPSCs y condrocitos), tanto *in vitro* como *in vivo*, al introducirlas en un modelo animal, generando matriz condral funcional. Proponemos que, dadas las peculiaridades del tejido cartilaginoso, el copolímero alginato-agarosa puede ser un soporte adecuado que previsiblemente va a favorecer la producción de una matriz condral funcional.

Los objetivos por tanto para poder dar respuesta a la hipótesis planteada fueron:

Objetivo 1. Caracterización de células madre adultas derivadas de pulpa dental humana, evaluando mediante técnicas de biología molecular y de citometría de flujo la expresión de marcadores mesenquimales y de hDPSCs.

Objetivo 2. Caracterización de condrocitos humanos obtenidos a partir de cartílago articular, evaluando por técnicas de biología molecular la expresión de marcadores de estirpe condral.

Objetivo 3. Evaluación de la diferenciación de los dos tipos celulares a células condrales, incubándolas en medio de diferenciación de condroblastos y evaluando mediante técnicas

de biología molecular e histoquímicas la expresión de marcadores de estirpe condral.

Objetivo 4. Puesta a punto de la fabricación de constructos de alginato.

Objetivo 5. Estudio del comportamiento de dichas células en esferas y cilindros de alginato. Comparación fenotípica entre los condrocitos primarios de cartílago articular y las hDPSCs cultivadas en este entorno.

Objetivo 6. Análisis del comportamiento de los constructos generados con alginato, tanto con hDPSCs como con células condrales, en un modelo animal con daño articular. Caracterización histopatológica.

Objetivo 7. Fabricación de copolímeros de alginato-agarosa y estudio de las características biomecánicas y citotóxicas de las diferentes concentraciones.

Objetivo 8. Estudio del comportamiento de dichas células cuando se las cultiva en el copolímero de alginato-agarosa. Comparación fenotípica y de expresión de marcadores condrales entre los condrocitos primarios de cartílago articular y las hDPSCs.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Medios y soluciones

3.1.1.1. Medios

- Medio de proliferación/mantenimiento de hDPSCs:

Alfa-MEM suplementado con 10% de FBS no inactivado, 1% L-glutamina, 1% de antibióticos/penicilina estreptomina, y 1% de fungizona/amfotericina B.

- Medio de proliferación/mantenimiento de condrocitos:

DMEM con alto contenido en glucosa suplementado con 1% antibióticos penicilina estreptomina, 1% L-glutamina, 1% piruvato sódico, 1% aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de Fungizona/Amfotericina B, 10% de FBS inactivado y 1% de ácido ascórbico.

- Medio de diferenciación a condrocitos:

DMEM con alto contenido en glucosa suplementado con 1% antibióticos penicilina estreptomina, 1% L-glutamina, 1% piruvato sódico, 1% aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% de fungizona/amfotericina B, 1% de FBS inactivado, TGF- β 1 10 ng/ml, 1% de ácido ascórbico y 1% ITS (insulina transferrina).

3.1.1.2. Soluciones

➤ Soluciones Alginato:

Alginato 1,5% y 3%:

Para realizar las soluciones de alginato se siguió el protocolo de De Ceuninck et al. (162). Se preparó una solución madre al doble de concentración de todos los componentes para luego diluir con agarosa o PBS según las necesidades. La composición de alginato de la solución madre fue al 3% o al 6% [*Alginic Acid Sodium salt from Brown algae*], 40mM HEPES, NaCl 300 mM y agua destilada estéril para cultivos.

Para prepararla, primero se disolvió el HEPES y el NaCl en agua para cultivo. Se calentó la mezcla a 60 °C y se añadió el alginato con constante agitación, hasta que la solución quedó homogénea. Tras dejar que la solución se enfriase a temperatura ambiente se ajustó el pH a 7,4 (empleando tiras indicadoras de pH en el rango 6,0-7,7). Por último, se ajustó el volumen final con agua destilada y se autoclavó.

➤ Soluciones Agarosa:

Agarosa 0,5% y 1%:

De igual forma se preparó una solución madre al doble de concentración de todos los componentes para luego diluir con alginato o PBS según las necesidades. Se pesó la agarosa

necesaria para obtener disoluciones madre al 1% y al 2% utilizando *Agarose type IX-A ultra-log gelling temperature* y añadiendo para diluir PBS sin calcio ni magnesio, realizando todas las manipulaciones en una cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

- Solución de polimerización:

Cloruro cálcico (CaCl₂):

De nuevo se utilizó las indicaciones de De Ceuninck et al. (162) para preparar la solución de polimerización del alginato. Se preparó cloruro cálcico a diferentes concentraciones (102 mM, 150 mM, 200 mM y 500 mM), añadimos también una solución tampón de HEPES (1M), a una concentración final 10 mM, todo ajustado a pH 7,4 y filtrado con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (el pH se midió de la misma manera que en el caso de la disolución de alginato, en campana y empleando papel indicador pH).

- Soluciones para la fijación manual:

Ambas soluciones se prepararon siguiendo indicaciones de Tritz et al. (163).

Fijador:

Se preparó con formol al 4% (formalina 10%) añadiendo cacodilato sódico a una concentración final 100 mM y CaCl₂ 10 mM. Tras homogenizar la disolución se utilizó el pH-metro para medir el pH de la disolución y se ajustó a un pH 7,4.

Tampón fijador:

Se diluyó cacodilato sódico en agua destilada a una concentración 100 mM junto con BaCl_2 a 50 mM y se ajustó el pH a 7,4.

➤ Tinción rojo sirio

Solución rojo sirio-acido pícrico:

Para preparar esta solución se mezclaron 50 ml de una solución al 1 % de rojo sirio F3BA con 450 ml de una solución acuosa saturada de ácido pícrico. La solución resultante se dejó reposar 48 horas antes de usarla.

3.1.2. Reactivos

A continuación se presentan todos los reactivos empleados (de la tabla 4 a la tabla 14) para las diferentes técnicas realizadas junto con su referencia y su casa comercial.

Tabla 4. Reactivos empleados para elaborar el medio de proliferación de condrocitos.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|--------------------|---|--|-------------|
| Medio | DMEM High Glucose, N/Glut | [GIBCO, [Thermo Fisher Scientific, Carlsband, EE.UU] | 10938-025 |
| P/S (Antibióticos) | Pen Strep (penicillin Streptomycin) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 15140-122 |
| Fungizona | Amphotericin B 100X | [EUROCLONE, Italia] | ECM0009D |
| NEEA | MEM NEEA (100X) (Non-Essential Amino Acids) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 11140 – 035 |
| Piruvato | Na Pyruvate (100 mM Solution) | [LONZA, Suiza] | BE13 -115E |
| Ácido ascórbico | L-Ascorbic acid (100MG) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | A4403-100MG |
| L-Glutamina | L-Glutamine 200mM (100X) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 25030-081 |
| FBS Inactivado | FBS (Fetal Bovine Serum) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 10270-106 |

Tabla 5. Reactivos para elaborar el medio de proliferación de hPSCs.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------|
| Medio | MEM Alpha Medium (1X) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 22571 – 020 |
| P/S (Antibióticos) | Pen Strep (penicillin Streptomycin) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 15140-122 |
| Fungizona | Amphotericin B 100X | [EUROCLONE, Italia] | ECM0009D |
| L-Glutamina | L-Glutamine 200mM (100X) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 25030-081 |
| FBS | FBS (Fetal Bovine Serum) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 10270-106 |

Tabla 6. Reactivos para elaborar el medio de diferenciación condrogénica.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|---------------|--|------------------------------|-------------|
| ITS | Insulin - Transferrin - Selenium | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 41400 – 045 |
| TGFB-1 | Transforming Growth Factor - β 1 human | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | T7039-50UG |

Tabla 7. Reactivos utilizados en técnicas de cultivos celulares.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|----------------------|--|--|-------------------|
| Tripsina-EDTA | 0,25% Trypsin-EDTA (1X) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 25200-056 |
| PBS | DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (-Ca & -Mg) | [EUROCLONE, Italia] | ECB4004L |
| Azul tripán | Trypan Blue Stain 0.4% | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 15250 – 061 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide for cell culture | [PanReac AppliChem - ITW Reagents, Alemania] | A3672,0100 |

Tabla 8. Reactivos utilizados para realizar la citometría de flujo.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA | |
|----------------------|--|---------------------------------------|--------------------------|-------------|
| Acutasa | Stempro accutase | [Thermo Fisher Scientific, EE.UU] | A1110501 | |
| kit anexin-IP | ANNEXIN V - FITC KIT Apoptosis detection kit | [IMMUNOSTE P S.L, Salamanca, España] | ANXVKF-100T | |
| Anticuerpo | CD31 | PE/Cy7 anti-human CD31 | [BioLegend, EEUU] | 303118 |
| | CD45 | Brilliant Violet 510 anti-human CD45 | [BioLegend, EEUU] | 304035 |
| | CD105 | Brilliant Violet 421 anti-human CD105 | [BioLegend, EEUU] | 323219 |
| | CD146 | PE anti-human CD146 | [BioLegend, EEUU] | 361005 |
| | CD44 | PE/Cy5 anti-human CD44 | [BioLegend, EEUU] | 103009 |
| | CD29 | Alexa Fluor 488 anti-human CD-29 | [BioLegend, EEUU] | 303015 |
| | STRO-1 | APC Anti-human STRO-1 | [EXBIO, Republica Checa] | 1A-649-C025 |
| | Zombie | Zombie Nir Fixable Viability kit | [BioLegend, EEUU] | 42 3105 |
| BSA | Albumin from bovine serum | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | A2153 | |
| PBS | Dulbecco's phosphate buffered saline (-Ca & -Mg) | [EUROCLONE, Pero, Italia] | ECB4004L | |

Tabla 9. Reactivos utilizados en las técnicas de fabricación de constructos y en el ensayo de citotoxicidad.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|------------------------|--|---|--------------|
| Alginato | Alginic acid sodium salt from brown algae | [SIGMA-Merck KGaA, Suiza] | A0682 - 100G |
| Agarosa | Agarose (Type IX-A, Ultra-low Gelling Temperature) | [SIGMA-Merck KGaA, Suiza] | A2576 - 25G |
| Cloruro cálcico | Calcium chloride (anhydrous) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | C5670 - 100G |
| Cloruro sódico | Sodium chloride | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | S5886 - 500G |
| Agua | Water (sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | W3500-500ML |
| PBS | Dulbecco's phosphate buffered saline (-Ca & -Mg) | [EUROCLONE, Italia] | ECB4004L |
| HEPES | HEPES Buffer Solution (1M) | [GIBCO, [Thermo Fisher Scientific, EE.UU] | 15630 - 056 |
| Tiras pH | pH Test Strips 6.0-7.7 | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | P-3536 |
| MTS | CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) | [Promega Biotech Ibérica S.L, España] | G5430 |

Tabla 10. Reactivos utilizados para la inmunofluorescencia en 2D y 3D.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|--|---|------------------------------------|------------|
| Anticuerpo secundario anti-ratón | Anti-Mouse IgG F(ab') ₂ Frag-FITC | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | F2883 |
| Anticuerpo secundario anti-conejo | Anti-Rabbit IgG F(ab') ₂ Frag-FITC | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | F1262 |
| ACAN | aggrecan (H-300) rabbit polyclonal IgG | [Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.] | sc-25674 |
| Aceite de inmersión | Immersol TM 518F | [ZEISS, Alemania] | 10539438 |
| BSA | Albumin bovine serum | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | A2153 |
| COL I | Monoclonal Anti-Collagen Type I antibody in Mouse | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | C2456 |
| COL II | Anti-Collagen Type II Mouse mAb (II-4C11) | [Merck KGaA, Alemania] | CP18 |
| DAPI | 4, 6-diamidino-2-fenilindol | [Merck KGaA, Suiza] | 124653 |
| Diluyente | Envision FLEX Antibody Diluent | [Dako, Dinamarca] | K8006 |
| Faloidina conjugada con rodamina | Rhodamine phalloidin | [Thermo Fisher Scientific, EE.UU.] | R415 |
| Formol | Formaldehyde 4% (Formalin 10%) | [VWR Chemicals BDH®, Bélgica] | 9.713,5000 |
| Medio de montaje | Fluoroshield with DAPI | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | F6057 |
| Medio de montaje | Dako Fluorescence Mounting Medium | [Dako, Dinamarca] | S3023 |
| PBS | Dulbecco's phosphate buffered saline (-Ca/ -Mg) | [EUROCLONE, Italia] | ECB4004L |
| Triton | TRITON X-100 | [Merck KGaA, Alemania] | 112298 |

Tabla 11. Reactivos utilizados en las técnicas histoquímicas.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|---|---|-------------------------------|------------|
| Hematoxilina | Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution | [Merck KGaA, Alemania] | 1092532500 |
| Eosina | Eosin Y-solution 0,5% aqueous | [Merck KGaA, Alemania] | 109844100 |
| Rojo Directo 80 | Direct Red 80 | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | 365548-5G |
| Ácido pícrico, solución saturada | Picric acid solution 1,3% in H ₂ O (saturated) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | P6744-1GA |
| Etanol | Alcohol 99 par. Des. F.B. | [Alcoholes MONTPLET, España] | 0321F |
| Xilol | Xylene | [VWR Chemicals BDH®, Bélgica] | 28973363 |
| Pegamento de montaje | Dako Toluene - Free Mounting Medium | [Dako, Dinamarca] | CS705 |
| Compuesto para la inclusión | Polyester Wax for Microscopy (Paraffin WAX) | [VWR Chemicals BDH®, Bélgica] | 360704E |
| Compuesto para la inclusión | Paraplas Plus (Surgipath) (Paraffin) | [Leica, Alemania] | 39602004 |
| Solución descalcificadora suave | OSTEOSOFT | [Merck KGaA, Alemania] | 1017289010 |
| Gel de sílice desecante | Gel Sílice 2-5 mm indicador (CoCl ₂ 0,5%) | [Quimivita, España] | GE0045QP |
| Formol | Formaldehyde 4% (Formalin 10%) | [VWR Chemicals BDH®, Bélgica] | 9.713,5000 |
| Cacodilato sódico | Cacodylic acid sodium salt | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | C - 0250 |

| | | | |
|---------------------------------|----------------------------|------------------------|------------|
| BaCl₂ | Barium chloride dihydrate | [Merck KGaA, Alemania] | 1017190500 |
| CaCl₂ | Calcium chlorid – Dihydrat | [Merck KGaA, Alemania] | 1023820500 |
| Soluciones ajustar el pH | Sodium Hydroxide (NaOH) | [Merck KGaA, Alemania] | 1064691000 |
| | Hydrochloric acid (HCl) | [Merck KGaA, Alemania] | 1090571000 |

Tabla 12. Reactivos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|---|---|-----------------------------------|-------------------|
| PBS | Dulbecco's phosphate buff saline (-Ca/-Mg) | [EUROCLONE, Italia] | ECB4004L |
| Diluyente | Envision FLEX Antibody Diluent | [Dako, Dinamarca] | K8006 |
| Anticuerpo primario (COL II) | Anti-Collagen Type II Mouse mAb (II-4C11) | [Merck KGaA, Alemania] | CP18 |
| Proteinasa K | Dako Proteinase K Ready-to-use | [Dako, Dinamarca] | S3020 |
| Peroxidasa | Dako REAL TM Peroxidase -Blocking Solution | [Dako, Dinamarca] | S2023 |
| Anticuerpo secundario anti-ratón | goat anti-mouse IgG- HRP | [Santa Cruz Biotechnology, EE.UU] | sc-2005 |
| Revelador | 3,3'-diaminobenzidine | [Dako, Dinamarca] | K3468 |
| Hematoxilina | Papanicolaou's solution 1a Harris' hematoxylin solution | [Merck KGaA, Alemania] | 1092532500 |
| Etanol | Alcohol 99 par. Des. F.B. | [Alcoholes MONTPLET, Spain] | 0321F |
| Xilol | Xylene | [VWR Chemicals BDH®, Bélgica] | 28973363 |
| Pegamento de montaje | Dako Toluene - Free Mounting Medium | [Dako, Dinamarca] | CS705 |

Tabla 13. Reactivos utilizados para la extracción de RNA celular en cultivos 2D y 3D, y para la RT-PCR.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|----------------------------------|---|--|-------------|
| Agua | Water (sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture) | [Sigma-Merck KGaA, Alemania] | W3500-500ML |
| Cloroformo | Dicloromethane stabilized with anylene | [PanReac AppliChem-ITW Reagents, Alemania] | 361254.1612 |
| Etanol | Etanol absolute (HPLC-gradient grade) PAI | [PanReac AppliChem-ITW Reagents, Alemania] | 221086.1612 |
| Glucógeno | D-Glycogen | [Thermo Fisher Scientific, EE.UU] | BP676-5 |
| Kit de retrotranscripción | High Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (200 muestras) | [Thermo Fisher Scientific, Lituania] | 4374966 |
| Isopropanol | 2-Propanol | [Merck KGaA, Alemania] | 1096341000 |
| Kit de extracción de RNA | RNeasy Plant Mini Kit | [Qiagen, Alemania] | 74903 |
| TRIzol | TRIzol LS Reagent | [Thermo Fisher Scientific, EE.UU] | 10296010 |

Tabla 14. Reactivos utilizados en la PCR Real Time Cuantitativa.

| REACTIVO | NOMBRE COMERCIAL | CASA COMERCIAL | REFERENCIA |
|---|--|-----------------------------------|----------------|
| Mezcla para la amplificación por PCR | TaqMan® Gene Expression Master Mix, 1-Pack (1x5mL) | [Thermo Fisher Scientific, EE.UU] | 4369016 |
| Sondas específicas de genes humanos | ACAN | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00153936_m1 |
| | ACTB | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs99999903_m1 |
| | B-ACT | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | 4326315E (VIC) |
| | COL10A1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00166657_m1 |
| | COL1A1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00164004_m1 |
| | COL2A1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00264051_m1 |
| | GAPDH | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | 4325793 (VIC) |
| | HIF1A | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00153153_m1 |
| | MMP1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00899658_m1 |
| | MMP13 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00233992_m1 |
| | MMP2 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs01548727_m1 |
| | PPARGC1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs01016719_m1 |
| | RUNX1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs01021971_m1 |
| | SOX5 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs01552796_m1 |
| | SOX6 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00264525_m1 |
| | SOX9 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00165814_m1 |
| SPARC | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00234160_m1 | |

| | | | |
|--|-------|----------------------------------|----------------|
| | TIMP1 | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00171558_m1 |
| | VEGFA | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | Hs00900055_m1 |
| | 18S | [Thermo Fisher Scientific, EEUU] | 4319413E (VIC) |

3.1.3. Material fungible

El material fungible utilizado para todas las técnicas realizadas en la presente tesis se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Material fungible utilizado en la presente tesis.

| MATERIALS | CASA COMERCIAL |
|---|--------------------------------------|
| Agujas 21G D microlance | Thermo Fisher Scientific, EE.UU. |
| Botes de orina 100 ml | EuroClone, Pero, Italia |
| Casetes M490 – HISTOSETTE® I TISSUE CASSETTES | Merck Millipore, Irlanda |
| Corning cell strainer (70 micrómetros) | EuroClone, Pero, Italia |
| Cubreobjetos COVN-050-100 | FEATHER Safety Razor Co., Japan |
| Cuchillas R35 Feather microtome blade | Deltalab, Barcelona, España |
| Filtros de 0,2 µm de tamaño de poro | EuroClone, Pero, Italia |
| Frascos de cultivo de 25 cm² (T25) | Deltalab, Barcelona, España |
| Frascos de cultivo de 75 cm² (T75) | Deltalab, Barcelona, España |
| Jeringuillas 10 ml BD Discardit II | Deltalab, Barcelona, España |
| Lámina de sellado estándar de placas para PCR y qPCR | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Microtubos Eppendorf 0,5 ml | Deltalab, Barcelona, España |
| Microtubos Eppendorf 1,5 ml | Becton Dickinson S.A, Huesca, España |
| Millicell R EZ Slide 4-Well Glass | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Millicell R EZ Slide 8-Well Glass | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Pipetas de cristal 150 mm | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Pipetas pPsteur 3 ml | Deltalab, Barcelona, España |
| Pipetas serológicas de 10 ml | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Pipetas serológicas de 25 ml | Deltalab, Barcelona, España |
| Pipetas serológicas de 5 ml | Sarstedt AG & Co., Alemania |
| Placas petri 55 cm² | Corning, EE.UU. |
| Placasde plástico Real Time de 384 pocillos | Dako, Dinamarca |

| | |
|---|---------------------------------------|
| Portaobjetos <i>Microscope KP slides</i> | Labbox Labware S.L, Barcelona, España |
| Portaobjetos s <i>FLEX IHC Microscope Slides</i> | Klinipath, Bélgica |
| Primo® <i>multiwell plate 12 wells</i> | Simport scientific, Canada |
| Primo® <i>multiwell plate 24 wells</i> | Deltalab, Barcelona, España |
| Primo® <i>multiwell plate 6 wells</i> | Deltalab, Barcelona, España |
| Primo® <i>multiwell plate 96 wells</i> | Becton Dickinson S.A, Huesca, España |
| Puntas de 10 µl (<i>Biosphere filter tips</i>) | EuroClone, Pero, Italia |
| Puntas de 100 µl (<i>Biosphere filter tips</i>) | EuroClone, Pero, Italia |
| Puntas de 1000 µl (<i>Biosphere filter tips</i>) | EuroClone, Pero, Italia |
| Puntas de 200 µl (<i>Biosphere filter tips</i>) | EuroClone, Pero ,Italia |
| Tiras de tubos para PCR 0,2 ml | Cmb Boline Cultek S.L, Madrid, España |
| Tubos Falcon 15 ml | Merck KGaA, Alemania |
| Tubos Falcon 50 ml | Merck Millipore, Irlanda |

3.1.4. Equipos y programas

Todos los equipos y programas informáticos empleados a lo largo de esta tesis se recogen en las tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16. Equipos con su respectiva casa comercial empleados en los diferentes ensayos experimentales.

| EQUIPO | CASA COMERCIAL |
|---|--|
| Agitador magnético RH basic | IKA®-Labortechnik, Deutschland, Alemania |
| Báscula analítica HR-250AZ | AND, A&D Company, limited, Tokio, Japón |
| Cámara Leica DFC 320 | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Cámara Leica DFC 340 FX | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Cámara Leica ICC50W | Leica, Wetzlar, Alemania |
| CellCulture CO2 Incubator | ESCO, Singapur |
| Centrifuga refrigerada Microfuge®22R <i>Centrifuge</i> | Beckman Coulter™, California, EE.UU. |
| Centrifuga 5810R | Eppendorf, Hamburgo, Alemania |
| Centrifuga Legend Micro 17R SORVALL | Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU |
| Citómetro de flujo Gallios | Beckman Coulter™, California, EE.UU. |
| Espectrofotómetro NanoDrop™ One/OneC | Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU |
| Estufa de calor seco | Tarma S.A, Madrid, España |
| EVE TM <i>Automatic cell counter</i> | NanoEnTek, Waltham, USA |
| Baño de agua GEMMY YCW-03S | GEMMY INDUSTRIAL CORPORATION, Taipei, Taiwan |
| Inclusionadora, Leica EG 1150H | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Lector de placas Victor X3 2.030 Multilabel Reader | PerkinElmer, Waltham, EE.UU |
| Lupa SZM-T | OPTIKA Microscopes, Italia |

| | |
|---|--|
| Microondas | Taurus, Cataluña, España |
| Microscopio confocal Olympus FV1000 | Olympus, Tokio, Japón |
| Microscopio de fluorescencia Leica DM 4000B/Leica DM2500 | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Microscopio Leica DMD108 | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Microscopio óptico invertido Leica DM IL LED | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Microscopio óptico Leica DMLB | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Microtomo Leica RM2245 | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Minicentrífuga Mini spin plus | Eppendorf, Hamburgo, Alemania |
| pHmetre MP220 | Mettler Toledo, Ohio, EE.UU. |
| Placa fría, Leica EG 1150C | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Procesadora de muestras histológicas Leica TP1020 | Leica, Wetzlar, Alemania |
| QuantStudioTM 5 Real-Time PCR Systems | Thermo Fisher Scientific Carlsband, EE.UU. |
| Reómetro Discovery Hybrid Rheometer DHR | TA Instruments, New Castle, EE. UU. |
| Termociclador ProFlex PCR System | Thermo Fisher Scientific, Vilna, Lituania |
| Agitador Thermomixer C | Eppendorf, Hamburgo, Alemania |
| Vitrina móvil de filtración vertical IDL - AIR – GN | LABOLAN, S.L., Navarra, España |
| Agitador Vortex | Fisherbrand, Italia |

Tabla 17. Programas informáticos con su respectiva casa comercial empleados en esta tesis

| PROGRAMA | CASA COMERCIAL |
|---|---|
| ACDSee 7.0 | ACD Systems, EE.UU |
| Expression Suite v 1.1 | Thermo Fisher Scientific Carlsband, EE.UU. |
| GraphPad Prism 5.0 | GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU. |
| ImageJ/FIJI | NnD, de Yuxiong Mao |
| Leica Application Suite (LAS AF) | Leica, Wetzlar, Alemania |
| Leica Application Suite Advance Fluorescence | Leica, Wetzlar, Alemania |
| FV10-ASW 3.1 Viewer | Olympus, Tokyo, Japon |
| Adobe Photosop CS5 | Adobe Systems Incorporated, EE.UU. |
| Perkin Elmer 2030 Workstation | PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finlandia. |
| Kaluza v2.1 | Beckman CoulterTM, California, EE.UU. |

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño experimental

El objetivo principal de esta tesis era el diseño de un constructo de base hidrogel capaz de promover la regeneración del cartílago articular. Nuestra primera aproximación a dicho constructo consistió en la fabricación de un hidrogel de alginato en combinación con condrocitos primarios o hDPSCs. Ensayamos diferentes métodos de fabricación del hidrogel, desde esferas de diferentes tamaños, hasta cilindros macizos. Aislamos y cultivamos condrocitos primarios obtenidos a partir de cartílago articular, con el protocolo aprobado por el comité ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia, y hDPSCs de terceros molares de donantes humanos, con el protocolo aprobado por el comité ético de la Universidad de Valencia (número de referencia: H1548322921081). Dichas células fueron caracterizadas mediante técnicas microscópicas y citometría de flujo (CD105, CD29, CD146, CD44, CD45, CD31, STRO-1). Testamos la capacidad de diferenciación condrogénica tanto por parte de los condrocitos primarios como de las hDPSCs mediante expresión de marcadores condrogénicos por inmunofluorescencia (colágeno tipo I, tipo II, agregano y organización del citoesqueleto) y por biología

molecular mediante *real time* RT-PCR (genes ACAN, B-ACT, COL10A1, COL1A1, COL2A1, RUNX1, SOX9 y VEGFA) utilizando medios de cultivo de inducción específicos. Ensayamos el potencial regenerativo del constructo generado en un modelo de experimentación animal desarrollado en rodilla de conejo (anexo: 8.3. Comité ética). Aunque obtuvimos resultados positivos con este constructo, detectamos importantes deficiencias en lo que a consistencia y mantenimiento de la integridad del mismo se refiere. Por ese motivo diseñamos un segundo constructo consistente en un hidrogel combinado de alginato/agarosa con la idea de aumentar su consistencia. Evaluamos las características biomecánicas del hidrogel mediante medidas reológicas. Analizamos su citotoxicidad siguiendo los criterios especificados en la norma UNE-EN ISO 10993-5. Cultivamos condrocitos y hDPSCs en dicho constructo y evaluamos *in vitro* su potencial condrogénico. Para ello medimos la expresión de marcadores condrogénicos mediante inmunofluorescencia (colágeno tipo I, tipo II y ACAN) y *real time* RT-PCR (genes ACAN, ACTB, B-ACT, COL10A1, COL1A1, COL2A1, HIF1A, MMP1, MMP13, MMP2, PPARGC1, RUNX1, SOX5, SOX6, SOX9, SPARC, TIMP1 y VEGFA) cultivando las células en medio de diferenciación condral. Estudiamos los cambios morfológicos de las células cultivadas mediante la detección fluorescente de actina utilizando

faloidina conjugada con rodamina. Así mismo estudiamos la agregación celular y la formación de organoides mediante microscopía confocal.

3.2.2. Construcción de esferas de alginato

Para realizar las esferas de alginato primero se prepararon las soluciones de alginato y las diferentes concentraciones de cloruro cálcico (CaCl_2) a 102 mM, 150 mM y 200 mM, tal como se indica en el apartado 3.1.2 de esta tesis. Se fabricaron esferas de alginato al 3% con distintos instrumentos, como una pipeta Pasteur de cristal, una pipeta Pasteur de plástico, una jeringuilla de 10 ml, una jeringuilla de 10 ml con una aguja de 21 Gauge y una pipeta de 200 μl , lo que permitió obtener esferas de distintos tamaños y consistencias en función de la concentración de CaCl_2 utilizado.

Para fabricar las esferas de alginato, el CaCl_2 tenía que estar en constante pero leve agitación mediante una barra magnética, sobre una placa de agitación magnética calefactora y a una temperatura de 37 °C. Las gotas de la solución de alginato (previamente calentada a 37 °C) se dejaron caer en la disolución de CaCl_2 desde una distancia de 1 cm, aproximadamente.

3.2.3. Construcción de cilindros de alginato

Para la fabricación de los cilindros de alginato utilizamos placas de cultivo celular de 24 pocillos, en cuyo fondo depositamos el CaCl_2 (200-500 mM) en un volumen igual al 10% del volumen final del constructo, sobre el cual añadimos la solución de alginato 3%, dejando la placa media hora a temperatura ambiente para que se produjera la polimerización.

3.2.4. Construcción de constructos de alginato-agarosa

Se ensayaron diferentes combinaciones de alginato-agarosa a fin de optimizar dichos constructos. Se prepararon todas las soluciones necesarias para construir los constructos al doble de concentración, para posteriormente generar mezclas equivolúmetricas de ambos monómeros, que posteriormente se polimerizaron mediante la adición de CaCl_2 y tratamiento a baja temperatura, a fin de inducir la polimerización del alginato y de la agarosa, respectivamente.

Dado que la agarosa utilizada fue de bajo punto de fusión, la mezcla de las soluciones se realizó a 37 °C, a fin de evitar la polimerización precoz de la misma. Tras la adición del CaCl_2 se incubó dicha mezcla primero 30 minutos a temperatura ambiente, a fin de inducir la polimerización del alginato, y 30

minutos a 4 °C, para inducir la polimerización de la agarosa, obteniendo un hidrogel homogéneo y consistente.

3.2.5. Caracterización biomecánica de los hidrogel fabricados

El reómetro es el instrumento que mejor permite la caracterización mecánica de hidrogel en estado hidratado. Se empleó el reómetro *Discovery Hybrid Rheometer* DHR, de *TA Instruments* (figura 8).

En el ensayo, el disco superior del equipo rota sobre su eje longitudinal y ejerce sobre el material una fuerza de cizalladura. El objetivo fue obtener las características del material al someterle a un esfuerzo de cizalladura, obteniendo el módulo de cizalladura (G) del material.



Figura 8. Reómetro utilizado para realizar el estudio reológico.

El equipo es capaz de calcular G a través del esfuerzo de cizalladura (τ) aplicado por la rotación del disco superior y de la deformación de cizalladura (γ), mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{\tau}{\gamma}$$

Más concretamente, el equipo calculó la parte real del módulo de cizalladura (G'), la cual se denomina módulo de almacenamiento, y hace referencia a la componente elástica del material, y la parte imaginaria del módulo de cizalladura (G''), la cual se denomina módulo de pérdidas, y hace referencia a la componente viscosa del material.

Un aspecto interesante es que, conociendo el módulo de cizalladura (G) y el coeficiente de Poisson (ν), es posible calcular el módulo de tracción (E) mediante la siguiente ecuación (164):

$$E = G \cdot 2 \cdot (1 + \nu)$$

Además, en el caso de elastómeros como los hidrogeles que sean homogéneos e isótropos a nivel macroscópico, puede asumirse que $\nu \approx 0,5$, por lo que E puede calcularse mediante la relación directa aproximada (165):

$$E \cong 3 G$$

Se obtuvo el valor de la parte real del módulo de cizalladura (módulo de almacenamiento, G') y de la parte imaginaria del módulo de cizalladura (módulo de pérdidas, G'').

- El módulo de almacenamiento, G' , cuantifica la capacidad de un material de almacenar energía cuando se le aplica una fuerza de cizalladura, haciendo referencia a la componente elástica del material. Así pues, para fuerzas menores que las fuerzas moleculares, el material es capaz de volver a su configuración inicial previa a la aplicación de la fuerza.
- El módulo de pérdidas, G'' , indica la capacidad de un material de disipar (perder) energía en forma de calor cuando se le aplica una fuerza de cizalladura, haciendo referencia a la componente viscosa del material. Es una medida de la energía no recuperable

debida a diferentes procesos disipativos. G'' es importante cuando la fuerza aplicada sobre la muestra es mayor que las fuerzas moleculares, de forma que se produce un colapso de la microestructura y el material comienza a fluir.

Tabla 18. Concentraciones de los biomateriales estudiados en el ensayo reológico.

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| AGAROSA | 0,5% Agarosa |
| | 1% Agarosa |
| ALGINATO – AGAROSA | 1,5% Alginato - 1% Agarosa |
| | 3% Alginato - 1% Agarosa |

Los bloques de agarosa y alginato-agarosa de diferentes concentraciones (tabla 18) se realizaron entre dos cristales, para que la superficie de todo el hidrogel fuera homogénea. Para poder medir los parámetros (tabla 19), realizamos con un troquel de 2,5 cm de diámetro círculos en el hidrogel y se pusieron lijas de 60 (tamaño del grano), tanto encima como debajo del hidrogel, para que este no resbalara al hacer las medidas. Se realizó la medida de los módulos 10 veces en cada hidrogel.

Tabla 19. Parámetros utilizados en el estudio reológico.

| Parámetros de la reometría rotacional | |
|--|--------------------------|
| Ensayo | Amplitud de oscilación |
| Temperatura | 25 °C |
| Frecuencia de oscilación | 1 Hz |
| Par de oscilación | 10 – 100 $\mu N \cdot m$ |
| Puntos por década | 10 |

3.2.6. Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se hicieron de acuerdo con la **Norma UNE-EN ISO 10993-5** y para ello se prepararon los constructos y, para generar los medios condicionados, se incubaron con medios de cultivo tanto de condrocitos como de células madre de pulpa dental (DMEM basal sin rojo fenol, a pH 7,4 y alfaMEM sin rojo fenol, a pH 7,4), durante 1, 3 y 7 días a 37 °C en un agitador oscilante a 60 rpm. Se utilizó extracto de látex (0,05 g/ml) como control positivo de citotoxicidad (CP), ya que el látex no permite el crecimiento celular por su elevada toxicidad. Como controles negativos (CN) se utilizaron medios de cultivo sin rojo fenol. Además, se utilizaron como blanco los medios condicionados con 3% alginato, 1% agarosa con $CaCl_2$, 3% alginato con 1% agarosa y por último 1% agarosa sin $CaCl_2$.

Las células utilizadas para el ensayo fueron condrocitos primarios y hDPSCs, cultivadas en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo para las hDPSCs y 15.000 células/pocillo para los condrocitos. A las 24 horas se sustituyó el medio por 100 µl/pocillo de los medios condicionados a valorar y 24 horas más tarde se añadieron 20 µl (relación 5:1) del reactivo de color amarillo conocido como MTS o 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazolio, diluido en una solución de un reactivo de acople de electrones que confiere estabilidad al producto. Se realizaron medidas de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Victor³ de PerkinElmer tras 1h, 2h y 3h en incubación a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂, en oscuridad. Este ensayo fue también utilizado para medir la citotoxicidad de diferentes concentraciones de cloruro cálcico (CaCl₂) [0,625%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10%] sobre los dos tipos celulares para seleccionar la concentración empleada en la fabricación de los constructos.

3.2.7. Aislamiento, cultivo y caracterización de hDPSCs

Para la obtención de hDPSCs se utilizaron terceros molares de los que, tras seccionarlos transversalmente a nivel de la corona, se extrajo la pulpa dental en condiciones de asepsia. Dicho tejido

se incubó con colagenasa tipo IV (6 mg/ml) y dispasa (8 mg/ml) (166) durante 60-90 minutos en un incubador a 37 °C, agitándose la suspensión cada 15 minutos. Después se pasó por un filtro celular de 70 µm de tamaño de poro (Corning *cell-strainer*) recogiendo el filtrado en un tubo Falcon de 50 ml, lavando posteriormente el material depositado sobre el filtro con 3 ml de medio de cultivo. El volumen final que se obtuvo se centrifugó a 100 *g*, durante 10 minutos a 20 °C, obteniéndose un sedimento de las células. Después se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de medio de cultivo de hDPSCs, se resuspendió el sedimento celular y se sembraron 100 µl en pocillos de una placa de 6 pocillos, añadiendo 2 ml de medio por pocillo. También se hicieron diluciones 1:10 y 1:100 siguiendo el mismo protocolo, manteniendo todas las placas en incubador a 37 °C.

Las células obtenidas se subcultivaron en medio de mantenimiento (su composición se detalla en el apartado 3.1.1.1 Medios). Se cambió el medio cada dos días y se subcultivaron cuando el cultivo alcanzó el 80% del estado de confluencia. Para ello se realizó un tratamiento con Tripsina-EDTA: tras eliminar el medio, se lavó la superficie celular con PBS y después se añadió Tripsina-EDTA (con un volumen que varía en función del recipiente de siembra). Se incubó a 37 °C durante 3 minutos y se inactivó con 4 veces más de medio suplementado con 10% FBS que el volumen de tripsina utilizado. Con un contador celular

(EVEcounter) se midió la cantidad de células vivas que había por mililitro en la suspensión celular, mezclando la suspensión celular con azul tripán utilizando una relación 1:1 volumen:volumen. A partir de este dato se calculó el volumen que se debería emplear para obtener las células necesarias en los diversos experimentos. En el caso en que las células se fuesen a criopreservar, se resuspendieron en suero fetal bovino conteniendo un 10% de DMSO, se alicuotaron en criotubos, se congelaron gradualmente en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando un contenedor *Mr Freezer* y, tras al menos 24 h, se mantuvieron almacenadas en la fase vapor de un tanque de nitrógeno líquido.

La caracterización de las células obtenidas se realizó mediante citometría de flujo, detectando los marcadores CD105, CD146, CD29, CD31, CD44, CD45 y STRO-1 (tabla 20). Para ello, se levantaron las células con Acutasa, incubando las células a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 minutos, para no dañar, o hacerlo mínimamente, las proteínas expuestas en la superficie celular. Se estimó la concentración celular mediante conteo con un hemocitómetro (EVEcounter), se añadió PBS a la suspensión celular y se centrifugó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 150 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió PBS conteniendo albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA), 20 mg/ml , esterilizado por filtración (filtro de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro), de forma que

en la suspensión final hubo 1 millón de células por mililitro. Para realizar las medidas previstas en el citómetro se necesitaron 250.000 células. Las muestras fueron analizadas por el servicio de citometría de la UCIM, utilizando uno de sus citómetros de flujo (citómetro de flujo Gallios) y los anticuerpos, positivos o negativos, de los marcadores seleccionados, así como los controles isotípicos de cada uno de ellos. Además, se realizó un estudio de viabilidad celular y apoptosis empleando anexina V y yoduro de propidio.

Las células obtenidas y caracterizadas se cultivaron en medio de proliferación para su expansión. Además, en algunos experimentos se cultivaron en presencia de medio de diferenciación con la finalidad de inducir el fenotipo condral.

Tabla 20. Marcadores de superficie utilizados en la tesis (167,168).

| Marcadores de superficie | Definición |
|---------------------------------|--|
| CD105 | Conocida como endoglina, es una glucoproteína de membrana homodimérica, asociada principalmente con el endotelio vascular humano. La endoglina es un componente del complejo receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) y se une al TGFβ-1 |
| CD146 | Proteína de adhesión celular, clave en la actividad de las células endoteliales vasculares y la angiogénesis. Marcador de células madre mesenquimales |
| CD29 | Integrina beta-1 o subunidad beta del receptor de fibronectina. Es un miembro de la familia de las integrinas, proteínas heterodiméricas compuestas por subunidades alfa y beta |
| CD31 | Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1), está implicada en una gran parte de las uniones intercelulares de las células endoteliales |
| CD44 | Glucoproteína integral de la membrana celular, con un papel en la activación de los linfocitos mediante adhesión de la matriz y localización en los ganglios linfáticos |
| CD45 | Glucoproteína de superficie de la membrana que se expresa en todas las células hematopoyéticas normales, exceptuando los eritrocitos maduros |
| STRO-1 | Proteína marcadora de MSCs |

3.2.8. Aislamiento y cultivo de condrocitos primarios

Los condrocitos utilizados en esta tesis se obtuvieron a partir de fragmentos de cartílago articular rotuliano de donantes previo consentimiento informado. Las muestras de cartílago se disgregaron en fragmentos de 1-2 mm³ utilizando instrumental quirúrgico y se lavaron con DMEM estéril. Se digirieron inicialmente con una solución de hialuronidasa 0,5 mg/ml, 30 min en un baño con agitación a 37 °C. Posteriormente se eliminó la solución de hialuronidasa, continuando la digestión con una solución de 1 mg/ml de pronasa. Tras 60 min, se lavaron las piezas de cartílago para finalizar la digestión con 0,5 mg/ml de colagenasa-IA durante 12-18 h. Transcurrido este tiempo, se filtró la suspensión a través de un filtro celular de 70 µm de tamaño de poro (*cell-strainer*) y, tras centrifugar, se lavó el sedimento con DMEM suplementado con un 10% de SFB, depositándose posteriormente en frascos de cultivo conteniendo medio de proliferación para condrocitos (composición en apartado 3.1.1.1 Medios); el medio se cambió cada dos días.

Los condrocitos así obtenidos se expandieron en medio de proliferación y se subcultivaron utilizando el mismo protocolo que en el caso de las hDPSCs. Las células así expandidas se criopreservaron en nitrógeno líquido o se utilizaron en los

experimentos cultivadas con medio de proliferación o de diferenciación. Todos los experimentos de la tesis se realizaron entre los pases 2-6 de siembra de las células.

3.2.9. Encapsulación de células en esferas de alginato

Se levantaron las células que se deseaba encapsular con tripsina-EDTA (ya sea condrocitos o hDPSCs) y se contaron las células con un hemocitómetro. Se centrifugó a 1.500 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento de forma homogénea, añadiendo el volumen de la solución de alginato 3% necesario para que hubiera 2 millones de células por ml de alginato. Se aspiró la suspensión celular en alginato en una jeringuilla de 10 ml con una aguja de 21-23 Gauge.

Trabajando en condiciones de asepsia, un frasco de precipitados que contenía la disolución de polimerización (102 mM CaCl_2) se mantuvo sobre un agitador magnético a ~37 VC, manteniendo una agitación constante. Presionando levemente el émbolo de la jeringa, situada a corta distancia de la superficie del líquido, se expulsaron gotas que cayeron sobre la disolución de CaCl_2 y polimerizaron formando microsferas (162). Para que las esferas

polimerizaran completamente se dejaron en agitación en la solución de polimerización durante 10 minutos más.

La disolución de polimerización se filtró a través de un *cell-strainer* de 70 μm situado sobre un tubo Falcon de 50 ml para recoger las esferas. Empleando una espátula se depositaron varias de las esferas obtenidas en diferentes pocillos de una placa de cultivo celular de 12 pocillos. Se realizó un lavado con NaCl 0,9% para eliminar los restos de cloruro cálcico y finalmente se añadió en cada pocillo 1,5 ml de los medios correspondientes a cada experimento. Las células encapsuladas se cultivaron en medio de proliferación o diferenciación a 37 °C.

3.2.10. Encapsulación de células en cilindros de alginato

En el caso de los cilindros de alginato se utilizaron placas de 24 pocillos o cámaras Millicel de 4 pocillos, según las necesidades del experimento. Se levantaron las células (ya sea condrocitos o hDPSCs) con el tratamiento de tripsina-EDTA tal y como se explicó en los apartados 3.2.7 y 3.2.8. Tras calcular con el hemocitómetro la densidad celular, se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó el medio sobrenadante.

El sedimento celular se resuspendió en la solución de alginato 3% precalentada a 37 °C, a una densidad de 2 millones de células por mililitro. Finalmente, sobre el soporte seleccionado y siempre en condiciones de asepsia, se añadió un 10% de CaCl₂ del volumen final a cada pocillo, y sobre este se depositó lentamente el alginato 3% con las células embebidas utilizando pipeta de 1000 µl.

Para una correcta polimerización se dejó enfriar los constructos a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron a cada pocillo 750 µl del medio correspondiente, incubando las placas durante los tiempos establecidos a 37 °C y en una atmósfera de 5% CO₂, renovando el medio cada 2-3 días

3.2.11. Encapsulación de células en constructos de alginato/agarosa

En el caso del constructo que combina ambos biomateriales el proceso tiene ligeras variaciones. De inicio se levantaron las células con el tratamiento de tripsina-EDTA tal como se explicó en el apartado 3.2.7 y 3.2.8. Tras contar el número de células que se tenía en suspensión, se realizaron los cálculos del volumen que se utilizó para construir constructos con alginato al 3 % y agarosa al 1%, preparados, tal como se especificó en el

apartado de medios y reactivos. En este cálculo se tuvo en cuenta que el volumen final del constructo debía tener una concentración de 2 millones de células por mililitro de constructo, y que la proporción en la que se mezclaron los biomateriales era 1:1. Por este motivo las dos soluciones se prepararon al doble de concentración, para que, al mezclarse a partes iguales, se obtuviera la concentración deseada para cada polímero.

Después de realizar los cálculos, se centrifugó a 1500 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó el medio sobrenadante. La suspensión celular se resuspendió de forma homogénea en el alginato al 6%, previamente precalentado a 37 °C. Se añadió un 10% de CaCl_2 del volumen final a cada pocillo.

Para poder utilizar la agarosa al 2% se necesitó calentar en un microondas y posteriormente se dejó en un baño de agua a 37 °C para que las células no se dañaran al fabricar el constructo. La agarosa al 2%, líquida y atemperada a 37 °C, se mezcló con el mismo volumen de alginato 6% con células, se homogenizó y se depositó sobre el CaCl_2 añadido en cada pocillo.

Para conseguir una buena polimerización de los dos biomateriales, primero se dejó los constructos 30 minutos a temperatura ambiente, facilitando que el CaCl_2 actuase sobre el alginato, y después se bajó la temperatura de la agarosa, para

que solidificara a 4 °C, introduciendo los constructos 30 minutos en una nevera. En función del soporte utilizado para la fabricación de los constructos (Millicell de 4 u 8 pocillos y placas de 24 pocillos) varió tanto el volumen del constructo como el volumen de medio de cultivo.

3.2.12. Modelo de experimentación animal en lagomorfo

Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal de la Universitat de València (número de referencia: 2019/VSC/PEA/0147). Los animales se anestesiaron con 15 mg/kg ketamina y una inyección intramuscular de 0,1 mg/kg medetomidina. Se prepararon los conejos lavando la zona de la intervención, afeitándola y desinfectándola. Después se realizó una anestesia general utilizando 4% de isoflurano mediante máscara y se mantuvo la administración de 1,5% isoflurano con O₂ (2 l/min). Antes de empezar la intervención y una vez ya estaban los conejos en el quirófano, se esterilizó con solución de yodo la zona de la operación y las partes no estériles se cubrieron con una cobertura estéril. Se operó en todo momento en condiciones de asepsia.

La intervención quirúrgica fue una artrotomía en las rodillas de los conejos mediante una incisión parapatelar longitudinal. Se realizó una incisión en la capsula medial y la patela se dislocó lateralmente. Con un escalpelo de metal se hizo una incisión de 3 mm de diámetro y 1 mm de profundidad en la cara central articular de la ranura troclear femoral para poder extraer el cartílago articular a través de esta. La incisión se limpió y enjuagó con solución salina estéril y se introdujo el constructo en el defecto, alineándolo con la superficie articular. Se dejó fluir la sangre dentro de los andamios, que se mantuvieron en su sitio mediante el reposicionamiento de la rótula en el surco troclear del fémur. El procedimiento fue el mismo para los tres grupos experimentales, constructo de alginato al 3% con condrocitos, con hDPSCs o solamente constructo. La artrotomía y la piel se suturaron con puntos de sutura continuos con cubiertas de vicryl 4/0. Tras retirar la anestesia los animales regresaron a sus jaulas. El postoperatorio fue, al finalizar la cirugía, una inyección de gentamicina a 3 mg/kg, y una inyección intramuscular de 3 mg/kg Dexketoprofeno una vez al día durante 3 días. Los conejos se sacrificaron a los 3 meses de la intervención.

3.2.13. Técnicas histoquímicas realizadas en constructos de alginato/agarosa

Los constructos con células cultivadas (figura 9) se fijaron durante 4 horas en la solución fijadora descrita en el apartado 3.1.1.2 de material y métodos. Las muestras se lavaron durante una noche en una disolución de cacodilato sódico 100 mM y BaCl_2 50 mM a pH 7,4. Al día siguiente, para la deshidratación de los constructos se utilizaron una serie de disoluciones de concentración creciente de etanol, 70%, 90%, 90%, 90%, 100%, 100%, 100% (15 minutos en cada una), tras lo cual se procedió a la inclusión de las muestras en una mezcla del 50% de la parafina *wax* con etanol puro durante toda la noche en estufa a 37 °C. Al día siguiente se sumergieron las muestras durante 1 hora en parafina *wax* pura a 37 °C, paso que se repitió para eliminar los restos de alcohol. Finalmente se realizaron los bloques con la parafina *wax* (figura 9), que se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante un día en presencia de silicagel, para desecar los bloques.

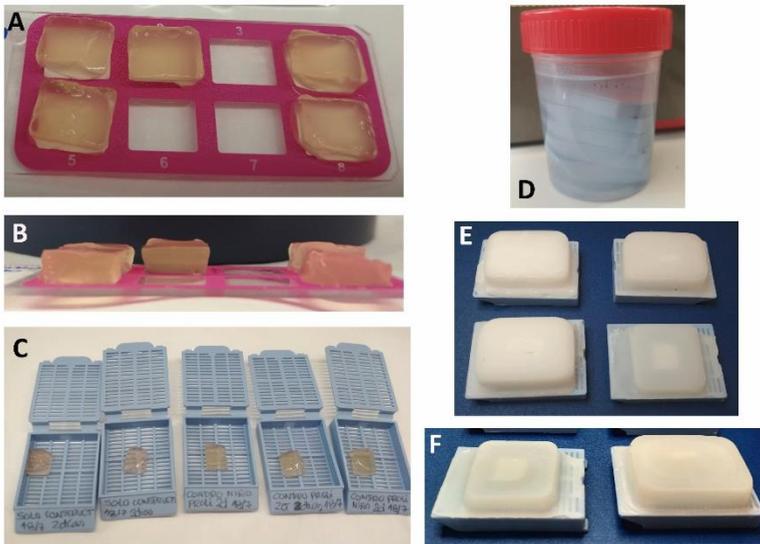


Figura 9. Técnica histológica manual. En el caso de los constructos se realizó un procesamiento manual, eliminando el medio de cultivo de los constructos, desmontando las cámaras Millicel (paneles A y B), separando las muestras en sus casetes y rotulándolos (panel C), pasando por todos los pasos de fijación e inclusión manual (panel D) hasta llegar al montaje de los bloques con la parafina *wax* (paneles E y F).

Para el análisis histológico de los constructos se congelaron los bloques y se realizaron secciones de 5 μm con un microtomo Leica RM2245. Se debió tener especial cuidado al poner los cortes en agua, ya que la parafina utilizada es de bajo punto de fusión (37 °C), lo que dificulta la manipulación de las muestras.

Previamente a las tinciones se desparafinó las muestras con 3 pases sucesivos por con xilol (durante 3 minutos cada uno) y se

hidrataron los cortes utilizando alcoholes de concentración decreciente: 3 pases por etanol 100%, etanol 70%, etanol 50% y agua, manteniendo las muestras 3 minutos en cada cubeta. Se realizaron las siguientes tinciones:

- Tinción Hematoxilina-Eosina

Tras la desparafinación e hidratación se sumergió en Hematoxilina durante 50 segundos y se aclaró con agua corriente 3 minutos. Después, se tiñeron las muestras con Eosina 3 minutos, tras lo cual se procedió a la deshidratación de las mismas con alcoholes de concentración creciente y, tras el paso por el xilol, se procedió al montaje de las muestras.

- Tinción rojo sirio

En esta tinción se realizaron los mismos pasos de desparafinación e hidratación, pero tras los 3 minutos en agua se tiñeron los cortes con rojo sirio durante 45 minutos, tras lo cual se pasó directamente al etanol 100% durante 5 minutos, para acabar en xilol y poder montar los cubreobjetos.

Todas las tinciones se analizaron con un microscopio óptico (DM 4000B; Leica) y se realizaron fotografías utilizando la cámara Leica DFC 420, a 4×, 10×, 20×, 40× y 63× aumentos.

3.2.14. Técnicas histoquímicas realizadas en el modelo de experimentación animal desarrollado en rodilla de conejo

Una vez se sacrificaron los conejos, las rodillas fueron lavadas con PBS y fijadas 5 días en 4% formaldehído a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, y tras lavarlas con PBS, se descalcificaron en OSTEOSOFT durante 5 semanas a temperatura ambiente. Tras este tiempo se cortaron las rodillas por el centro de la lesión, cuyo diámetro medía aproximadamente 3 mm, y cada mitad se pasó por separado por la procesadora Leica TP1020 e inmediatamente después se montaron los bloques con parafina. Los bloques se congelaron a -20 °C y se realizaron secciones de 5 μm con el microtomo Leica RM2245, conservándose posteriormente a 37 °C.

Antes de teñir los cortes, se incubaron durante una hora a 60 °C para posteriormente desparafinarlos e hidratarlos según hemos descrito anteriormente y teñirlos con hematoxilina eosina.

3.2.15. Determinación inmunohistoquímica de colágeno tipo II en modelo experimental de conejo

La inmunohistoquímica se realizó sobre las muestras de rodilla de conejo fijadas y preparadas tal y como se describe en el apartado 3.2.14 utilizando portaobjetos específicos para inmunohistoquímica, que se caracterizan por permitir una mejor adhesión del tejido al cristal. Una vez desparafinadas e hidratadas las muestras se procedió al desenmascaramiento antigénico, que se llevó a cabo enzimáticamente, mediante incubación con proteinasa K durante 10 minutos.

Se trataron los cortes con 0,3% H₂O₂ y 10% de suero de caballo para bloquear la peroxidasa endógena y las uniones inespecíficas, respectivamente. Se utilizaron anticuerpos específicos de ratón para el colágeno tipo II humano, con una incubación en cámara húmeda durante 16 horas. Tras tres lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizó la incubación durante 2 horas con el anticuerpo secundario (*goat anti-mouse IgG-HRP*) a una dilución 1:250, tras lo cual se eliminó el exceso de reactivo mediante lavados con PBS. Posteriormente, se utilizó el sustrato 3,3'-diaminobenzidina como cromógeno de acuerdo con las instrucciones del fabricante, marcando con una tinción marrón los lugares donde

se había producido las uniones de los anticuerpos. Finalmente se contrastó con hematoxilina de Mayer y se deshidrató con alcoholes de graduaciones crecientes, para finalmente pasar por xilol y montar los portaobjetos con el cubreobjetos y el medio de montaje.

3.2.16. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y agregano mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 2D

Se utilizaron cultivos en monocapa tanto de hDPSCs como de condrocitos humanos, cultivados en cámaras de cultivo de cuatro pocillos Milicell. Tras el tiempo establecido de cultivo se realizaron tres lavados de las células con PBS y se fijaron con formol 4% durante 10 minutos. Tras la fijación se lavaron repetidas veces con PBS y se incubaron con Triton 100X al 0,1% durante 5 minutos. Tras lavar de nuevo con PBS, se procedió a la incubación durante 25 min con una solución de BSA 1% en PBS para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Las diluciones de los anticuerpos primarios se realizaron en diluyente Envision. Para colágeno tipo I y agregano, la dilución óptima fue de 1:100, mientras que para colágeno tipo II fue de 1:500. Respecto al diseño experimental de los cuatro pocillos de

cada placa, el primero se utilizó como control de anticuerpo y de morfología. El segundo pocillo se utilizó para determinar la expresión de colágeno tipo I, el tercero para colágeno tipo II y el cuarto para agregano. Además se utilizó en cada uno de los pocillos faloidina conjugada con rodamina, a fin de estudiar la morfología celular. La metodología utilizada para esto último se detalla más adelante. Las muestras se incubaron toda la noche en oscuridad, a 4 °C (nevera) y en cámara húmeda para evitar que se desecaran las muestras.

Tras la incubación, se lavaron los pocillos con PBS tres veces y se prepararon los anticuerpos secundarios unidos al fluoróforo. Para colágeno tipo I y II se utilizó un anticuerpo secundario monoclonal anti-ratón unido a FITC. En el caso del agregano se utilizó un anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado con FITC. Ambos anticuerpos se utilizaron diluidos 1:200.

La tinción fluorescente del citoesqueleto se realizó como ya hemos comentado con faloidina conjugada con rodamina. Las muestras se incubaron durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con faloidina-rodamina diluida 1:40 en PBS.

Finalmente se lavaron con PBS los pocillos dos veces y se cubrieron los portaobjetos con medio de montaje, que contiene

DAPI para teñir los núcleos de las células, sellando los portas con laca de uñas.

Las imágenes de fluorescencia se captaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM2500.

3.2.17. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, II y agregano mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 3D

Para el ensayo en tres dimensiones se fabricaron constructos de alginato 3% / agarosa 1% cultivados con células en cámaras de 8 pocillos Millicel. Transcurrido el tiempo de cultivo establecido, se lavaron los constructos con PBS varias veces y se fijaron con formol 4% durante 20 minutos. Después de la fijación, se lavó dos veces con PBS y se incubó con Triton 100X al 0,1% durante 5 minutos y de nuevo se volvieron a realizar lavados con PBS.

El bloqueo de las uniones inespecíficas y la incubación con anticuerpos primarios y secundarios o con faloidina-rodamina se realizó igual que en el apartado anterior, con la diferencia de la tinción con DAPI, puesto que se necesitó incubar el DAPI junto con los anticuerpos secundarios durante las dos horas de incubación de los mismos. Concluido el protocolo experimental,

se realizaron dos lavados con PBS y se montaron los portaobjetos con un fragmento de constructo y medio de montaje. Se dejó caer el cubreobjetos sobre la muestra y se ejerció una leve presión para comprimir el constructo, empleándose también laca de uñas para sellar el conjunto.

Las imágenes de fluorescencia se captaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM2500 o con el microscopio confocal Olympus FV1000.

3.2.18. Extracción de RNA total de cultivos 2D

Las células se resuspendieron en 500 μ l de reactivo TriZol. Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se añadieron 100 μ l de cloroformo. Se agitaron las muestras enérgicamente y se dejaron reposar 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 12000 g a una temperatura de 4 °C, de forma que se separaron tres fases, la fase orgánica, la interfase y la fase acuosa, donde se encuentran los ácidos nucleicos (DNA y RNA). Se recogió la fase acuosa para continuar la extracción y la fase orgánica se almacenó a -80 °C para futuros posibles ensayos. Se añadió 1 μ g de glucógeno (10 μ g/ μ l) y 250 μ l de isopropanol, se homogenizó bien y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron 15 minutos en un congelador a -80 °C. El precipitado se recogió mediante centrifugación a

12000 g durante 10 minutos a 4 °C, eliminándose el sobrenadante. Se hicieron dos lavados con 500 µl de etanol al 75%, centrifugando 5 minutos a 7500 g y 4 °C. Tras los dos lavados y centrifugaciones se incubó en termobloque a 40 °C para evaporar el etanol durante 15 minutos. El RNA obtenido se resuspendió utilizando 30 µl de agua libre de RNAsas. Además, las muestras se incubaron 2-3 minutos a 65 °C con la finalidad de disolver completamente el RNA. La concentración de RNA obtenida se evaluó mediante espectrofotometría utilizando un microespectrofotómetro NanoDrop. La concentración del RNA se valoró mediante absorbancia a 260 nm y, como estimativo de la pureza de este, se utilizó la relación de la absorción a 260/280 nm. Únicamente se utilizaron aquellas muestras con un cociente de pureza mayor de 1,8.

3.2.19. Extracción de RNA total a partir de células encapsuladas en constructos de alginato/agarosa

Debido a la dificultad que suponía extraer los ácidos nucleicos del constructo, a causa de la presencia de agarosa, se tuvo que realizar una extracción basándonos en las conclusiones extraídas por Ogura et al. (169), que indican que la mejor técnica de extracción fue una combinación del protocolo de TRIzol junto con el RNeasy Plant Mini Kit de Qiagen.

Para la extracción del RNA de las células contenidas en los constructos de alginato-agarosa, las muestras se congelaron a -80 °C. Después se incubaron con 500 µl de TRIzol durante 5 minutos, tras lo cual se añadieron 250 µl de etanol absoluto, incubándose durante 5 minutos.

En este punto se empezó el protocolo del RNeasy Plant Mini Kit. Se transfirió el lisado a una columna QIAshredder y se centrifugó durante dos minutos a 12000 rpm. Mediante el empleo de esta columna se eliminó la parte gelatinosa del hidrogel. Se pasó el sobrenadante a otro microtubo, con cuidado de no levantar el sedimento. Se añadieron 500 µl de etanol absoluto y se transfirió la muestra a la segunda columna, RNeasy Mini spin, se centrifugó 15 segundos a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Tal y como indica el protocolo, se pasaron 500 µl del tampón RW1 por la columna y se centrifugó 15 segundos a 12000 rpm. De nuevo se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl del tampón RPE, para volver a centrifugar 15 segundos a 12000 rpm. Por último, se hizo un nuevo lavado con 500 µl de tampón RPE y se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm. Para eluir el RNA de la columna se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad tras añadir 30 µl de agua libre de RNAsas. La valoración de la concentración y pureza de las extracciones se realizó igual que en apartado anterior.

3.2.20. Síntesis de cDNA

Para sintetizar cDNA monocatenario a partir del RNA total extraído de nuestras muestras se utilizó el kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription with RNase Inhibitor de ThermoFisher Scientific a partir de 250 ng del RNA total; se preparó la master mix a una concentración 2× incluyendo el tampón, dNTPs, cebadores random, MultiScribe™ Reverse Transcriptase, inhibidor de RNasa y agua libre de RNasas. A la solución master mix 2× preparada se le añadió el RNA extraído para obtener una concentración 1× al mezclarlo. Después se introdujo en un termociclador (termociclador ProFlex PCR System, Thermo Fisher Scientific, Lituania) y la muestra se sometió a los tratamientos especificados en el programa de PCR que se muestra en la figura 10.

| | Step 1 | Step 2 | Step 3 | Step 4 |
|------------------|--------|---------|--------|--------|
| Temperature (°C) | 25 | 37 | 85 | 4 |
| Time | 10 min | 120 min | 5 min | ∞ |

Figura 10. Programa utilizado para la PCR.

3.2.21. Preamplificación del cDNA

En el caso de las extracciones de RNA a partir de células encapsuladas en constructos de alginato/agarosa, la concentración del mismo no era suficientemente alta como para realizar una real time RT-PCR convencional. Por ese motivo decidimos preamplificar el cDNA sintetizado a partir de dichas extracciones. Para ello preparamos una mezcla de los cebadores que queríamos analizar con posterioridad diluidos 1/20. Utilizamos la preamplification master mix de Invitrogen. La mezcla de reacción incluyó 1× de la master mix, 0,05× de cada uno de los oligonucleótidos incluidos en el análisis y 2,5 ng del cDNA, sintetizado tal y como se describe en el apartado anterior. Se realizó entonces la reacción de preamplificación consistente en un primer ciclo de 10 minutos a 95 °C, 10 ciclos consistentes en un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y un ciclo de anillamiento/extensión a 60 °C durante 4 minutos, y un último paso de inactivación enzimática a 99 °C durante 10 minutos. Las muestras así preamplificadas se diluyeron 1:5 veces en agua libre de RNasas para su análisis mediante real time PCR.

3.2.22. Real time qPCR

Una vez sintetizado el cDNA analizamos la expresión relativa de los genes a evaluar. Para ello realizamos una selección de aquellos genes más relevantes en el proceso de diferenciación condrogénica. Los detalles relativos a los mismos se recogen en la tabla 21. Para la real time PCR utilizamos TaqMan Gene Expression Assays y 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix, ambas de ThermoFisher Scientific. Se preparó sobre una placa de 384 pocillos (placa Multiply PCR certificate 40 µl, con faldón, 384R), que se selló con una lámina de sellado estándar de PCR y qPCR. Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un termociclador a tiempo real QuantStudio 5. Como estándar interno se utilizaron el gen GAPDH y el gen 18S ribosomal, y los cálculos de expresión relativa se realizaron utilizando el método semicomparativo $\Delta\Delta Ct$.

Tabla 21. Genes estudiados en los diferentes ensayos de biología molecular (170).

| Gen | Descripción | Función |
|--|--|---|
| <p>ACAN (Agrecano)</p> | <p>Miembro de la familia de proteoglicanos agrecano / versicano.</p> | <p>Es componente de MEC del cartílago, cuya función es resistir la compresión en el cartílago.</p> |
| <p>ACTB Y B-ACT (Actina Beta y Beta-Actina)</p> | <p>Codifica una de las seis proteínas de actina diferentes. Son proteínas altamente conservadas, y existe tanto en forma monomérica (G-actina) como polimérica (F-actina).</p> | <p>Involucradas en la movilidad celular, la estructura, la integridad y la señalización intercelular. Polimeriza para producir filamentos que forman redes en el citoplasma de las células.</p> |
| <p>COL10A1 (Cadena 1 alfa del colágeno de tipo X)</p> | <p>Codifica la cadena alfa del colágeno tipo X; es un homotrímero de cadena corta.</p> | <p>Es un producto de los condrocitos hipertróficos y se ha localizado en zonas de presunta mineralización de cartílago hialino.</p> |
| <p>COL1A1 (Cadena 1 alfa del colágeno de tipo I)</p> | <p>Codifica la cadena pro-alfa-1 del colágeno tipo I cuya triple hélice comprende dos cadenas alfa-1 y una cadena alfa-2.</p> | <p>Es un colágeno formador de fibrillas y se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos, siendo abundante, entre otros, en hueso, córnea, dermis y tendón.</p> |
| <p>COL2A1 (Cadena 1 alfa del colágeno de tipo II)</p> | <p>Codifica la cadena alfa-1 del colágeno tipo II, un colágeno fibrilar que se encuentra en el cartílago y en el humor vítreo del ojo.</p> | <p>Es específico de los tejidos cartilagosos y resulta esencial para el desarrollo embrionario normal del esqueleto, para su crecimiento y para la capacidad del cartílago para resistir las fuerzas compresivas.</p> |

| | | |
|---|---|---|
| <p>HIF1A (Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia)</p> | <p>Este gen codifica la subunidad alfa del factor 1 de transcripción inducible por hipoxia, que es un heterodímero compuesto por una subunidad alfa y una beta.</p> | <p>Funciona como un regulador transcripcional principal de la respuesta adaptativa a la hipoxia. En condiciones hipóxicas, activa la transcripción de más de 40 genes, cuyos productos proteicos aumentan el suministro de oxígeno o facilitan la adaptación metabólica a la hipoxia.</p> |
| <p>MMP1 (Metalopeptidasa 1 de la matriz)</p> | <p>Codifica un miembro de la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP).</p> | <p>Escinde los colágenos de los tipos I, II y III en un sitio en el dominio helicoidal. También escinde colágenos de los tipos VII y X. Participa en la descomposición de la MEC en los procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejidos, así como en procesos de enfermedades como la artritis y la metástasis.</p> |
| <p>MMP13 (Metalopeptidasa 13 de la matriz)</p> | <p>Este gen codifica un miembro de la familia las metaloproteinasas de matriz (MMP). Puede estar involucrado en el recambio del cartílago articular y en la fisiopatología del cartílago asociada con la osteoartritis.</p> | <p>Degradación de proteínas de MEC, como colágeno fibrilar, fibronectina, y agregano. Hidroliza colágenos helicoidales triples, como los colágenos tipo I, II y III, pero tiene la actividad más alta con el colágeno tipo II soluble. También puede degradar los colágenos tipo IV, tipo XIV y tipo X. Puede funcionar activando o degradando proteínas reguladoras como TGFβ1. Desempeña un papel en la cicatrización de heridas, la remodelación de tejidos, la degradación del cartílago, el desarrollo y mineralización ósea y la osificación.</p> |

| | | |
|---|---|---|
| <p>MMP2 (Metalopeptidasa 2 de la matriz)</p> | <p>Miembro de la familia de metaloproteinasa de matriz (MMP), son enzimas dependientes de zinc que dividen los componentes de la MEC y las moléculas involucradas en la transducción de señales. La proteína codificada es una gelatinasa A, colagenasa tipo IV, con tres repeticiones de fibronectina tipo II en su sitio catalítico, permitiendo la unión del colágeno tipo IV y V desnaturalizado y la elastina.</p> | <p>Metaloproteinasa ubicua que participa en diversas funciones, como la remodelación de la vasculatura, la angiogénesis, la reparación de tejidos, la invasión tumoral, la inflamación y la rotura de la placa aterosclerótica. Además de degradar las proteínas de la MEC, también puede actuar sobre varias proteínas que no son de matriz.</p> |
| <p>PPARGC1 (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha</i>)</p> | <p>Es un coactivador transcripcional que regula los genes involucrados en el metabolismo energético. Esta proteína interactúa con PPARGgamma, permitiendo su interacción con múltiples factores de transcripción. Proporciona un vínculo directo entre los estímulos fisiológicos externos y la regulación de la biogénesis mitocondrial.</p> | <p>Coactivador transcripcional para receptores de esteroides y receptores nucleares. También puede estar involucrada en el control de la presión arterial, la regulación de la homeostasis del colesterol celular y el desarrollo de la obesidad, la integración de los ritmos circadianos y el metabolismo energético.</p> |
| <p>RUNX1 (Factor de transcripción RUNX1)</p> | <p>Es un factor de transcripción heterodimérico que se une al elemento central de muchos potenciadores y promotores.</p> | <p>Esencial para el desarrollo de una hematopoyesis normal. Participa en el compromiso de linaje de precursores de células T inmaduras.</p> |
| <p>SOX5 (SRY-Box 5)</p> | <p>Codifica a un miembro de la familia SOX (caja de HMG relacionada con SRY) de factores de transcripción involucrados</p> | <p>Se une específicamente a la secuencia de DNA 5'-ACAAT-3'. Activa la transcripción de COL2A1 <i>in vitro</i>. La proteína</p> |

| | | |
|---|--|--|
| | <p>en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular.</p> | <p>codificada puede desempeñar un papel en la condrogénesis.</p> |
| <p>SOX6 (SRY-Box 6)</p> | <p>Este gen codifica un miembro de la subfamilia D de los factores de transcripción relacionados con la región determinante del sexo que se caracterizan por un dominio conservado de unión al DNA denominado cuadro de grupo de alta movilidad y por su capacidad para unirse al surco menor del DNA.</p> | <p>Activador transcripcional que se requiere para el desarrollo normal del SNC, la condrogénesis y el mantenimiento de las células musculares cardíacas y esqueléticas. Juega un papel clave en varios procesos de desarrollo, incluida la neurogénesis y la formación de esqueletos.</p> |
| <p>SOX9 (SRY-Box 9)</p> | <p>La proteína codificada por este gen reconoce la secuencia CCTTGAG junto con otros miembros de las proteínas de unión al DNA de la clase HMG-box.</p> | <p>Regulador transcripcional que desempeña un papel en la diferenciación de condrocitos y el desarrollo esquelético. Se une al promotor COL2A1 y activa la expresión COL2A1.</p> |
| <p>SPARC (Proteína secretada ácida y rica en cisteína)</p> | <p>Codifica una proteína asociada a la matriz ácida rica en cisteína. La proteína codificada es necesaria para que el colágeno en el hueso se calcifique.</p> | <p>Parece regular el crecimiento celular a través de las interacciones con la matriz extracelular y las citoquinas. Se une al calcio y al cobre, varios tipos de colágeno, albúmina, trombospondina y membranas celulares.</p> |
| <p>TIMP1 (inhibidor de metalopeptidasa 1)</p> | <p>Pertenece a la familia de genes TIMP. Las proteínas codificadas por esta familia de genes son inhibidores naturales de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Además de inhibir la mayoría de MMP, es capaz de promover la proliferación celular en muchos tipos de células, y también puede tener una</p> | <p>Inhibidor de MMP que funciona formando complejos uno a uno con metaloproteinasas diana, las inactiva de forma irreversible al unirse a su cofactor catalítico de zinc. Actúa en MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13 y MMP16. No actúa sobre MMP14. También</p> |

| | | |
|---|---|--|
| | función antiapoptótica. Su transcripción es altamente inducible en respuesta a muchas citoquinas y hormonas. | funciona como factor de crecimiento que regula la diferenciación celular, la migración y la muerte celular y activa las cascadas de señalización celular. |
| VEGFA (Factor de crecimiento endotelial vascular A) | Este gen es un miembro de la familia de factores de crecimiento VEGF. Codifica una proteína de unión a heparina, que existe como un homodímero unido a disulfuro. | Factor de crecimiento activo en angiogénesis, vasculogénesis y crecimiento de células endoteliales. Promueve la migración celular, inhibe la apoptosis e induce la permeabilización de los vasos sanguíneos. |
| 18 S ribosomal | Es una parte del RNA ribosomal. Es el RNA estructural de la componente pequeña de los ribosomas citoplásmicos eucarióticos, y uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas. | Los datos de secuencia de estos genes se utilizan en el análisis molecular para reconstruir la historia evolutiva de los organismos. También es un marcador importante para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al azar en la detección de la biodiversidad ambiental. |
| GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) | Codifica un miembro de la familia de proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Su proteína tiene capacidad para realizar funciones mecánicamente distintas. El producto de este gen cataliza una importante etapa de producción de energía en el metabolismo de los carbohidratos, la fosforilación oxidativa reversible del gliceraldehído-3-fosfato. | Desempeña un papel importante en la glucólisis y participa en eventos nucleares como la transcripción, transporte de RNA, replicación de DNA y apoptosis. Modula la organización y montaje del citoesqueleto. Facilita las asociaciones de microtúbulos y membranas. Además, esta proteína contiene un péptido que tiene actividad antimicrobiana contra E. coli, P. aeruginosa y C. albicans. |

4. RESULTADOS

4.1. Diseño y fabricación de constructos de alginato

Nuestro primer objetivo en esta tesis fue establecer el método y las concentraciones del biomaterial elegido para fabricar los constructos. Inicialmente, el biomaterial seleccionado fue el alginato a concentraciones de 1,5% a 3%. Para la polimerización del mismo se utilizaron concentraciones de CaCl_2 de 102 mM, 150 mM y 200 mM. Durante las pruebas iniciales pudimos observar que con el alginato al 1,5% polimerizado en cualquiera de las concentraciones de CaCl_2 , las esferas fueron completamente amorfas. En cambio, para el alginato al 3% las esferas formadas fueron más homogéneas y redondeadas con el aumento de la concentración de CaCl_2 (figura 11, paneles k-ñ). Para su fabricación se utilizaron diferentes elementos, como son una jeringuilla de 10 ml, pipetas Pasteur de plástico, pipetas Pasteur de cristal, jeringuilla de 10 ml con aguja de 21G y pipeta con puntas de 200 μl y, tal y como se puede observar en la figura 11, el tamaño de las esferas se veía afectado por el elemento utilizado, siendo las esferas más grandes las obtenidas con jeringuilla y pipeta Pasteur de plástico, y las más pequeñas las realizadas con la pipeta de 200 μl y la jeringuilla con aguja de 21G. Además, se podía ver una mejora en la consistencia de las esferas conforme se aumentaba la concentración de CaCl_2 .

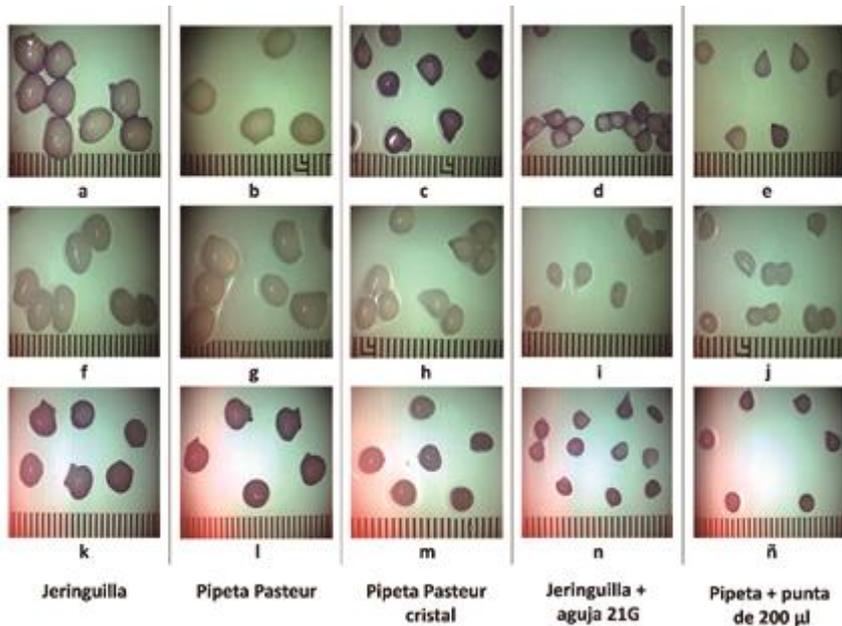


Figura 11. Morfología de esferas de alginato 3%. Se construyeron esferas de alginato al 3% utilizando jeringuilla (paneles a, f, k), pipetas Pasteur de plástico (paneles b, g, l), pipetas Pasteur de cristal (paneles c, h, m), jeringuilla con aguja de 21G (paneles d, i, n) y pipeta con puntas de 200 μ l (paneles e, j, ñ). Se ensayaron tres concentraciones de CaCl_2 ; 102 mM (paneles a-e), 150 mM (paneles f-j) y 200 mM (paneles k-ñ). Las fotografías se realizaron con la lupa SZM-T.

Dado que el manejo de las esferas de alginato resultaba difícil en la práctica, se fabricaron constructos de alginato 3% con un diseño en formato cilindro. En este caso, se utilizaron dos concentraciones de CaCl_2 : 200 y 500 mM, y se observó que la consistencia del constructo a la media hora de polimerizar junto

con el CaCl_2 fue mucho más alta y homogénea que la observada en las esferas. Además, la fabricación del constructo en formato cilindro resultó mucho más sencilla que en el formato esférico, no encontrándose diferencias apreciables con relación a la morfología o a la consistencia entre las dos concentraciones de CaCl_2 utilizadas, tal y como se observa en la figura 12.

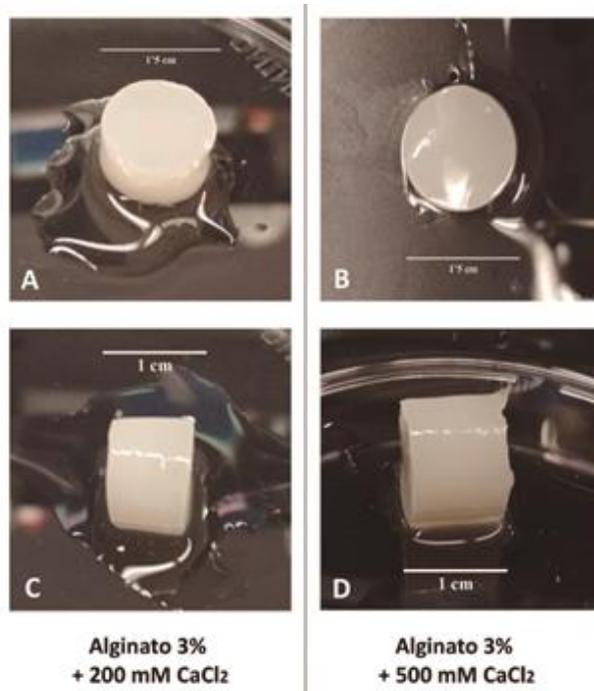


Figura 12. Morfología de cilindros de alginato 3% polimerizados con distintas concentraciones de CaCl_2 . Se elaboraron en placas de cultivos de 24 pocillos con 2 ml de solución de alginato 3% precalentada a 37 °C que se adicionó sobre un volumen de un 10% del volumen final del constructo de CaCl_2 . Las concentraciones de CaCl_2

utilizadas fueron 200 mM (paneles A, C) y 500 mM (paneles B, D). Se muestran imágenes representativas de los constructos generados.

4.2. Aislamiento y caracterización de condrocitos primarios y de hDPSCs

Antes de proceder a cultivar el alginato junto con los dos tipos celulares, se realizó la puesta a punto del cultivo y del proceso de diferenciación condrogénica, además de la caracterización de las células madre de pulpa dental (hDPSCs) mediante citometría de flujo.

Inicialmente se caracterizaron las hDPSCs utilizando anticuerpos de superficie mediante citometría de flujo (en la tabla 22 se muestra la media y la desviación estándar de una n de 5 experimentos expresado en porcentaje) para los anticuerpos de superficie CD29, CD146, CD105, STRO-1, CD44, CD45 y CD31. Al igual que otros autores, encontramos diferencias en la presencia del marcador STRO-1, lo que explica la elevada desviación estándar para la positividad del mismo, ya que se muestra en las células madre de pulpa dental algunas veces como positivo y otras como negativo.

Las células aisladas a partir de pulpa dental fueron positivas para CD29, CD146, CD105, CD44 y STRO-1, y negativas para CD45 y CD31.

Tabla 22. Resultados de la citometría de flujo para hDPSCs. Media y desviación estándar de cada uno de los anticuerpos de superficie estudiados en las hDPSCs para una n de 5 experimentos.

| Anticuerpos de superficie | Media (%) | DS |
|----------------------------------|------------------|-----------|
| CD29+ | 89,40 | 10,70 |
| CD146+ | 82,55 | 12,98 |
| CD105+ | 62,61 | 19,36 |
| STRO -1+ | 45,37 | 48,65 |
| CD44+ | 92,36 | 6,39 |
| CD45+ | 3,98 | 2,80 |
| CD31+ | 1,22 | 1,58 |

Con respecto a la viabilidad de las células aisladas, los experimentos de citometría de flujo con anexina y yoduro de propidio indicaron una viabilidad superior al 80% y una apoptosis y necrosis celular mínimas (tabla 23).

Tabla 23. Resultados del estudio de viabilidad y apoptosis de células hDPSCs. Media y desviación estándar del ensayo de viabilidad con Anexina-IP para una n de 5 experimentos.

| Ensayo Anexina – IP | Media (%) | DS |
|----------------------------|------------------|-----------|
| Vivas | 82,77 | 11,73 |
| Apoptosis temprana | 7,17 | 7,51 |
| Apoptosis tardía | 7,30 | 5,57 |
| Necrosis | 2,76 | 1,62 |

Tanto los condrocitos como las hDPSCs aisladas y cultivadas en medio de proliferación mostraron una morfología fusiforme, característica de células indiferenciadas. El cultivo en medio de inducción condrogénica indujo cambios morfológicos apreciables en los dos tipos celulares, consistentes en un incremento apreciable en el tamaño de las células, así como en la adquisición de una morfología estrellada (figura 13).

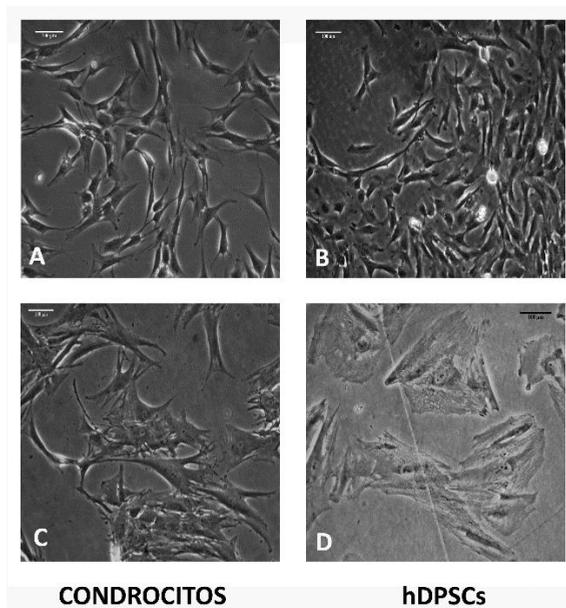


Figura 13. Estudio del medio de diferenciación sobre los dos tipos celulares. Células cultivadas en medio de proliferación durante una semana; condrocitos (panel A) y hDPSCs (panel B). Células cultivadas en medio de diferenciación durante una semana; condrocitos (panel C) y hDPSCs (panel D). Imágenes representativas tomadas con el microscopio invertido de contraste de fases (Leica DMIL LED) para una n de 4 experimentos.

4.3. Determinación de la expresión de los colágenos tipo I y II y agregano mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 2D

Una vez aisladas y caracterizadas las células, se cultivaron en medio de inducción condrogénica a fin de testar su capacidad de diferenciación a células condrales. Las células se cultivaron en monocapa, en medio de proliferación o de diferenciación celular, durante 1-4 semanas. Se determinó en la semana 1, 2, 3 y 4 la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano mediante inmunofluorescencia, tal y como se detalla en material y métodos. La morfología de las células en cultivo se estudió mediante tinción fluorescente de actina utilizando faloidina conjugada a rodamina. Los resultados obtenidos con condrocitos humanos primarios se resumen en la figura 14. Con respecto a la morfología, los condrocitos cultivados en medio de diferenciación presentaron una morfología más redondeada, presentando una menor organización de la actina formando fibras y una organización incipiente de las células formando agregados (figura 14a, paneles E-H). Los condrocitos cultivados en medio de proliferación mantuvieron una morfología fusiforme con una disposición más fibrilar de la actina (figura 14a, paneles A-D).

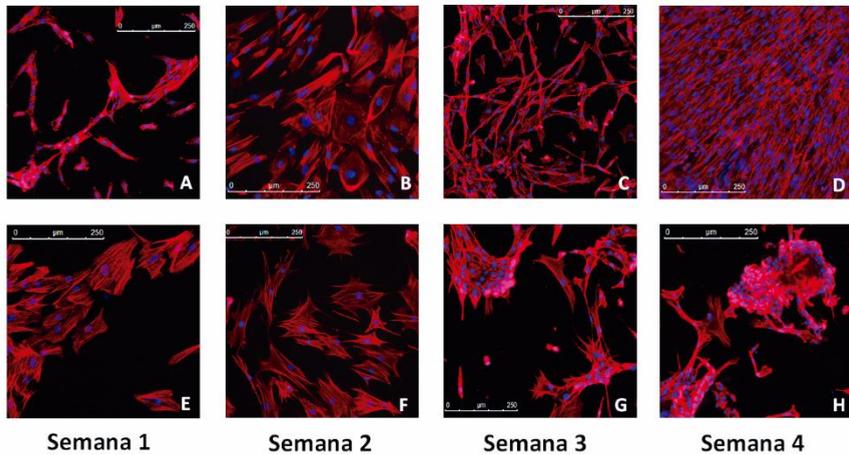


Figura 14a. Tinción con faloidina-rodamina de cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) condrocitos en medio de proliferación. (E-H) condrocitos en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas tomadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

Con relación a la expresión de colágeno tipo I, y tal y como se muestra en la figura 14b, detectamos cierta expresión de esta proteína en los condrocitos cultivados en medio de proliferación, mientras que dicha expresión disminuyó gradualmente hasta desaparecer a las 4 semanas de cultivo en las mismas células cultivadas en medio de inducción condral.

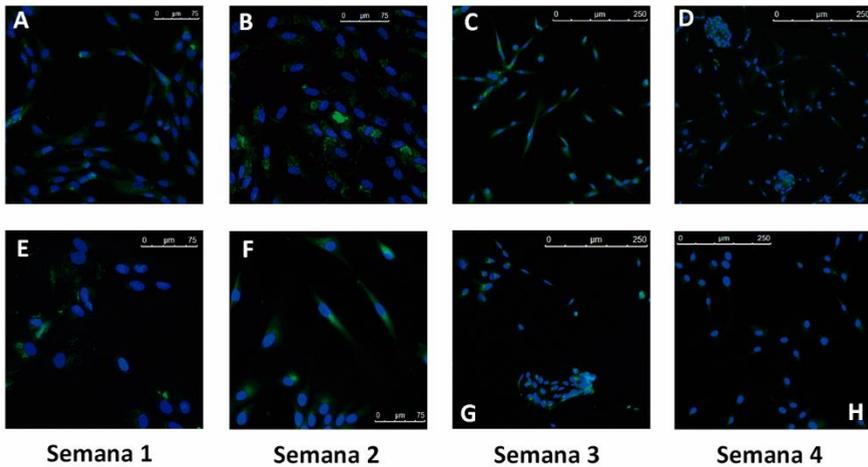


Figura 14b. Inmunofluorescencia para colágeno tipo I en cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) condrocitos en medio de proliferación. (E-H) condrocitos en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

En lo que respecta a la expresión de colágeno tipo II (figura 14c), el patrón de expresión fue opuesto al del colágeno tipo I. Así, observamos una expresión creciente de dicha proteína en las células cultivadas en medio de diferenciación, siendo la expresión de la misma marcadamente mayor en las células organizadas en esferoides (figura 14c, panel G). La expresión de colágeno tipo II no se detectó mediante esta técnica en las células cultivadas en medio de proliferación, donde tampoco

observamos agregados celulares en forma de esferoides (figura 14c paneles A-D).

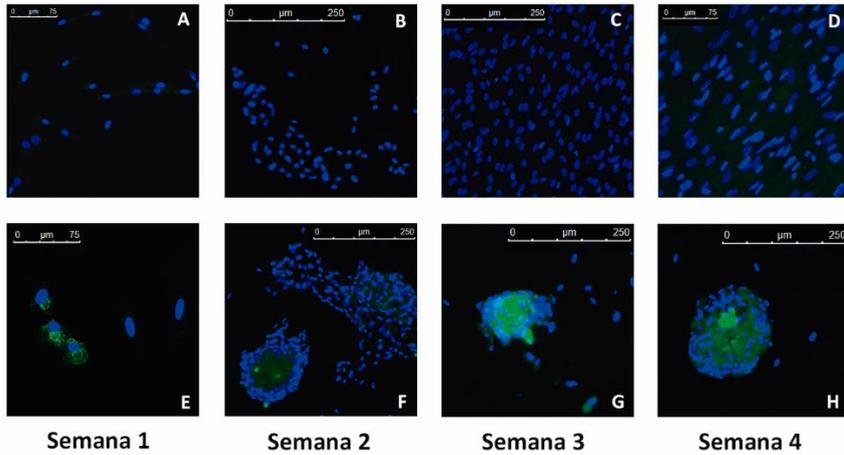


Figura 14c. Inmunofluorescencia para colágeno tipo II en cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) condrocitos en medio de proliferación. (E-H) condrocitos en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

Por último, se estudió el grado de expresión de otro de los componentes cruciales en la formación de cartílago hialino, el agregano, observando expresión tanto en los condrocitos con medio de proliferación (figura 14d, paneles A-D) como en los que estuvieron en medio de diferenciación (figura 14d, paneles E-H). Tal y como se puede ver en las imágenes, el agregano empieza a

hacerse visible en medio de proliferación alrededor de la semana 3 (figura 14d, panel C). En cambio, en el medio de diferenciación la expresión de agregcano es apreciable incluso en la primera semana de cultivo (figura 14d, panel E), haciéndose cada vez más pronunciada conforme pasan las semanas.

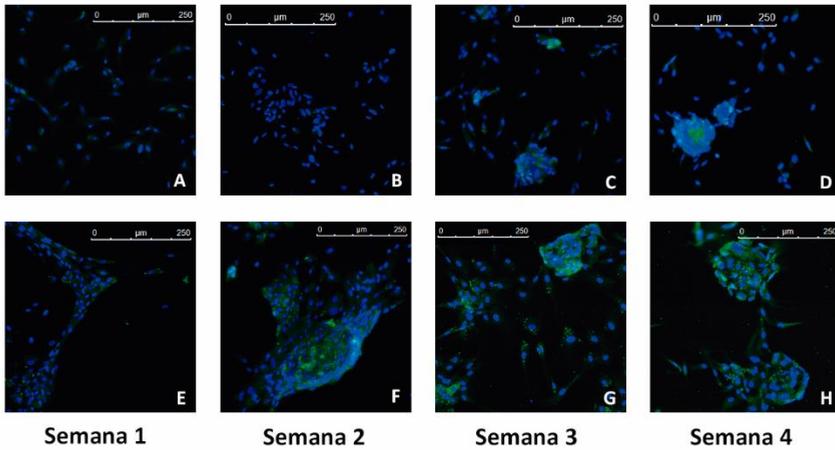


Figura 14d. Inmunofluorescencia para agregcano en cultivo de condrocitos en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) condrocitos en medio de proliferación. (E-H) condrocitos en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

Los resultados obtenidos con las hDPSCs se resumen en la figura 15. El medio de inducción condrogénica promovió cambios morfológicos en dichas células (figura 15a). Las hDPSCs

cultivadas en medio de proliferación (figura 15a, paneles A-D) adquirieron una morfología cada vez más alargada con el paso de las semanas hasta llegar a una confluencia total. En cambio, las células cultivadas en medio de diferenciación (figura 15b, paneles E-H) adquirieron una morfología más estrellada, similar a la de los condrocitos, aumentando el volumen citoplasmático de manera apreciable a partir de la semana 2 (figura 15a, panel F).

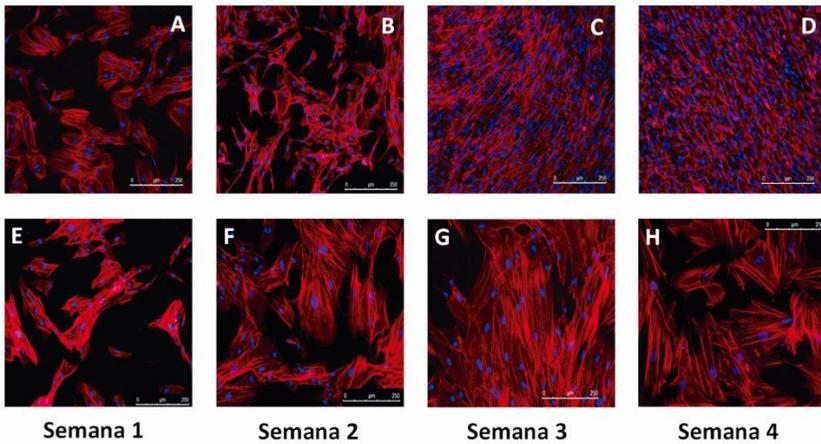


Figura 15a. Tinción con faloidina-rodamina de cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) hDPSC en medio de proliferación. (E-H) hDPSC en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

Para el anticuerpo del colágeno tipo I, en las hDPSCs se apreció marcaje difuso a las tres semanas de cultivo en medio de diferenciación, que desapareció en la semana 4 (figura 15b, paneles (E-H). La expresión de dicha proteína fue negativa en las células cultivadas en medio de proliferación (figura 15b, paneles A-D).

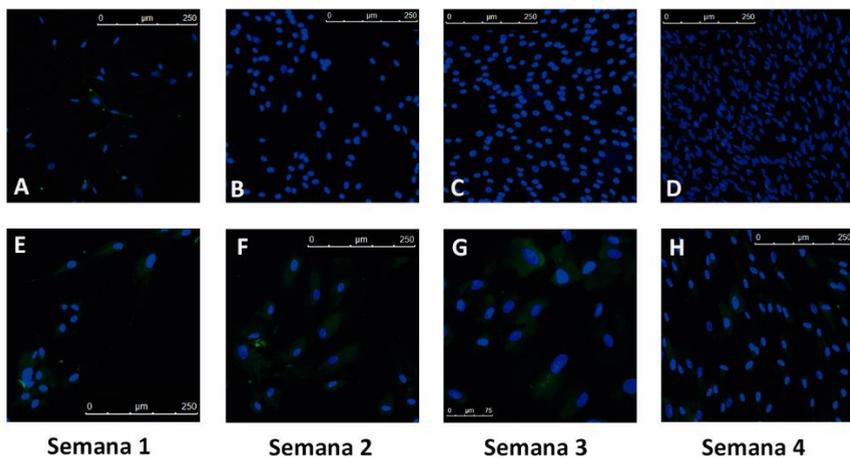


Figura 15b. Inmunofluorescencia para colágeno tipo I en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) hDPSC en medio de proliferación. (E-H) hDPSC en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

En contraste con los resultados obtenidos para el colágeno tipo I, detectamos una expresión significativa para el colágeno tipo II

en hDPSCs cultivadas en medio de diferenciación condral, coincidente con la aparición de agregados celulares esferoides (figura 15c, panel H).

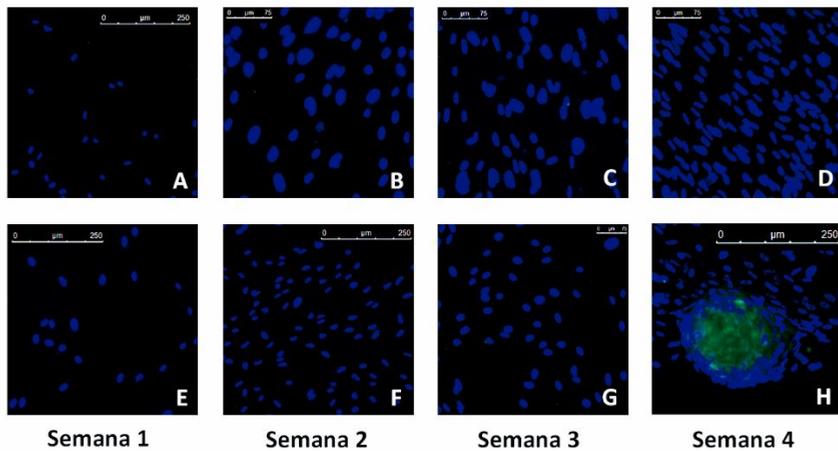


Figura 15c. Inmunofluorescencia para colágeno tipo II en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) condrocitos en medio de proliferación. (E-H) condrocitos en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

Por último, en la figura 15d se muestran las imágenes representativas para la expresión de agregano, reflejando en este caso marcaje en verde en todas las semanas del cultivo de hDPSCs en medio de diferenciación (figura 15d, paneles E-H) y no detectándose expresión en las que estuvieron en medio de

proliferación (figura 15d, paneles A-D). En las tres primeras semanas de cultivo de las hDPSCs en medio de diferenciación la intensidad del marcaje es similar, observándose un gran aumento en la semana 4 (figura 15d, panel H), donde se vuelve a ver una agrupación celular en cuyo interior la expresión de dicha proteína es máxima.

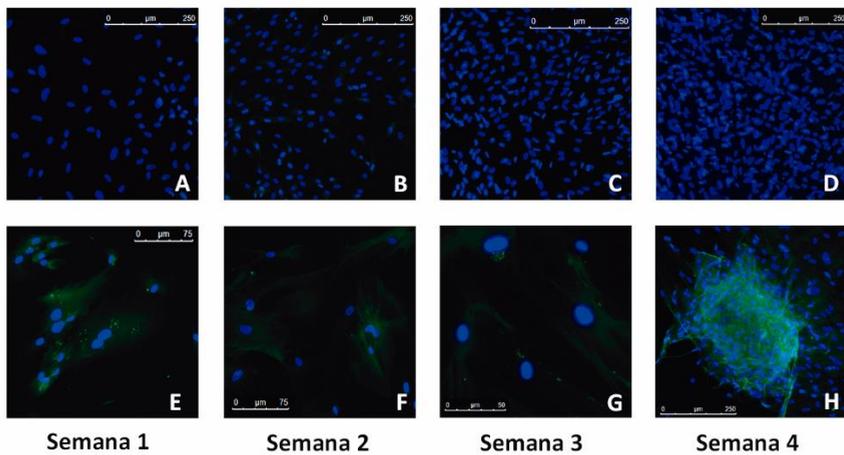


Figura 15d. Inmunofluorescencia para agrecano en cultivo de hDPSCs en 2D en diferentes medios de cultivo. Imágenes de células cultivadas durante 1, 2, 3 y 4 semanas. (A-D) hDPSC en medio de proliferación. (E-H) hDPSC en medio de diferenciación. Se muestran imágenes representativas realizadas con el microscopio de fluorescencia para una n de 4 experimentos.

4.4. Expresión génica relativa de genes implicados en diferenciación condral en cultivos bidimensionales de condrocitos primarios y de hDPSCs

A continuación, nos planteamos estudiar la modificación en los niveles de expresión relativa de los genes ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, RUNX1, SOX9 y VEGFA tanto en condrocitos primarios como en hDPSCs cultivadas bidimensionalmente durante 2 (2S) y 4 semanas (4S) en medio de proliferación o diferenciación. Los resultados obtenidos se resumen en las figuras 16a y 16b para condrocitos y hDPSCs, respectivamente. En dichas figuras se representa el incremento o descenso relativo de la expresión de dichos genes tomando como referencia los niveles de expresión en las células cultivadas en medio de proliferación (línea de puntos). Como estándar interno (*house keeping*) se utilizó el GAPDH.

Tal y como puede apreciarse en la figura 16a, tanto a las dos como a las cuatro semanas de cultivo celular, se produjo un incremento en la expresión de ACAN respecto de los condrocitos mantenidos con medio de proliferación. Con respecto a los genes de proteínas colágenas, registramos un incremento para los tres analizados a las dos semanas, que alcanzó alta significatividad estadística para las cadenas 10A1 y 2A1, la cual

se mantiene en la semana 4 de cultivo. Con respecto a la cadena 1A1, dicho incremento descendió hasta valores cercanos al grupo control en la semana 4 de cultivo. Una tendencia similar se registró para el gen SOX9, cuya expresión aumento significativamente a la semana 2 de cultivo, disminuyendo en la semana 4, y para el VEGFA, que experimentó un discreto incremento en la expresión génica en la semana 4, si bien ese aumento no fue significativo.

RESULTADOS

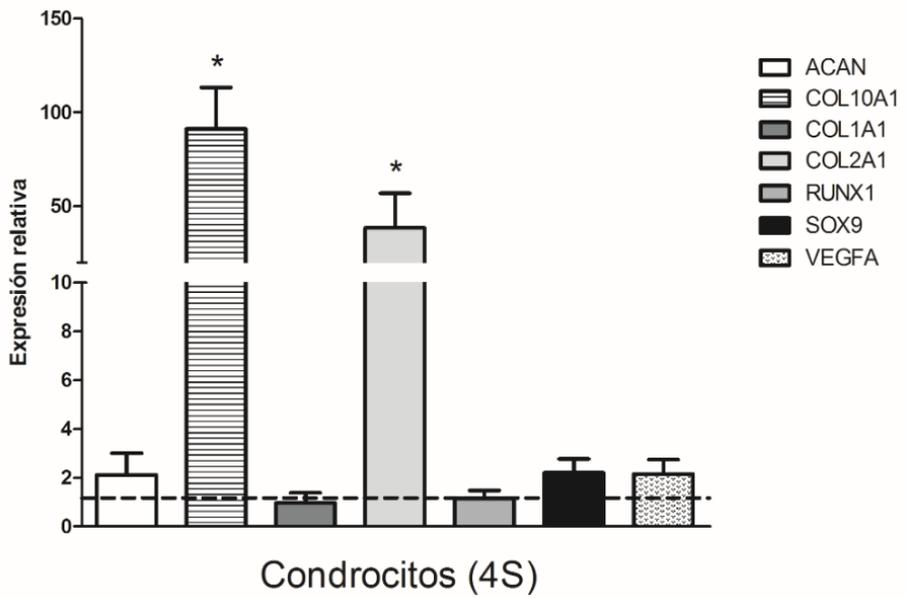
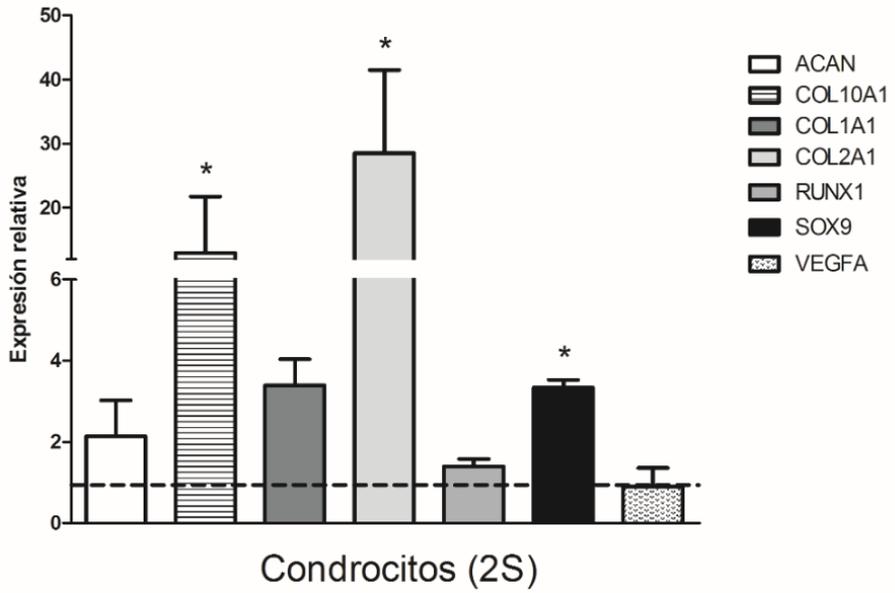


Figura 16a. Resultados de la expresión génica de genes seleccionados en condrocitos cultivados en 2D. Expresión relativa de los genes ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, RUNX1, SOX9 y VEGFA de condrocitos cultivados en monocapa con medio de diferenciación condrogénica durante dos (2S) y cuatro (4S) semanas para los, respecto a la de condrocitos cultivados en medio de proliferación (línea de puntos). Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

En cuanto a los resultados de las hDPSCs (figura 16b), el ACAN muestra una muy leve variación de incremento respecto de las hDPSCs en medio de proliferación (línea de puntos) tanto en la semana 2 como en la 4.

Para los genes de las proteínas colágenas se observa como existe un incremento de la expresión relativa, con alta significatividad estadística para los 3 genes en la semana 2 y en la semana 4. En cambio, para los genes RUNX1, SOX9 y VEGFA no existe ninguna variación en la semana 2, pero en la semana 4 se observa como comienza a haber un incremento de la expresión, siendo significativamente estadístico solo para VEGFA.

RESULTADOS

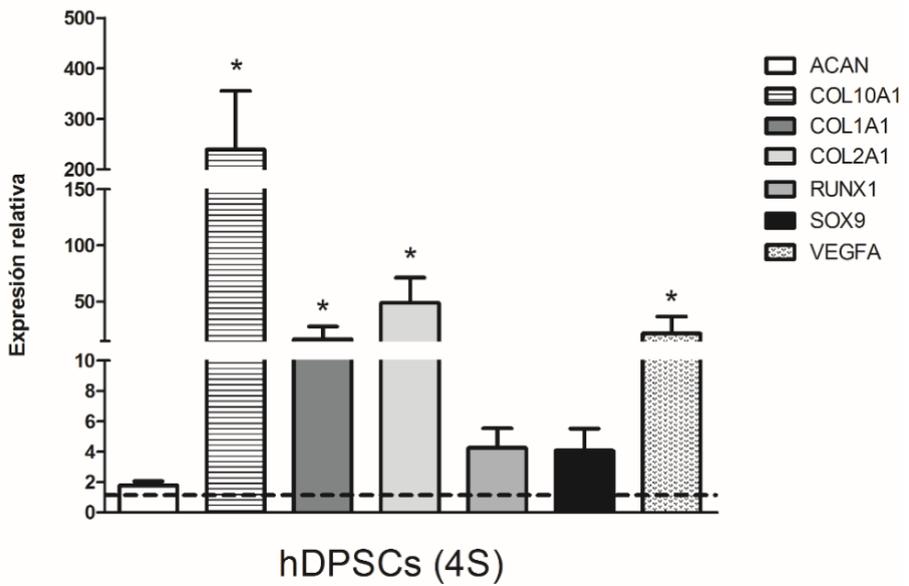
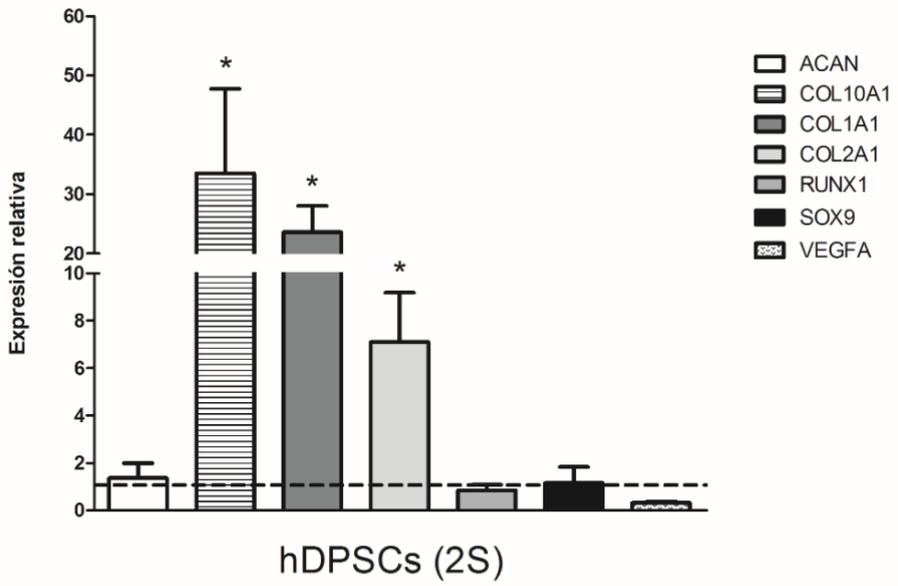


Figura 16b. Resultados de la expresión génica de genes seleccionados en hDPSCs cultivadas en 2D. Expresión relativa de los genes ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, RUNX1, SOX9 y VEGFA de hDPSC cultivadas en monocapa con medio de diferenciación condrogénica durante dos (2S) y cuatro (4S) semanas, respecto a la de hDPSCs cultivadas en medio de proliferación (línea de puntos). Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

4.5. Cultivo de condrocitos y hDPSCs en esferas o cilindros de alginato

Nuestro siguiente objetivo consistió en fabricar constructos con células en suspensión. Se fabricaron constructos esféricos y cilíndricos de alginato al 3% polimerizado con CaCl_2 102 mM conteniendo una concentración de condrocitos (figura 17a) o de hDPSCs (figura 17b) de 2×10^6 células/ml. Los ensayos con esferas de alginato no pudieron extenderse más allá del día 10 debido a la despolimerización del constructo. Los paneles A y B de las figuras 17a y 17b muestran imágenes representativas de dichos constructos al día 7 de cultivo. En cuanto a los cilindros, estuvieron en medio de diferenciación condrogénica y mantuvieron suficiente integridad durante todo el experimento, permitiendo la proliferación celular y la agregación de las células, formando esferoides (figura 17a y 17b, paneles C y D).

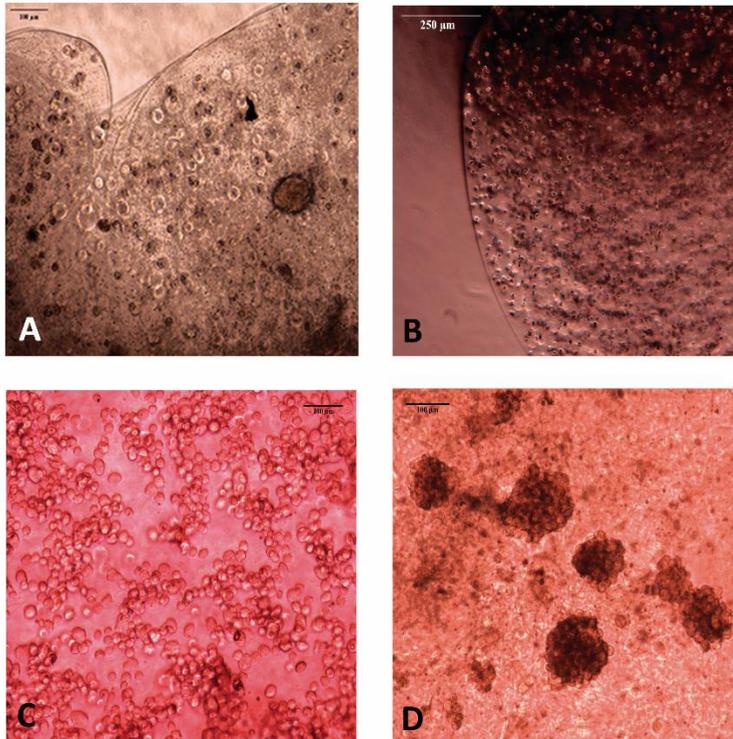


Figura 17a. Cultivo de condrocitos en alginato 3%. Esferas realizadas con alginato al 3% a 37 °C con 2×10^6 células por ml y polimerizadas en CaCl_2 102 mM, utilizando jeringuilla de 10 ml (paneles A, B). Constructos de alginato 3% a 37 °C con 2×10^6 células por ml y polimerizados en CaCl_2 102 mM, utilizando pipeta Pasteur sobre placas de 24 pocillos (paneles C, D). Tiempo de cultivo de las esferas de 7 días, con imágenes representativas a diferentes aumentos (paneles A, B). Tiempos de cultivo de los cilindros realizados a tiempo cero (panel C) y 3 semanas en medio de diferenciación condrogénico (panel D). Imágenes representativas tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED) para una n de 2 experimentos.

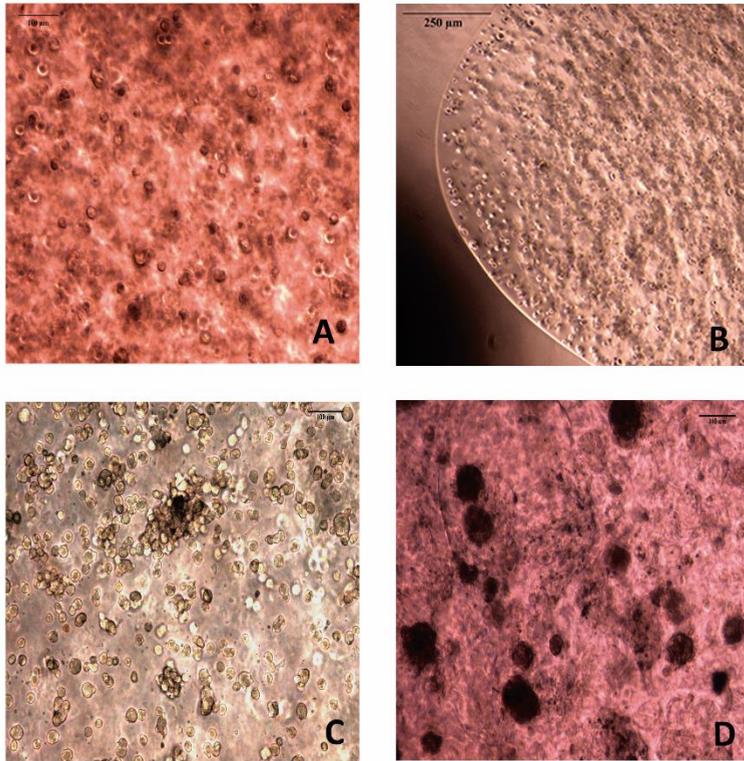


Figura 17b. Cultivo de hDPSCs en alginato 3%. Esferas realizadas con alginato al 3% a 37 °C con 2×10^6 células por ml y polimerizadas en CaCl_2 102 mM, utilizando jeringuilla de 10 ml (paneles A, B). Constructos de alginato 3% a 37 °C con 2×10^6 células por ml y polimerizadas en CaCl_2 102 mM, utilizando pipeta Pasteur sobre placas de 24 pocillos (paneles C, D). Tiempo de cultivo de las esferas de 7 días con imágenes representativas a diferentes aumentos (paneles A, B). Tiempos de cultivo de los cilindros realizados a tiempo cero (panel C) y 3 semanas en medio de diferenciación condrogénico (panel D). Imágenes representativas realizadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED) para una n de 2 experimentos.

4.6. Modelo de experimentación animal en lagomorfo

Una vez estudiado el alginato como biomaterial y la forma de interactuar con las células, se llevó a cabo el experimento en un modelo animal. Se eligió el modelo lagomorfo, y específicamente la raza de *New Zealand*, por poseer una serie de características que lo hacen idóneo para la experimentación sobre el cartílago articular. Su manejo tanto pre como postoperatorio resulta más sencillo por la docilidad característica de esta raza. Además, posee una anatomía de la rodilla similar a la del ser humano, al mismo tiempo que un crecimiento proporcional con este.

La cirugía se llevó a cabo tal y como se puede observar en la figura 18, donde podemos ver en el panel A la incisión realizada en la rodilla, seguido del defecto osteocondral generado y la exposición del defecto para insertar el constructo de alginato 3%.

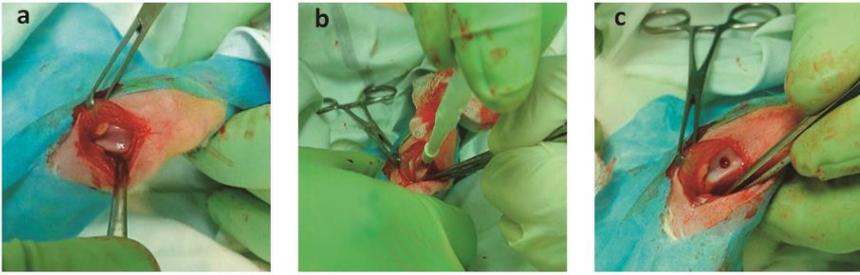


Figura 18. Cirugía en rodillas de conejos. a) Incisión. b) Generación de defectos osteocondrales de 3 mm en la rodilla del conejo. c) Exposición del daño para poder insertar en el defecto el constructo.

Después de tres meses, se sacrificaron los tres conejos para recuperar las rodillas y poder realizar el estudio histológico (figura 20). Antes de empezar con dicho estudio se evaluaron en las articulaciones los defectos generados de forma macroscópica mediante una lupa SZM-T (figura 19), tanto la vista superior, donde se puede apreciar cómo el constructo de unos 3 mm de diámetro ha cubierto los defectos en cada uno de los casos (paneles a, b y c), como la vista transversal, después de hacer los cortes pertinentes (paneles d, e y f), donde se puede ver la profundidad del constructo y cómo se ha integrado en el cartílago.

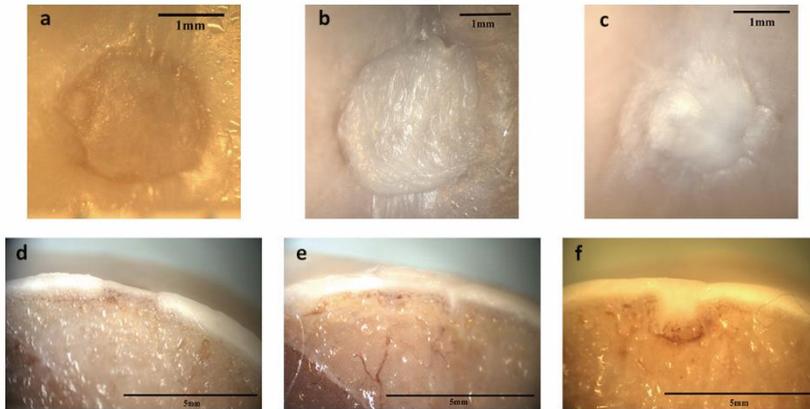


Figura 19. Estudio macroscópico de los defectos osteocondrales en conejo. Se generaron defectos osteocondrales de 3 mm en las rodillas de los conejos y se cubrieron con alginato (paneles a, d), alginato que contenía 2×10^6 condrocitos primarios de conejo (b, e) o alginato que contenía 2×10^6 hDPSC (c, f). Los animales fueron sacrificados 3 meses después de la cirugía. Se muestran imágenes representativas de los animales ($n = 3$) realizadas con la lupa SZM-T. (a-c: vista superior; d-f: vista transversal tras realizar una sección en el plano medio).

En la figura 19 podemos ver cómo en el caso correspondiente a las lesiones donde se colocó el constructo de alginato 3% sin células (a) y el constructo de alginato al 3% embebido con condrocitos (b), existe una integración más fibrosa que en el caso del constructo de alginato 3% con hDPSCs embebidas (c). Este hecho se refleja también en las secciones transversales donde podemos ver cómo en el constructo de solo alginato (d) la capa que cubre el defecto es mucho más fina que en los otros dos

casos; además se visualizó una pérdida significativa del cartílago articular con un hundimiento apreciable de la superficie articular. En el caso del alginato con condrocitos (e), el tejido neoformado en la zona del defecto sobresalía hacia la cavidad articular. La integración del constructo y posible regeneración del cartílago parece ser más efectiva en el caso del alginato conteniendo condrocitos (b y e) o hDPSCs (c y f).

Para el estudio histológico se realizaron tinciones de hematoxilina–eosina tanto de las secciones con constructo como de secciones de la rodilla sana de los conejos para realizar la comparación del cartílago. El análisis histológico reveló una marcada pérdida del cartílago en la articulación donde solo se implantó alginato (figura. 20b y 20f) en comparación con las de los animales control (figura. 20a y 20e) (98).

Esta pérdida de cartílago se vio claramente disminuida en los animales con alginato que contenía o bien condrocitos (fig. 20c y 20g) o bien hDPSC (fig. 20d y 20h). En ellos, se apreció una marcada regeneración del cartílago articular, caracterizada por la formación de nuevos grupos isogénicos condrales y nueva matriz condral, aunque esto fue más evidente en animales donde se implantó alginato con hDPSCs en comparación con los que tenían alginato y condrocitos.

Además, se utilizó la microscopía con luz polarizada para analizar la disposición de las fibras en la matriz condral. Con esto se observó una alteración pronunciada en las fibras de colágeno en los animales implantados con alginato sólo en comparación con los animales implantados con alginato que contenía condrocitos o hDPSCs, en los cuales la disposición de las fibras era más similar a la del cartílago nativo (fig. 20i, 20j, 20k y 20l). En cuanto a la inmunohistoquímica realizada sobre los cortes histológicos, se utilizó para evaluar la expresión de colágeno tipo II. En los animales en los que solo se utilizó alginato para reparar la lesión, se observó una menor expresión de colágeno tipo II comparado con el de los animales control (fig. 20m y 20n). En ambos grupos experimentales en los que los condrocitos y hDPSCs se usaron en combinación con alginato, se observó una mayor expresión de colágeno tipo II (fig. 20o y 20p).

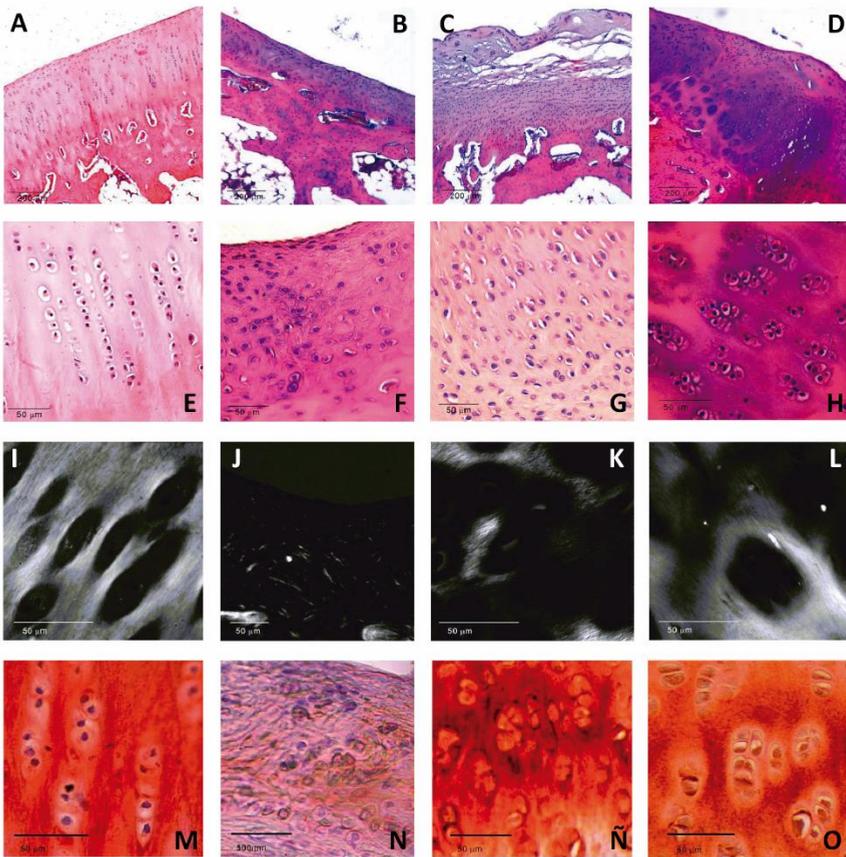


Figura 20. Estudio histológico de los defectos osteocondrales. Defectos de 3 mm realizados en rodillas de los conejos cubiertos con alginato (B, F, J, N), alginato que contenía 2×10^6 condrocitos primarios de conejo (C, G, K, O) o alginato que contenía 2×10^6 hDPSCs (D, H, L, P). Los animales fueron sacrificados 3 meses después de la cirugía. Las rodillas se fijaron con formaldehído al 4%, se sumergieron en solución descalcificadora OSTEOSOFT durante 5 semanas a temperatura ambiente y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron secciones de 5 μ m de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina y se analizaron

bajo luz normal (A–H), polarizada (I–L) utilizando un microscopio óptico. El análisis de inmunohistoquímica del colágeno tipo II se representa en los paneles M–O. También se representan imágenes histológicas de animales control (A, E, I, M). Se muestran imágenes microscópicas representativas de $n = 3$ animales (98).

Pese a los resultados obtenidos, la manipulación del constructo de alginato presentó muchos problemas tanto *in vitro* como al realizar la cirugía, circunstancia que nos llevó a plantearnos el diseño de un copolímero de alginato–agarosa con la idea de mejorar el manejo y las características biomecánicas del mismo, sin perjudicar la capacidad condrogénica del mismo.

4.7. Caracterización biomecánica de los copolímeros alginato-agarosa

Nuestro primer objetivo para la generación de los nuevos constructos consistió en la caracterización biomecánica de los mismos. Para ello realizamos un estudio reológico sometiendo los biomateriales a un esfuerzo de cizalladura, obteniendo el módulo de cizalladura (G) de los mismos mediante el uso de un reómetro que permitió el cálculo del módulo de cizalladura (G') denominado módulo de almacenamiento que hace referencia a la componente elástica del material, y la parte imaginaria del módulo de cizalladura (G''), la cual se denomina módulo de pérdidas y hace referencia a la componente viscosa del material.

Tal como se muestra en la figura 21, los bloques de agarosa y alginato-agarosa de diferentes concentraciones se realizaron entre dos cristales para que la superficie de todo el hidrogel fuera homogénea. Para poder medir los parámetros, realizamos con un troquel de 2,5 cm de diámetro círculos en el hidrogel y se pusieron lijas de 60 (tamaño de grano) tanto arriba como abajo del hidrogel, para que este no resbalara al hacer las medidas. Se realizó la medida de los módulos 10 veces para cada hidrogel.

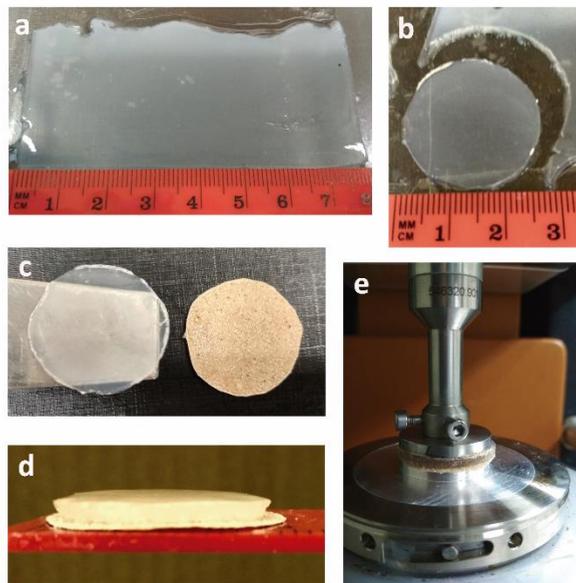


Figura 21. Reología de constructos de alginato y agarosa. Se prepararon hidrogeles con una superficie de 24 cm^2 y un volumen de 12 ml (panel a) de los que se obtuvieron discos troquelados de 2,5 cm de diámetro (panel b) que se montaron sobre una lija de grano 60 (panel c). Se muestran imágenes transversales (panel d) y el montaje experimental en el reómetro (panel e).

Tras realizar todas las medidas pertinentes, se realizó un estudio estadístico mediante el programa GraphPad Prism 5 con todos los datos recogidos de las medidas de las diferentes concentraciones de los hidrogeles. En la tabla 24 se muestran los datos estadísticos de la media y la desviación estándar para las cuatro diferentes concentraciones que se midieron, en el torque 50 de las medidas, para la G' , G'' y E.

Tabla 24. Resultados del estudio reológico de los diferentes constructos en el torque 50.

| % Alginateo | % Agarosa | Torque ($\mu\text{N}\cdot\text{m}$) | G' (Pa) | G'' (Pa) | E (Pa) |
|-------------|-----------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
| 0 | 0,5 | 50 | 718,09 \pm 199,03 | 52,41 \pm 13,74 | 2160,01 |
| 0 | 1 | 50 | 1856,02 \pm 212,39 | 123,31 \pm 7,37 | 5580,35 |
| 1,5 | 1 | 50 | 1177,78 \pm 104,23 | 72,08 \pm 14,49 | 3539,95 |
| 3 | 1 | 50 | 1247,27 \pm 210,81 | 101,78 \pm 27,27 | 3754,26 |

Donde

G' = módulo de almacenamiento,

G'' = módulo de pérdidas,

E = módulo de tracción.

Tal y como se muestra en la gráfica A de la figura 22a, existe un aumento claro de G' en las muestras de agarosa 1% comparadas con las de agarosa 0,5%, lo que conlleva prácticamente doblar el valor de G' para todos los valores de par de oscilación. Esto implica que el hecho de añadir más agarosa permitió al material almacenar una mayor cantidad de energía sin sufrir una deformación permanente, lo cual es indicativo de que el material presentó una mayor rigidez.

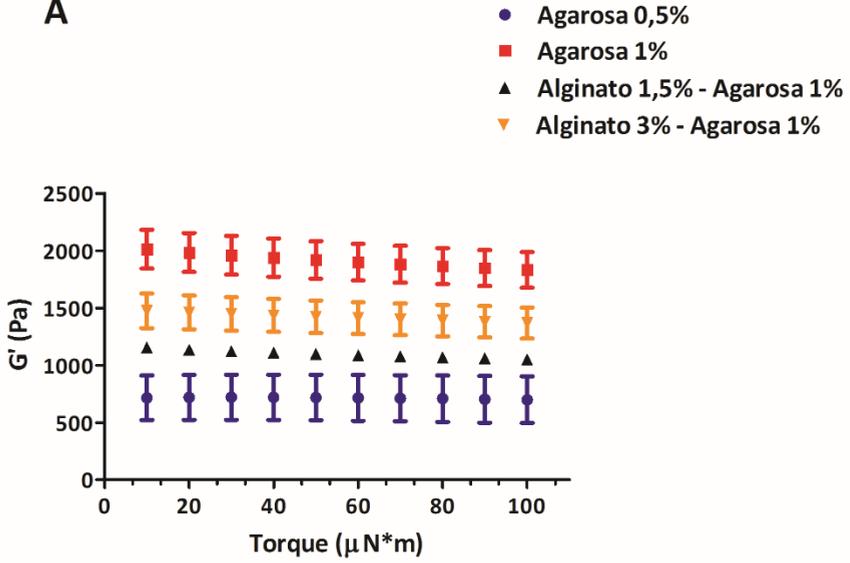
También es interesante indicar que se apreció un ligero descenso de los valores de G' conforme aumentó el par de oscilación, sobre todo para agarosa 1%. Este comportamiento no lineal del material muestra una pérdida de su resistencia a la fuerza aplicada para valores altos del par de oscilación frente a valores bajos del mismo. Este fenómeno, conocido como ablandamiento por deformación o *strain-softening*, pudo ser debido a la acumulación de defectos a medida que aumentó la amplitud de la deformación, cosa que no se observó tan claramente en el caso de la agarosa 0,5%.

En cuanto a las muestras con alginato (alginato 1,5%-agarosa 1% y alginato 3%-agarosa 1%) se apreció un descenso de G' y, por tanto, el material era menos rígido que el de agarosa 1%. Parece que el alginato afectó de forma negativa a la resistencia del material, haciéndolo menos resistente.

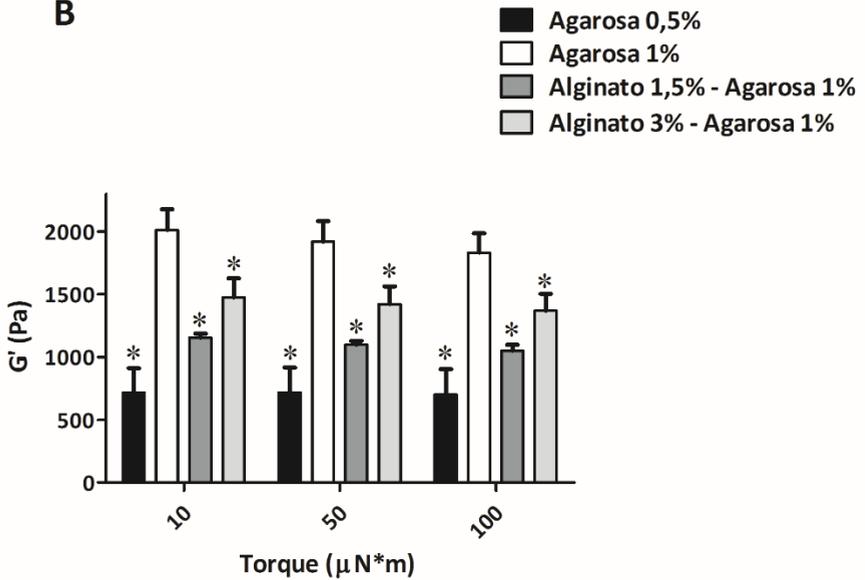
En el panel B de la figura 22a se representan los valores de G' de 5 réplicas para los torques 10, 50 y 100. Se puede observar cómo cambiaron los datos de G' al comienzo, en el intermedio y al final de la medida. El estudio estadístico se realizó comparando los datos con los datos de agarosa 1% como referencia, mediante una *oneway Anova*. Se aprecian diferencias significativas para todos los casos.

Figura 22a. Módulo de almacenamiento (G') calculado de los diferentes constructos analizados. Se representa media \pm SD de una n de 5 experimentos. En el panel A se muestran todos los pares de oscilación para cada condición. En el panel B se muestran los datos para los pares de oscilación 10, 50 y 100 de cada condición. Se toma como referencia para realizar el estudio estadístico la condición agarosa 1%. Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

A



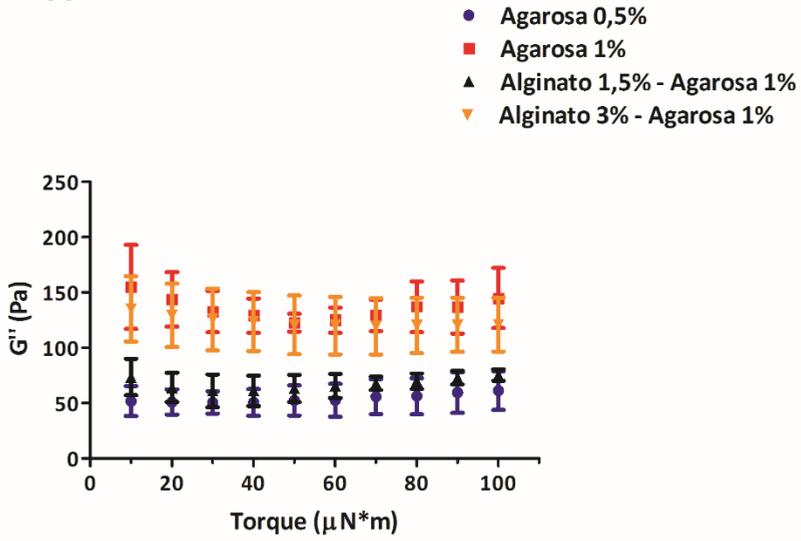
B



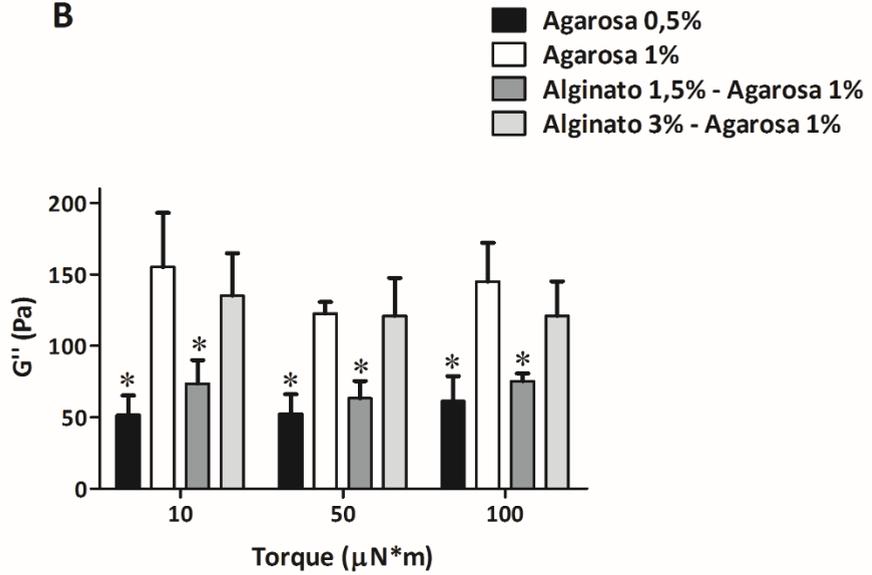
En cuanto a los valores obtenidos del módulo de pérdidas (G''), fueron bastante menores que los obtenidos previamente para G' , tal como podemos ver en el panel A de la figura 22b. Esto implica que la mayor parte del material fue capaz de recuperar su estructura interna y su forma original. Sin embargo, dado que G'' no fue nulo, hubo una parte del material que se deformó de manera irreversible. Si comparamos G'' de agarosa 0,5% y de agarosa 1%, se aprecia que la adición de agarosa produjo un aumento claro de este módulo. Este aumento de G'' es indicativo de que ocurrieron nuevos procesos de fricción que produjeron una mayor energía disipada.

Figura 22b. Módulo de pérdidas (G'') calculado de los diferentes constructos analizados. Se representa media \pm SD de una n de 5 experimentos. En el panel A se muestran todos los pares de oscilación para cada condición. En el panel B se muestran los datos para los pares de oscilación 10, 50 y 100 de cada condición. Se toma como referencia para realizar el estudio estadístico la condición agarosa 1%.

A



B



En cuanto a las muestras con alginato (alginato 1,5%-agarosa 1% y alginato 3%-agarosa 1%), tuvieron un comportamiento intermedio entre agarosa 0,5% y agarosa 1%. En general se observó un comportamiento no lineal que también pudo ser debido al fenómeno de *strain-softening*.

De la misma forma que con G' , se ha realizado una representación gráfica (panel B de la figura 22b) para el valor de torque de inicio, intermedio y final (10, 50 y 100 torque), de 5 n. Se realizó el estudio estadístico enfrentando todos los datos con los datos de la agarosa 1%, dando como resultado diferencias significativas para la agarosa 0,5% y para el copolímero alginato 1,5%-agarosa 1%.

Por tanto, se puede concluir que la mejor combinación es alginato 3%-agarosa 1% frente a alginato 1,5%-agarosa 1%, debido al aumento de rigidez que presenta el primer copolímero.

4.8. Ensayos de citotoxicidad

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la citotoxicidad de los materiales utilizados. Para ello, y siempre siguiendo la **Norma UNE-EN ISO 10993-5**, se realizó un ensayo de citotoxicidad, tanto de la concentración de CaCl_2 , debido a la posible toxicidad que puede generar porcentajes elevados de este, como de los diferentes tipos de constructo que se utilizaron en este estudio.

En la figura 23a mostramos las gráficas que recogen los resultados del estudio de citotoxicidad de concentraciones crecientes de CaCl_2 (0,625%, 1,25%, 2,5%, 5% y 10%) sobre los condrocitos (panel A) y sobre las hDPSCs (panel B). En el caso de los condrocitos, tan solo la menor de las concentraciones muestra una leve diferencia significativa respecto del control negativo (condrocitos cultivados en medio no suplementado con CaCl_2), observándose por tanto que las concentraciones más altas no afectan a la viabilidad de estas células. En cambio, en el caso de las hDPSCs las dos concentraciones más altas de cloruro cálcico provocan una disminución significativa de la viabilidad celular respecto al control negativo (hDPSCs cultivadas en medio no suplementado con CaCl_2).

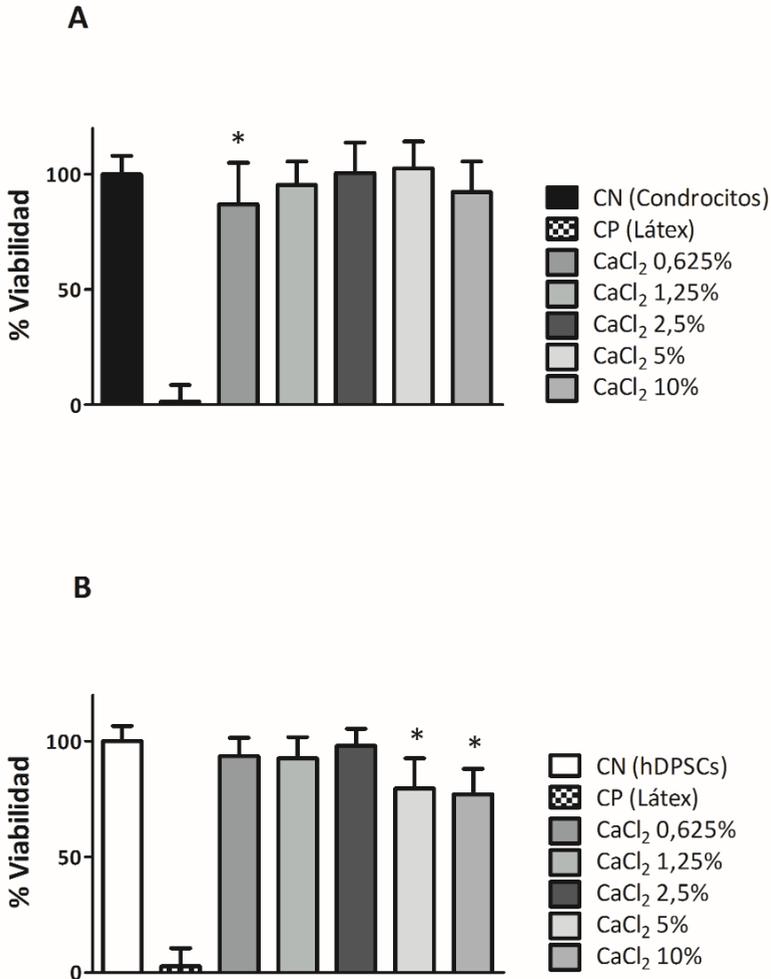


Figura 23a. Estudio de la citotoxicidad sobre las células de diferentes concentraciones de CaCl_2 . El panel A corresponde a los resultados del ensayo de citotoxicidad sobre los condrocitos. El panel B representa los datos de viabilidad de las células madre de pulpa dental (hDPSCs). Las concentraciones de CaCl_2 probadas son 0,625%, 1,25%, 2,5%, 5% y 10%. Los resultados corresponden a los valores obtenidos de 3 réplicas experimentales. Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

A fin de evaluar la toxicidad de los biomateriales utilizados, condicionamos medios de cultivo con los mismos, realizándose estudios de citotoxicidad tal y como se detalla en la sección de material y métodos de este trabajo. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 23b y 23c. Tal y como puede observarse, los medios condicionados con alginato 3%, alginato 3%-agarosa 1% y agarosa 1% con CaCl_2 102 mM, generaron un descenso significativo de la viabilidad celular en todos los tiempos ensayados, siendo los constructos de alginato 3% y alginato 3%-agarosa 1% los que provocaron un mayor efecto.

En el caso de la agarosa 1% sin CaCl_2 (figura 23b y 23c, paneles D), no se observaron diferencias significativas para ninguno de los dos tipos celulares, llegándose a obtener porcentajes de viabilidad más altos incluso que los del control negativo en el medio condicionado 7 días.

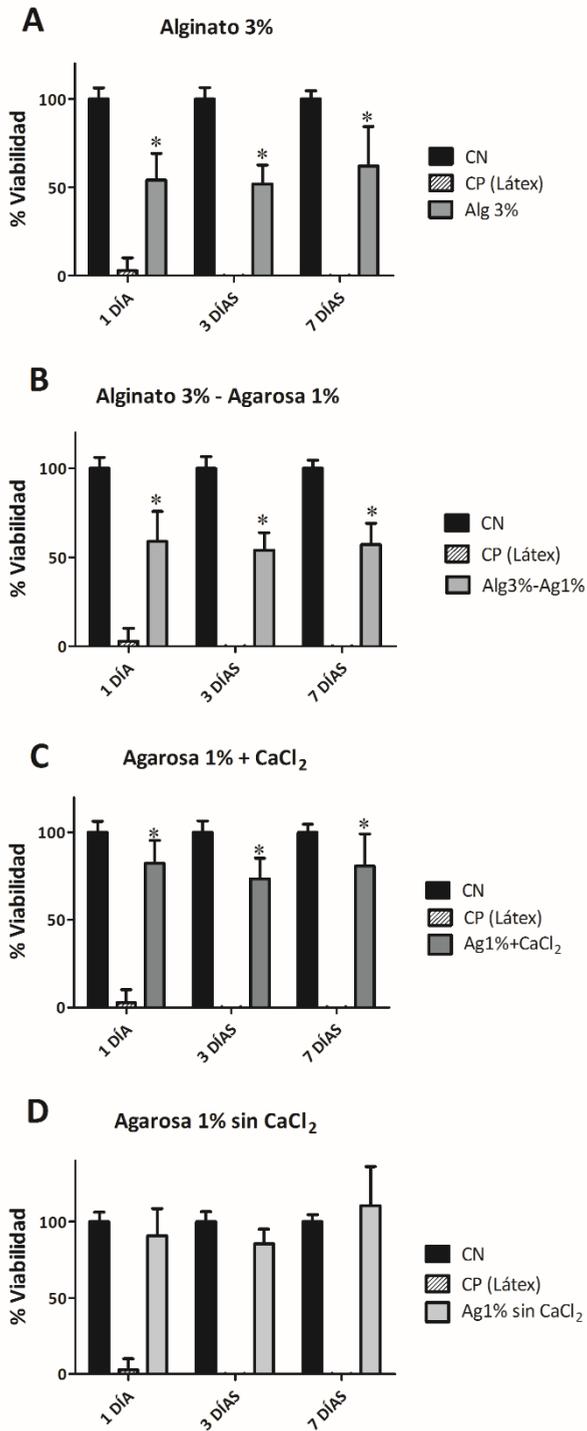


Figura 23b. Estudio de la citotoxicidad de los constructos sobre los condrocitos. Las condiciones estudiadas fueron alginato al 3% (panel A), alginato 3%-agarosa 1% (panel B), agarosa 1% con CaCl_2 (panel C) y agarosa sin CaCl_2 (panel D). Los resultados obtenidos corresponden al condicionamiento del medio con los constructos durante 1, 3 y 7 días a 37 °C, y corresponden a una n de 3 experimentos. Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

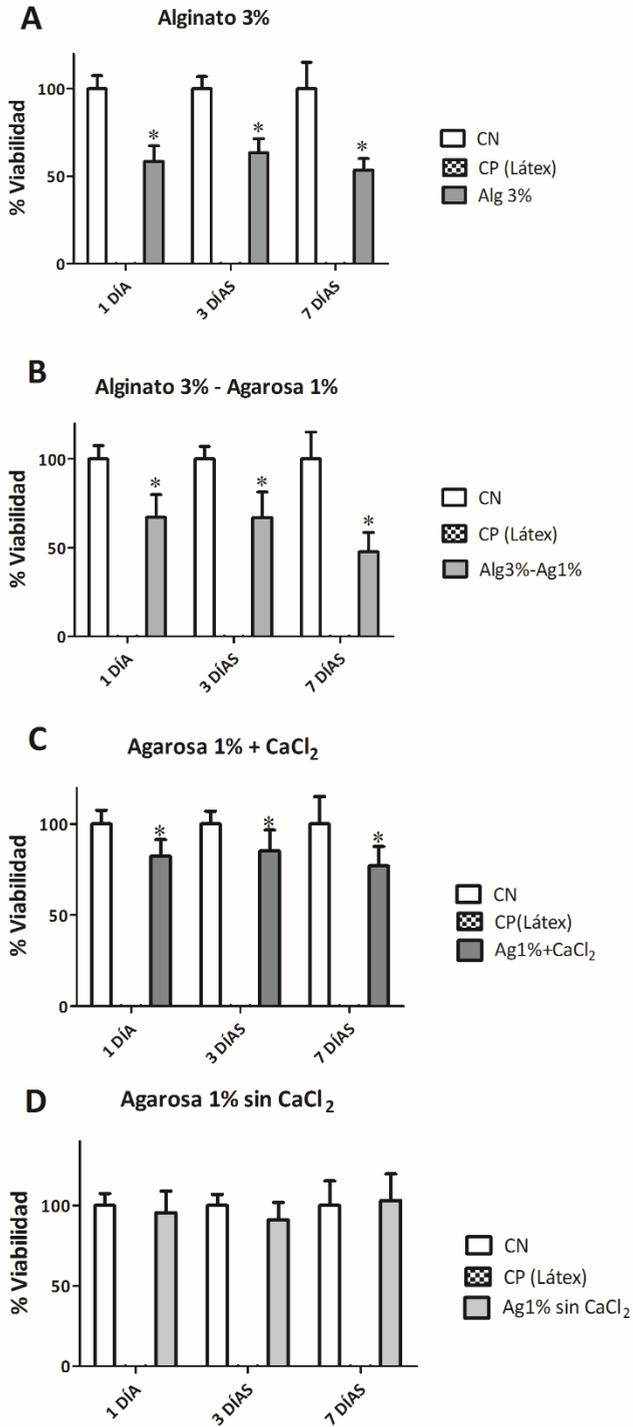


Figura 23c. Estudio de la citotóxicidad de los constructos sobre las hDPSCs. Las condiciones estudiadas fueron alginato al 3% (panel A), alginato 3%-agarosa 1% (panel B), agarosa 1% con CaCl_2 (panel C) y agarosa 1% sin CaCl_2 (panel D). Los resultados obtenidos corresponden al condicionamiento del medio con los constructos durante 1, 3 y 7 días a 37 °C y corresponden a una n de 3 experimentos. Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.

4.9. Cultivo de condrocitos y hDPSCs en constructos de alginato–agarosa

Una vez se estudió el comportamiento biomecánico del copolímero alginato–agarosa y su citotoxicidad para los dos tipos celulares empleados en esta tesis, se determinó la concentración de alginato y agarosa con la cual se iban a realizar los constructos empleados en los demás ensayos de esta tesis. La mezcla seleccionada fue alginato al 3% junto con agarosa al 1%, con CaCl_2 102 mM en un volumen igual al 10% del volumen final del constructo fabricado.

En primer lugar, nos planteamos estudiar si dichos constructos eran citocompatibles con los dos tipos celulares empleados en esta tesis. Para ello, generamos constructos a partir de suspensiones monoméricas con células en suspensión, tal y como se describe en material y métodos. Utilizamos una densidad de 2×10^6 células por mililitro. Una vez generados los

constructos con células embebidas, se cultivaron en medio de proliferación o diferenciación durante 6 semanas y se estudiaron mediante microscopía de contraste de fases. Los resultados se resumen en las figuras 24a (constructos con condrocitos) y 24b (constructos con hDPSCs), que muestran el cultivo de los dos tipos celulares tanto en medio de proliferación (paneles A-D) como en medio de diferenciación (paneles E-H), en un tiempo inicial o tiempo cero (paneles A-E), a las 2 semanas de cultivo (B y F), a las 4 semanas de cultivo (paneles C y G) y a las 6 semanas de cultivo (D y H).

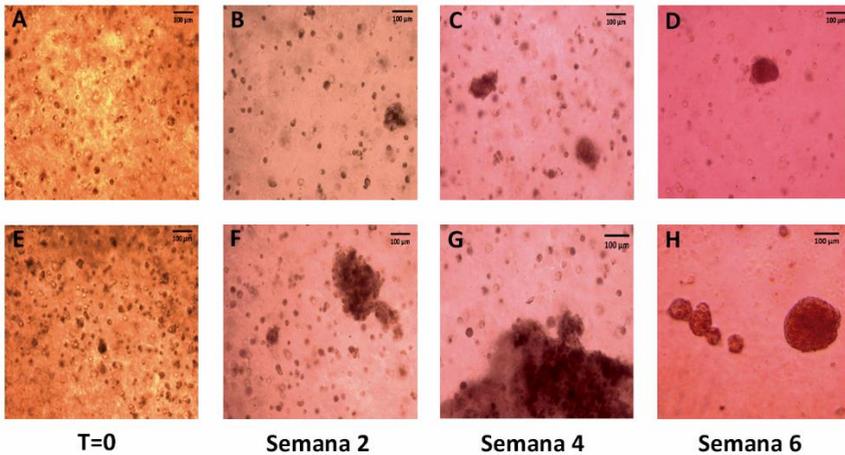


Figura 24a. Cultivo de condrocitos embebidos en constructos de 3% alginato-1% agarosa. Los constructos de incubaron en presencia de medio de proliferación (paneles A-D) y medio de diferenciación (paneles E-H) a tiempo cero, es decir nada más fabricar el constructo, y a las 2, 4 y 6 semanas de cultivo. Se muestran imágenes

representativas tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED), para una n de 6 experimentos.

Con respecto a los condrocitos (figura 24a) podemos observar cómo en medio de diferenciación, y en comparación a lo que ocurre en medio de proliferación, aparecen abundantes esferoides a partir de la semana 2. Dichas agrupaciones también aparecen cuando los condrocitos se cultivan en medio de proliferación, pero son de menor tamaño y aparecen más tarde.

Con relación a los constructos generados con hDPSCs (figura 24b), las células se organizan formando esferoides, tanto cuando son cultivados en medio de diferenciación como en medio de proliferación, si bien es cierto que el medio de diferenciación induce la formación de agrupaciones celulares esferoides de mayor tamaño y más abundantes.

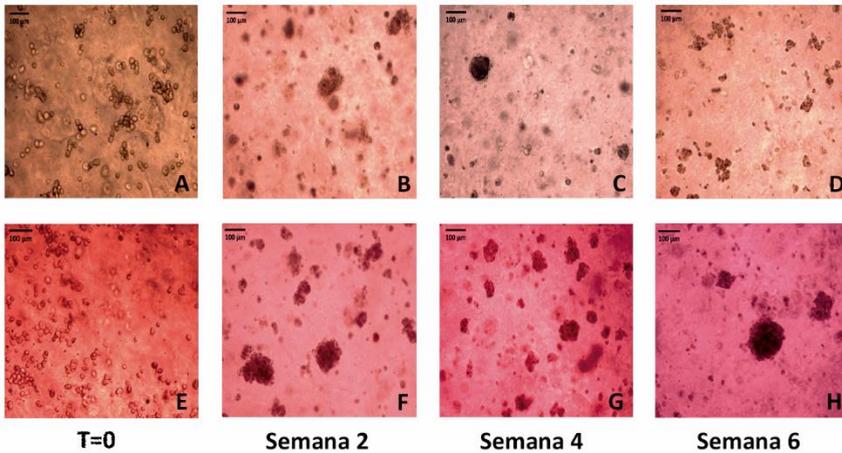


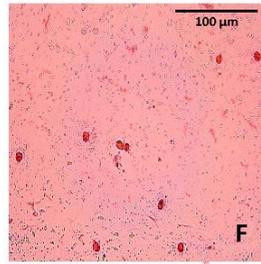
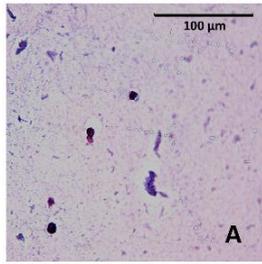
Figura 24b. Cultivo de hDPSCs embebidas en constructos de 3% alginato-1% agarosa. Los constructos de incubaron en presencia de medio de proliferación (paneles A-D) y medio de diferenciación (paneles E-H) a tiempo cero, es decir nada más fabricar el constructo, y a las 2, 4 y 6 semanas de cultivo. Se muestran imágenes representativas tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM IL LED), para una n de 6 experimentos.

4.10. Organización espacial y expresión de colágeno en condrocitos cultivados en constructos de alginato-agarosa

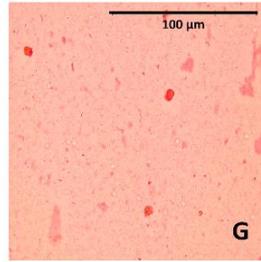
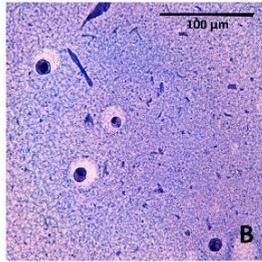
A continuación, nos planteamos evaluar la disposición de los condrocitos en los constructos 3D, así como su diferenciación hacia estirpes condrogénicas. Para ello cultivamos condrocitos primarios en constructos de alginato/agarosa a la concentración

del 3% y 1%, respectivamente, durante 2 días en medio de proliferación. Posteriormente dicho medio se mantuvo o se reemplazó por medio de diferenciación condrogénica durante 6 semanas. Se incluyeron los constructos en parafina a los 2 días, 4 semanas y 6 semanas de cultivo, y se tiñeron con hematoxilina-eosina y con rojo sirio. Los resultados se muestran en la figura 25. Las células cultivadas en medio de proliferación aparecen preferentemente aisladas y repartidas homogéneamente en el constructo. En cambio, los condrocitos cultivados en medio de diferenciación se agrupan formando esferoides, más abundantes y de mayor tamaño en los cultivos a 6 semanas. Se observó tinción positiva para rojo sirio en los agregados celulares de los cultivos en medio de diferenciación a las 6 semanas, indicando la probable presencia de colágeno en la matriz extracelular.

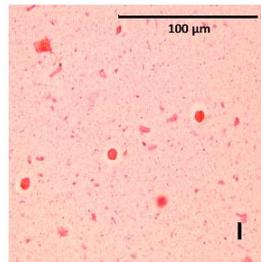
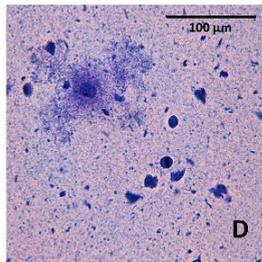
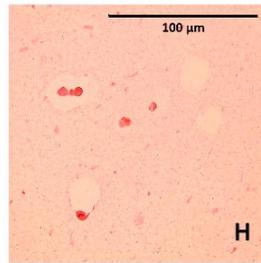
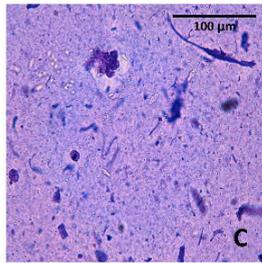
RESULTADOS



2 días



4S



6S

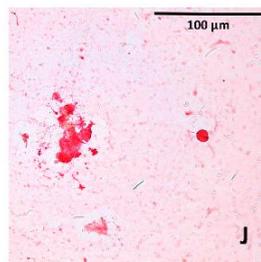
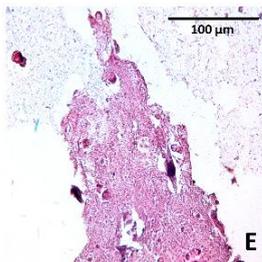


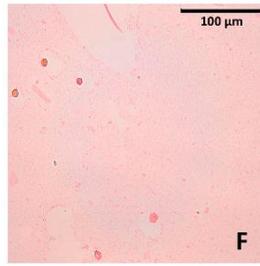
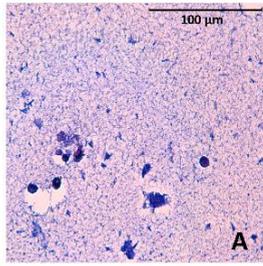
Figura 25. Estudio histológico de constructos con condrocitos. Tinciones de hematoxilina-eosina (paneles A-E) y rojo-sirio (paneles F-J) de constructos de 3% alginato con 1% agarosa cultivado con condrocitos, a los dos días de cultivo (paneles A y F) y tras 4 (4S) y 6 (6S) semanas, en medio de cultivo de proliferación (paneles B, D, G y I) o diferenciación (paneles C, E, H y J). Se muestran imágenes de microscopía óptica (microscopio Leica DMD108), para una n de 3 experimentos.

4.11. Organización espacial y expresión de colágeno en hDPSCs cultivadas en constructos de alginato-agarosa

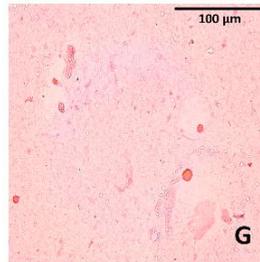
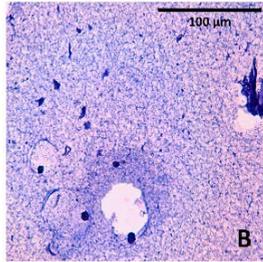
De igual modo, evaluamos la disposición espacial y la producción de colágeno en hDPSCs cultivadas en constructos de agarosa-alginato siguiendo un diseño similar al utilizado para el estudio de los condrocitos. Las células se cultivaron en los constructos durante 2 días en medio de proliferación, que se mantuvo o se reemplazó por medio de diferenciación durante 6 semanas. Se incluyeron constructos a los 2 días, 4 semanas y 6 semanas de cultivo y se tiñeron con hematoxilina eosina o con rojo sirio. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 26. Al igual que con los condrocitos, las células cultivadas en medio de proliferación aparecieron aisladas y repartidas homogéneamente en el interior del constructo. El efecto del medio de diferenciación fue

patente por la formación de abundantes esferoides. Así mismo, las células demostraron positividad para la expresión de colágeno, siendo esta máxima en los cultivos de células en medio de diferenciación condrogénica, observándose depósitos extracelulares de colágeno.

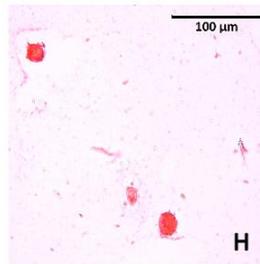
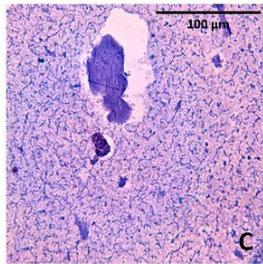
Figura 26. Estudio histológico de constructos con hDPSCs. Tinciones de hematoxilina-eosina (paneles A-E) y rojo-sirio (paneles E-J) de constructos de 3% alginato con 1% agarosa cultivado con hDPSCs a los dos días de cultivo (paneles A y F) y tras 4 y 6 semanas, en medio de cultivo de proliferación (paneles B, D, G y I) o diferenciación (paneles C, E, H y J). Se muestran imágenes de microscopía óptica (microscopio Leica DMD108), para una n de 3 experimentos.



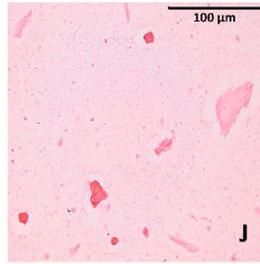
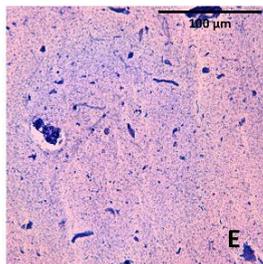
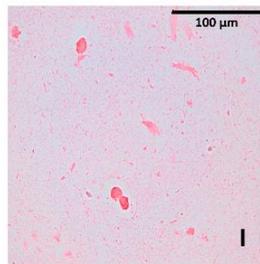
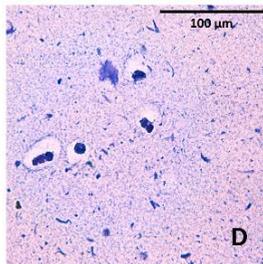
2 días



4S



6S



4.12. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina, en cultivos 3D con condrocitos

Nuestro siguiente objetivo en esta tesis fue el de evaluar si los condrocitos cultivados en los constructos de alginato-agarosa eran capaces de diferenciarse a estirpes condrales. Para ello evaluamos la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano mediante inmunofluorescencia, tal y como se detalla en la sección de metodología de esta tesis. Así mismo, evaluamos los cambios morfológicos experimentados por dichas células mediante tinción fluorescente con faloidina acoplada a rodamina. Las figuras 27 y 28 muestran imágenes representativas de los experimentos realizados en condrocitos cultivadas en medio de proliferación o diferenciación respectivamente a las 2 (2S, paneles A-D), 3 (3S, paneles E-H), 4 (4S, paneles I-L), 5 (5S, paneles M-O) y 6 semanas (6S, paneles P-S) de cultivo.

En el caso de las células cultivadas en medio de proliferación (figura 27) se aprecia un incremento en la expresión de colágeno tipo I y agregano, alcanzándose el máximo de expresión en la semana 6. La expresión de colágeno tipo II disminuye con el paso

de las semanas (figura 27, paneles C, G, K, Ñ y R). Las células estudiadas tienen una morfología lenticular (figura 27, paneles A, E, I, M y P), apareciendo agrupadas. En dichas agrupaciones se aprecian condensaciones de actina en los puntos de contacto celular, así como algunas fibras de estrés características de fenotipos mesenquimales.

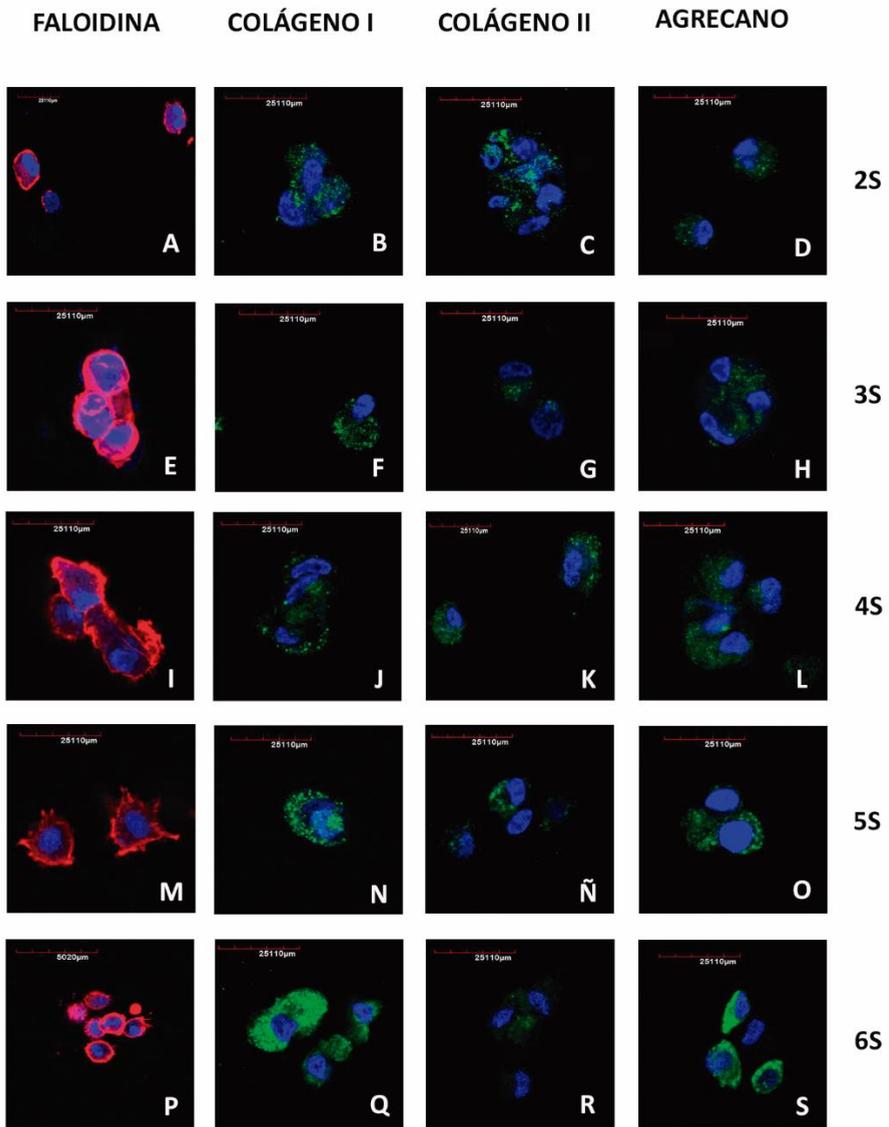


Figura 27. Estudio histomorfológico de constructos con condrocitos cultivados en medio de proliferación. Cultivo en constructos de alginato 3% y agarosa 1% con medio de proliferación durante 2-6 semanas (2S-6S). Marcaje fluorescente del citoesqueleto de actina

mediante faloidina-rodamina (paneles A, E, I, M, P). Inmunofluorescencia para colágeno tipo I (paneles B, F, J, N, Q). Inmunofluorescencia para colágeno tipo II (paneles C, G, K, Ñ, R). Inmunofluorescencia para agregcano (paneles D, H, L, O, S). DNA nuclear visualizado con DAPI. Se muestran imágenes representativas tomadas con microscopio confocal, para una n de 4 experimentos.

Con respecto a las células cultivadas en medio de diferenciación condrogénica, observamos notables diferencias en la expresión de los marcadores seleccionados. Por un lado, la expresión de colágeno tipo I es menor y disminuye sustancialmente con el tiempo de cultivo (figura 28, paneles B, F, J, N y Q). Por otra parte, la expresión de colágeno tipo II es mayor y aumenta con el tiempo de cultivo, en especial en las semanas 3-5 (figura 28, paneles C, G, K, Ñ y R). Respecto a la síntesis de agregcano, la expresión es elevada, alcanzando valores máximos en las semanas 3-4 (figura 28, paneles D, H, L, O y S). Las células estudiadas presentaron así mismo una morfología lenticular, apareciendo agrupadas formando esferoides (figura 28, paneles A, E, I, M y P). Dichas agrupaciones fueron sustancialmente más numerosas y de mayor tamaño que las observadas en las células cultivadas en medio de proliferación (figura 27). Además, en todos los casos, las fibras de actina están difuminadas, sin ser apreciables fibras de estrés.

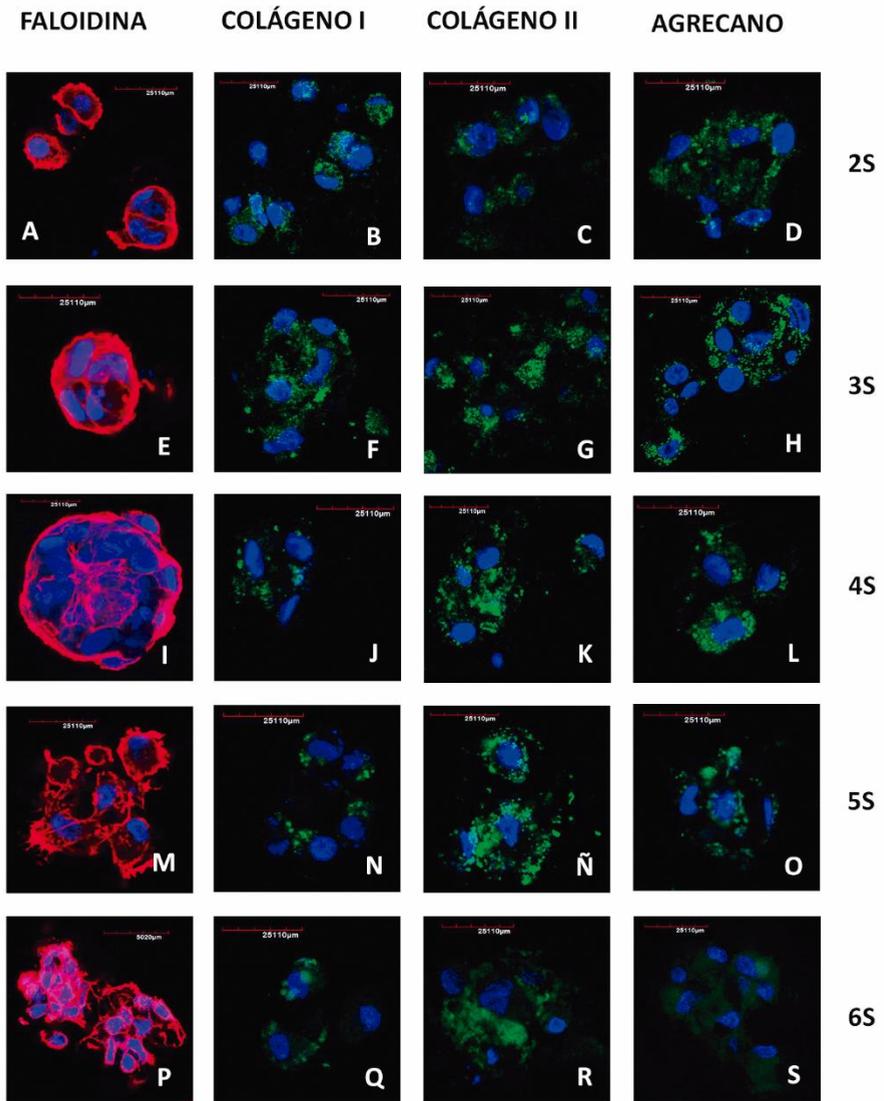


Figura 28. Estudio histomorfológico de constructos con condrocitos cultivados en medio de diferenciación. Cultivo en constructos de alginato 3% y agarosa 1% con medio de diferenciación durante 2-6 semanas (2S-6S). Marcaje fluorescente de citoesqueleto de actina mediante faloidina-rhodamina (paneles A, E, I, M y P).

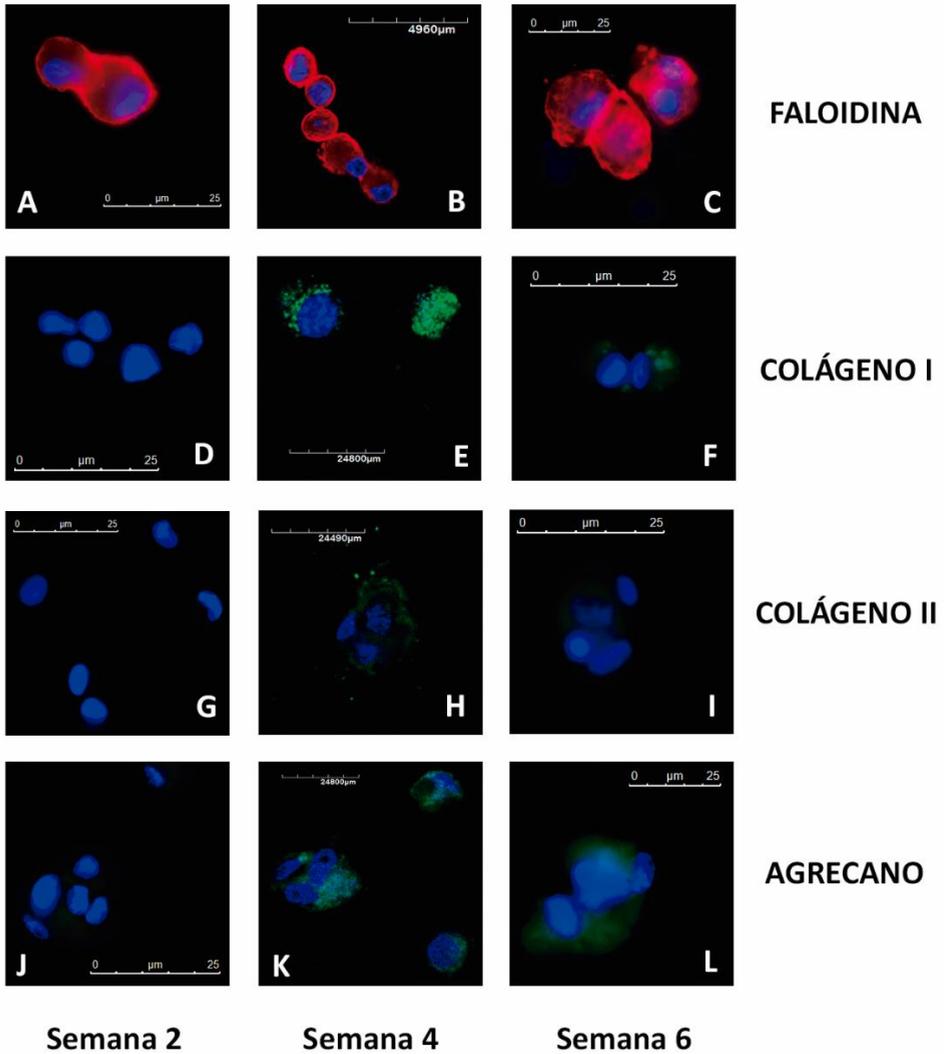
Inmunofluorescencia para colágeno tipo I (paneles B, F, J, N y Q).
Inmunofluorescencia para colágeno tipo II (paneles C, G, K, Ñ y R).
Inmunofluorescencia para agregano (paneles D, H, L, O y S). DNA nuclear visualizado con DAPI. Se muestran imágenes representativas tomadas con microscopio confocal, para una n de 4 experimentos.

4.13. Determinación de la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano mediante inmunofluorescencia y tinción fluorescente de actina en cultivos 3D con hDPSCs

De manera análoga a la descrita en el apartado anterior, se realizaron cultivos de las hDPSCs en 3 dimensiones con constructos de 3% alginato–1% agarosa, tanto en medio de proliferación (figura 29) como en medio de diferenciación (figura 30). En dichos cultivos se evaluó la expresión de colágeno tipo I, tipo II y agregano mediante inmunofluorescencia, tal y como se detalla en la sección de metodología de esta tesis. Así mismo se estudiaron los cambios morfológicos experimentados por dichas células mediante tinción fluorescente con faloidina acoplada a rodamina. Las figuras 29 y 30 muestran imágenes representativas de los experimentos realizados en hDPSCs cultivadas en medio de proliferación o diferenciación, respectivamente, a las 2 (paneles A, D, G, J), 4 (paneles B, E, H, K) y 6 (paneles C, F, I, L) semanas de cultivo.

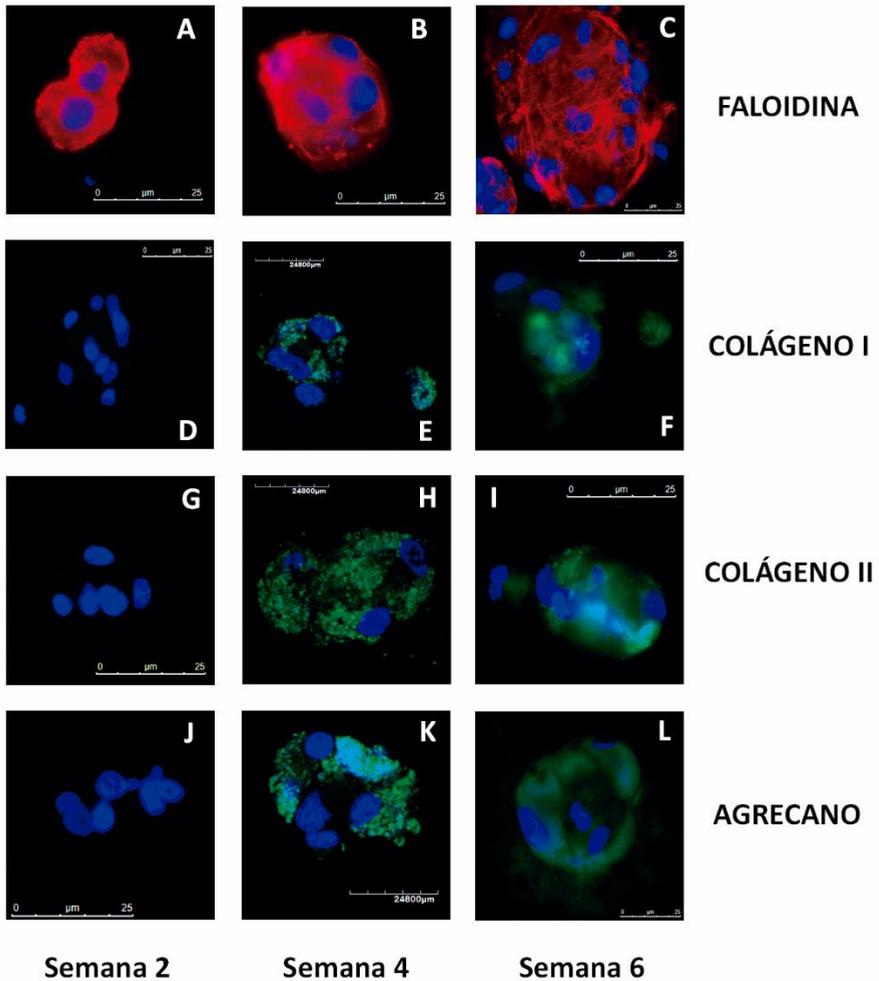
Con respecto a las hDPSCs cultivadas en medio de proliferación, detectamos expresión significativa de colágeno tipo I a partir de la semana 4, manteniéndose hasta el final del experimento (figura 29, paneles D-F). Se detectó una expresión muy leve del colágeno tipo II en la semana 4, mientras que la expresión de agregano fue ligeramente más elevada en las semanas 4-6 de experimento (figura 29, paneles J-L). Las células estudiadas tenían una morfología redondeada, apareciendo principalmente aisladas o formando grupos ocasionales de 3-4 células como máximo (figura 29, paneles A-C). No se observó la presencia de fibras de estrés, aunque los contactos celulares se evidenciaron por la acumulación de haces de actina.

Figura 29. Estudio histomorfológico de constructos con hDPSCs cultivados en medio de proliferación. Cultivo en constructos de alginato 3% y agarosa 1% con medio de proliferación durante 2-6 semanas. Marcaje fluorescente del citoesqueleto de actina mediante faloidina-rodamina (paneles A, B, C). Inmunofluorescencia para colágeno tipo I (paneles D, E, F). Inmunofluorescencia para colágeno tipo II (paneles G, H, I). Inmunofluorescencia para agregano (paneles J, K, L). Se muestran imágenes representativas realizadas con microscopio confocal, para una n de 4 experimentos.



El estudio de los cultivos de hDPSCs en medio de diferenciación demostró cambios significativos con respecto a las cultivadas en medio de proliferación. Las células se organizaron formando esferoides agregados de gran tamaño (figura 30, paneles A-C) en los que la formación de fibras de estrés era más evidente. A partir de la semana 2 de cultivo se detectaron niveles significativos de los tres marcadores estudiados, siendo mayor la intensidad fluorescente en los organoides de mayor tamaño (figura 30, paneles D-L).

Figura 30. Estudio histomorfológico de constructos con hDPSCs cultivados en medio de diferenciación. Cultivos en constructos de alginato 3% y agarosa 1% con medio de diferenciación durante 2-6 semanas. Marcaje fluorescente del citoesqueleto de actina mediante faloidina-rodamina (paneles A, B, C). Inmunofluorescencia para colágeno tipo I (paneles D, E, F). Inmunofluorescencia para colágeno tipo II (paneles G, H, I). Inmunofluorescencia para agregcano (paneles J, K, L). Se muestran imágenes representativas realizadas con microscopio confocal (paneles E, H, K) y con microscopio de fluorescencia (el resto de los paneles), para una n de 4 experimentos.



4.14. Citoarquitectura de condrocitos cultivados en hidrogeles

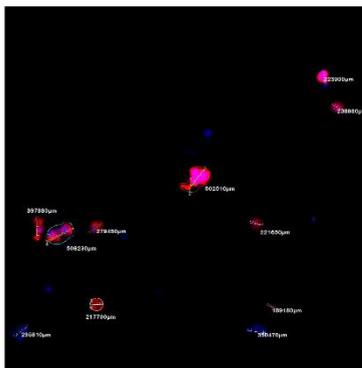
El siguiente objetivo de esta tesis fue estudiar los patrones de organización celular de los condrocitos primarios cultivados en hidrogeles de alginato-agarosa mediante aproximaciones

morfométricas. Para ello cultivamos condrocitos en dichos constructos a una densidad celular de 2×10^6 células/ml durante 6 semanas con medio de proliferación (figura 31, panel A) y medio de diferenciación (figura 31, panel B). Las células se tiñeron con el conjugado faloidina-rodamina y con DAPI. El análisis morfométrico se realizó utilizando el *software* ImageJ. En la tabla 25 se muestran los resultados obtenidos con relación a las variables analizadas, que incluyeron el número de células totales, número de esferoides (grupos de más de tres células), número de células en un esferoide, diámetro medio del esferoide, el número de células aisladas y el diámetro de las células aisladas. Se analizaron 10 campos diferentes de cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y los cambios se consideraron significativos para una $p < 0,05$.

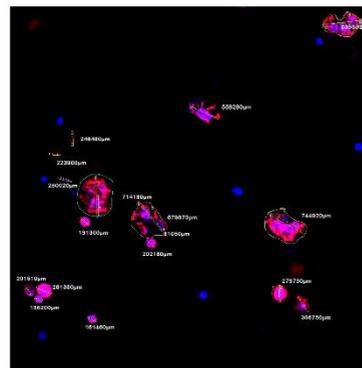
Encontramos diferencias significativas para el número de agrupaciones que existen en cada medio de cultivo, siendo más numerosas en el medio de diferenciación, así como en la cantidad de células aisladas y en el número de células totales, siendo de nuevo más numerosas en el medio de diferenciación.

Tabla 25. Análisis histomorfométrico de condrocitos cultivados en constructos de alginato 3%-agarosa 1% durante 6 semanas. MP: medio de proliferación. MD: medio de diferenciación. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y los cambios se consideraron significativos (*) para una $p < 0,05$.

| | Condrocitos con MP | Condrocitos con MD | Valor de p |
|--------------------------|--------------------|--------------------|------------|
| Nº agrupaciones | 1,00 ± 0,25 | 9,30 ± 2,47 | 0,009 * |
| Nº células en agrupación | 4,88 ± 4,88 | 6,94 ± 1,41 | 0,219 |
| Ø agrupación (µm) | 42,50 ± 30,43 | 55,76 ± 8,81 | 0,206 |
| Nº células individuales | 7,63 ± 1,92 | 15,40 ± 2,56 | 0,034 * |
| Ø célula (µm) | 23,65 ± 4,82 | 22,45 ± 3,38 | 0,545 |
| Nº total células | 13,38 ± 2,49 | 81,70 ± 19,76 | 0,008 * |



A. Proliferación



B. Diferenciación

Figura 31. Imágenes representativas del estudio morfométrico del cultivo de condrocitos en constructos de alginato 3%-agarosa 1%. El cultivo fue de 6 semanas en medio de proliferación (panel A) o en medio de diferenciación (panel B).

4.15. Citoarquitectura de hDPSCs cultivadas en hidrogeles

Finalmente, realizamos una aproximación similar a la del apartado anterior en los constructos conteniendo hDPSCs. Para ello cultivamos hDPSCs a una densidad de 2×10^6 células/ml, durante 6 semanas con medio de proliferación (figura 32, panel A) y medio de diferenciación (figura 32, panel B). Las células se tiñeron con el conjugado faloidina-rodamina y con DAPI. El análisis morfométrico se realizó utilizando el *software* ImageJ. En la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos para las determinaciones del número de células totales, número de esferoides (grupos de más de tres células), número de células en un esferoide, diámetro medio de los esferoides, número de células aisladas y el diámetro de células aisladas. Se analizaron 10 campos diferentes de cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y los cambios se consideraron significativos para una $p < 0,05$.

Tal como se observa en la tabla 26, existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en medio de proliferación y medio de diferenciación en el número de agrupaciones, existiendo más agrupaciones en los constructos cultivados en medio de proliferación que en los cultivados con medio de diferenciación. También encontramos diferencias

significativas en el diámetro de las agrupaciones, siendo más grandes en el medio de diferenciación. Se observó una gran diferencia respecto a la cantidad de células individuales, con un mayor número en el medio de proliferación, que se refleja en un mayor número de células totales.

Tabla 26. Análisis histomorfométrico de hDPSCs cultivadas en constructos de alginato 3%-agarosa 1% durante 6 semanas. MP: medio de proliferación. MD: medio de diferenciación. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student y los cambios se consideraron significativos (*) para una $p < 0,05$.

| | hDPSCs con MP | hDPSCs con MD | Valor de p |
|---------------------------------|---------------|---------------|------------|
| Nº agrupaciones | 9,13 ± 1,11 | 3,17 ± 0,98 | 0,0009 * |
| Nº células en agrupación | 4,04 ± 0,39 | 6,77 ± 3,15 | 0,1086 |
| Ø agrupación (µm) | 29,21 ± 2,51 | 50,13 ± 16,92 | 0,0449 * |
| Nº células individuales | 30,88 ± 3,502 | 7,75 ± 2,36 | 0.0001 * |
| Ø célula (µm) | 14,36 ± 0,94 | 17,63 ± 7,26 | 0,1525 |
| Nº total células | 68,38 ± 7,98 | 23,92 ± 6,10 | 0,0003 * |

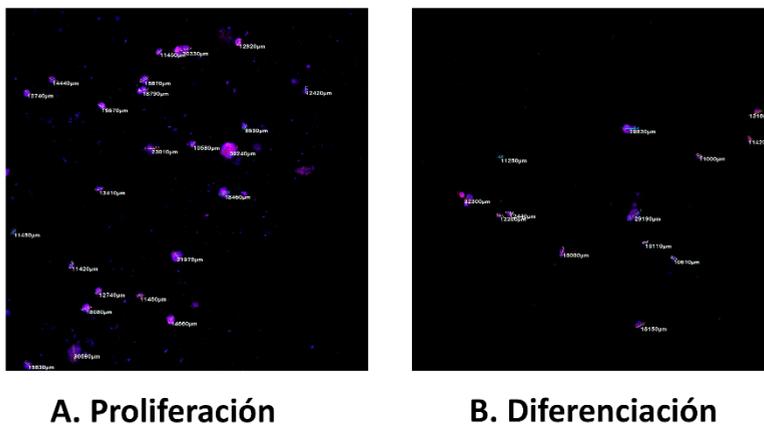


Figura 32. Imágenes representativas del estudio morfométrico del cultivo de hDPSCs en constructos de alginato 3%-agarosa 1%. El cultivo fue de 6 semanas en medio de proliferación (panel A) o en medio de diferenciación (panel B).

4.16. Expresión génica relativa de genes implicados en la diferenciación condral en cultivos tridimensionales de alginato-agarosa con condrocitos primarios y hDPSCs

Por último, estudiamos la modificación en los niveles de expresión relativa de los genes ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, HIF1A, MMP1, MMP13, MMP2, PPARGC1, RUNX1, SOX5, SOX6, SOX9, SPARC, TIMP1 y VEGFA, tanto en condrocitos primarios como en hDPSCs cultivados tridimensionalmente durante 6 semanas con medio de proliferación o diferenciación.

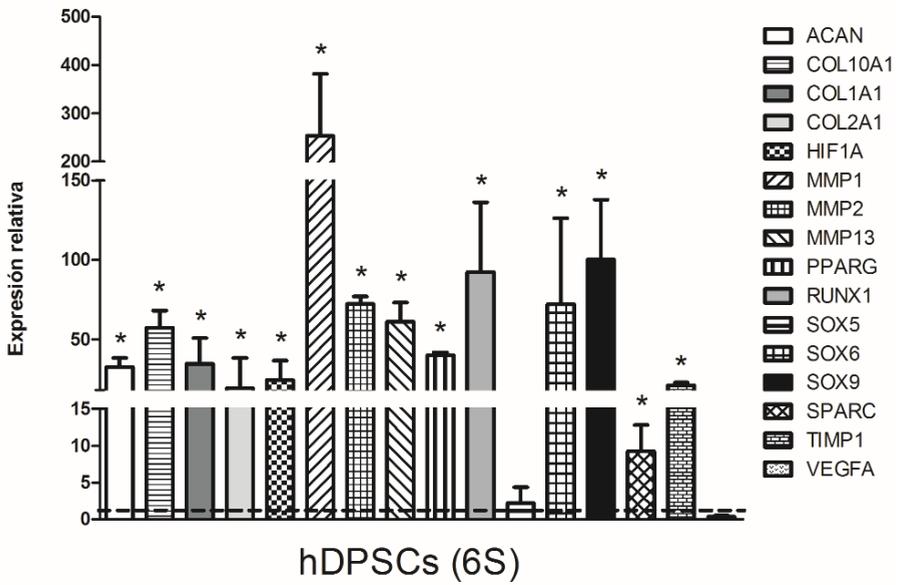
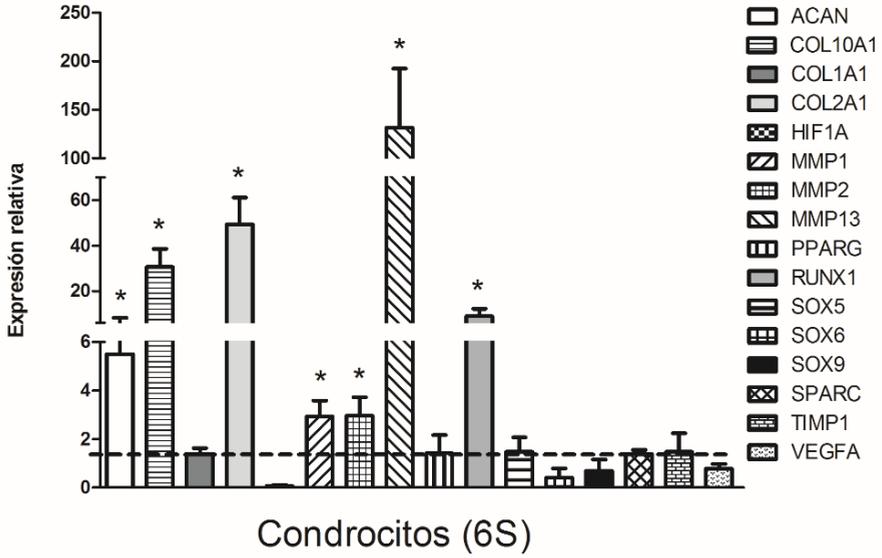
Los resultados obtenidos se resumen en la figura 33. En dicha figura se representa el incremento o decremento relativo de la expresión de dichos genes, tomando como referencia los niveles de expresión determinados en los cultivos celulares cultivados en medio de proliferación (línea de puntos). Como estándar interno (*house keeping*) se utilizó el GAPDH.

Tal y como puede apreciarse en la figura 33, para los genes relacionados con la condrogénesis (ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1) se produjo un incremento significativo para todos salvo para COL1A1, en lo que respecta a los condrocitos. En cambio para las hDPSCs el aumento fue estadísticamente significativo para todos los genes condrogénicos. Con respecto al gen HIFA1, en los condrocitos la expresión es mínima, pero para las hDPSCs el aumento de expresión relativa es estadísticamente significativo. El siguiente grupo de genes estudiados son las metaloproteinasas (MMP1, MMP2, MMP13). En este se observó un incremento de la expresión relativa en los cultivos de condrocitos, con significación estadística, para las tres metaloproteinasas, siendo más destacable el aumento de la MMP13. En lo que respecta a las hDPSCs, la expresión de los tres genes aumentó de forma estadísticamente significativa, siendo en este caso más destacable el incremento de la expresión de MMP1. No se observó variación en la expresión del gen PPARGC1 en los condrocitos. No obstante, en las hDPSCs sí que se observó

un aumento de la expresión del gen, con significación estadística. Para RUNX1 el incremento fue significativamente estadístico para ambos tipos celulares. Con respecto al conjunto de genes SOX (SOX5, SOX6 y SOX9), no se observó ninguna variación significativa de los tres genes analizados en los condrocitos, pero en el caso de las hDPSC sí que hubo un incremento estadísticamente significativo de la expresión de SOX 6 y SOX9, y un discreto aumento para la de SOX5. En cuanto al gen SPARC, no se observaron cambios respecto a su expresión relativa en condrocitos, pero sí existe aumento en la expresión, con significación estadística, en el caso de las hDPSCs. El mismo patrón se observó en relación a la expresión del gen TIMP1. Por último, no se observó ningún cambio en la expresión relativa de VEGFA en ninguno de los dos tipos celulares.

Figura 33. Resultados de la determinación de la expresión de genes seleccionados en cultivos de condrocitos y hDPSCs en 3 dimensiones.

Expresión relativa de los genes ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, HIF1A, MMP1, MMP13, MMP2, PPARGC1, RUNX1, SOX5, SOX6, SOX9, SPARC, TIMP1 y VEGFA de condrocitos y hDPSCs en alginato 3%-agarosa 1%, cultivados con medio de diferenciación condrogénica durante 6 semanas. Como referencia se tomaron los valores de expresión determinados en constructos de condrocitos y hDPSCs cultivados en medio de proliferación (línea de puntos). Estadísticamente significativo (*) para una $p < 0,05$.



5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en el diseño y fabricación de un constructo, que bien solo o en combinación con condrocitos o células madre mesenquimales, fuese de utilidad para su uso en regeneración condral, centrada principalmente en la regeneración del cartílago articular. Nuestro primer prototipo consistió en un hidrogel de alginato conteniendo condrocitos primarios aislados de cartílago articular o células madre mesenquimales obtenidas a partir de pulpa dentaria humana. Debía ser un hidrogel, puesto que precisábamos de un constructo físico que tuviese suficiente consistencia como para ser manipulado en el quirófano, pero que además se adaptase a defectos articulares, de morfología y dimensiones variables. El alginato es un biomaterial con demostradas capacidades de inducción condrogénica (81,92,162,163,171–176). Así mismo, presenta propiedades físicas y mecánicas similares a los componentes tisulares nativos, es poco inmunogénico, económico y de fácil manipulación (81).

Con respecto al método de fabricación, en una primera aproximación nos decantamos por generar esferas de alginato polimerizadas sobre una solución de cloruro cálcico como reactivo reticulador (92,109,179,180,162,171,172,174–178).

Las esferas se generaron utilizando diferentes instrumentos, concentraciones de alginato y de calcio. Con respecto a la

concentración de alginato, pudimos obtener esferas con soluciones de una concentración inferior al 1,5%, al igual que han descrito otros autores (92,162,171,176,177,181). No obstante, la morfología de dichas esferas era demasiado variable y difícil de controlar, por lo que escogimos el 3%, ya que fue la mínima concentración de alginato que permitía obtener esferas homogéneas de diámetro controlable. Las esferas de alginato fabricadas de esta manera conservaban su morfología esférica durante semanas, siempre y cuando se almacenasen a baja temperatura (4 °C) y en soluciones suplementadas con calcio. Una vez optimizado el método de manufactura de las esferas nos encontramos con el inconveniente de su estabilidad. Al incubarlas en medio de cultivo perdían mucha consistencia, hecho motivado por el secuestro de iones calcio, responsables de mantener la trama molecular, por parte de quelantes del ion presentes en los medios de cultivo o, sencillamente, por su difusión por el gradiente diferencial iónico entre el constructo y el medio de cultivo. Esta circunstancia no es problemática para el trabajo *in vitro*. Es más, para algunas técnicas en que se debe procesar posteriormente la muestra puede representar una ventaja, ya que el alginato puede influir negativamente en alguna de ellas, como por ejemplo para la extracción de ácidos nucleicos. No obstante, la pérdida de consistencia es crítica para su manipulación en el quirófano. Por ese motivo nos planteamos

generar constructos cilíndricos, con una menor superficie en contacto con el medio de cultivo y que preservasen mejor su consistencia, permitiendo una mejor manipulación del mismo. La fabricación de cilindros de alginato es anecdótica en la literatura, quedando circunscrita a unas pocas publicaciones (94,99,182).

En nuestro caso demostró una eficiencia relativa, permitiendo realizar troqueles de alginato con células en cultivo que, con mucho trabajo y gracias a la pericia de los cirujanos, pudieron ser implantados en animales a los que se había practicado una lesión osteocondral utilizando un troquel de 3mm de diámetro, como discutiremos más adelante.

El tejido cartilaginoso es una forma de tejido conjuntivo bastante celular. Se calcula que el cartílago maduro tiene una densidad celular de alrededor de $4,2 \times 10^6$ condronas/cm³. Estas células son responsables no solo de la secreción de los elementos constituyentes de la matriz condral, sino que dada su densidad colaboran directamente a las particulares características biomecánicas de dicho tejido (183). En principio, el condrocito, preferentemente aislado de biopsias del mismo paciente que precisa de un sustituto cartilaginoso, debería ser la célula óptima para ser utilizada en medicina regenerativa articular. No obstante, su difícil aislamiento, unido a su baja tasa de

proliferación (es necesario destacar que la mínima densidad de condrocitos utilizados para regeneración articular ronda los 10^7 condrocitos/ml), han impulsado el uso de células mesenquimales de diferentes orígenes con un potencial de diferenciación hacia estirpes condrales (45,80,112,118,168,184,185). La pulpa dental es una forma especial de tejido conjuntivo (tejido conjuntivo mucoso) que aloja una población muy especial de células, las células madre derivadas de pulpa dental, hDPSCs (137,138,141,166,168,184,186,187). Dichas células, con demostrada capacidad de diferenciación a condrocitos, exhiben una mayor tasa proliferativa que otras células mesenquimales (107,184,188–190). Además, se pueden aislar, al menos en teoría, a partir de piezas dentarias del propio sujeto, de manera que constituyen una población de células con elevada tasa proliferativa, origen autólogo y marcado potencial de diferenciación a condroblastos. Por ese motivo, en este trabajo hemos utilizado tanto condrocitos primarios como hDPSCs. Con respecto a las hDPSCs aisladas, presentaron un perfil de expresión de marcadores consistente y acorde a la literatura, siendo positivas para CD29, CD146, CD44 y CD105 y negativas para CD31 y CD45 (52,138,168,187,188).

Con respecto al marcador STRO-1, mostró una positividad variable, lo que es coherente con las evidencias publicadas por

otros investigadores (191–193), que relacionan además dicha positividad con la capacidad de diferenciarse a diferentes estirpes esqueléticas y odontoblásticas.

Una vez aisladas y cultivadas las células, nos planteamos demostrar su capacidad de diferenciación a células cartilaginosas *in vitro*. Para ello utilizamos un medio de diferenciación estándar, ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación (48,117). Tanto los condrocitos como las hDPSCs fueron cultivadas en dichos medios de cultivo en entornos 2D, en presencia de medio de diferenciación o de proliferación. Ambos tipos celulares expresaron cantidades significativas de colágeno tipo II y agregano, como se demuestra en los experimentos de inmunofluorescencia y de biología molecular. Estos cambios se correlacionaron con una inhibición en la expresión de colágenos tipo I, especialmente expresado en las hDPSCs cultivadas en medio de proliferación, así como de marcados cambios morfológicos, consistentes en la adquisición de morfologías redondeadas y a la menor expresión de fibras de estrés de actina, analizadas mediante faloidina acoplada a rodamina.

Los cambios observados a nivel proteico se correlacionaron en gran medida con los observados mediante biología molecular. Con la finalidad de caracterizar mejor la diferenciación celular

inducida, se analizó la expresión de ACAN, COL10A1, COL1A1, COL2A1, RUNX1, SOX9 y VEGFA mediante *real time RT-PCR*. En el caso de los condrocitos primarios, detectamos un aumento significativo de la expresión relativa de COL10A1 y COL2A1 siguiendo un patrón similar al descrito por Caron et al. (172). El COL10A1 es un marcador que tradicionalmente se asocia a hipertrofia del cartílago; no obstante, ni la morfología ni el patrón de expresión del resto de marcadores, incluyendo la no inducción de VEGF, justifican asociar la hipertrofia a nuestros cultivos. Otros investigadores han demostrado una elevada expresión de COL10A1 en células mesenquimales diferenciadas a condroblastos (194). Asocian dicha expresión a la hipermetilación del promotor del gen previa al proceso de diferenciación, y lo atribuyen a una “memoria” celular previa al proceso de diferenciación. De hecho, la expresión relativa de dicho marcador disminuye con el tiempo, lo que podría indicar cierto grado de maduración del cultivo. Con respecto al COL2A1, codifica para la cadena proteica mayoritaria de las fibras de colágeno tipo II, siendo, junto con el ACAN, el marcador característico de la diferenciación condral.

Los patrones de expresión para las hDPSCs, en lo referente a los genes de proteínas relacionadas con la diferenciación condral, fueron similares a los observados para condrocitos primarios, observándose una inhibición en la expresión de COL1A1 y una

inducción de COL2A1 y ACAN. En relación a los genes RUNX1, SOX9 y VEGFA solo observamos un discreto incremento en la semana 4 para VEGFA, lo que podría deberse a que dichas células, por ser MSCs, tienen un efecto reparativo de los tejidos al secretar factores paracrinicos, como el TGF- β , el VEGF y otras moléculas bioactivas que modulan respuestas reparativas (113), si bien los experimentos realizados en esta tesis no han permitido profundizar en esta cuestión.

Una vez optimizados los protocolos de fabricación del hidrogel y los de cultivo celular, nos planteamos estudiar el potencial regenerador de los constructos fabricados en un modelo de experimentación animal desarrollado en rodilla de conejos de la raza *New Zealand*, ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación (48,117,195). Para ello fabricamos constructos cilíndricos de alginato al 3% en combinación con condrocitos primarios o hDPSCs y los implantamos en defectos osteocondrales practicados en rodillas de conejos, tal y como se describe en la sección de material y métodos de esta tesis. Los resultados obtenidos, y que son parte de esta tesis, fueron publicados en la revista *Stem Cells Investigation* (98). Dichos resultados demostraron la utilidad del constructo para la regeneración articular. En todos los casos el defecto osteocondral fue cubierto, si bien es cierto que en los implantes donde solo se introdujo alginato 3% (sin células) la capa que

cubre el defecto fue mucho más fina que en los otros dos casos, con una apariencia de fibrocartílago, y además mostró una pérdida significativa del cartílago articular, con un hundimiento apreciable de la superficie articular, de manera similar a lo reportado por otros investigadores que han utilizado diferentes hidrogeles sin células asociadas (196). Los constructos conteniendo tanto condrocitos como hDPSCs indujeron una apreciable regeneración del cartílago articular, con formación de neotejido, proliferación de condronas y generación de un tejido cartilaginoso organizado, con una buena ordenación de las fibras de colágeno tipo II y ausencia de tejido fibrótico en el foco de la lesión. Los resultados obtenidos para las hDPSCs fueron sorprendentemente mejores que los obtenidos para condrocitos primarios, al menos con relación a los parámetros estudiados. Esto podría estar relacionado con el marcado carácter antiinflamatorio de estas células, que podría suponer una ventaja adicional a su ya demostrado potencial condrogénico, si bien es necesario realizar más experimentos a fin de ahondar en estas cuestiones (196–199).

Aunque los resultados obtenidos con el modelo de experimentación animal fueron prometedores, el constructo utilizado demostró ser poco práctico para su uso *in vivo*. Apenas tenía consistencia y era muy difícil de manipular. Con la idea de mejorar la consistencia del constructo, decidimos generar un

copolímero de alginato con agarosa. La agarosa es un polímero ampliamente utilizado en ingeniería tisular como soporte condrogénico, de manera aislada (6,81,119,169,200–203,82–85,87,96,107,115) o copolimerizada con otros polímeros, destacando su uso combinado con la fibrina, ampliamente utilizado por el grupo de investigación del profesor Campos de la Universidad de Granada (88,90,209–212,103–105,204–208). Precisamente los buenos resultados reportados por dicho grupo de investigación, nos estimularon para utilizar la agarosa combinada con alginato a fin de mejorar las propiedades de nuestro hidrogel, siendo necesario recalcar que apenas existen referencias bibliográficas de trabajos en que se utilice dicha combinación de polímeros (81,213).

Las agarosas convencionales requieren de temperaturas cercanas a los 40 grados Celsius para su solidificación, lo que dificultó su uso combinado con células. Por ese motivo nos decidimos a emplear una agarosa de bajo punto de fusión, que a 37°C continúa siendo fluida y solidifica a unos 17°C (90,204,205,207). La copolimerización del alginato con la agarosa resultó sencilla, obteniéndose copolímeros homogéneos y con propiedades biomecánicas muy mejoradas, como se demuestra en los estudios de reología. El módulo elástico para los hidrogeles de agarosa es similar a los reportados por Heo et al. (214) en cuanto al incremento observado al

aumentar la concentración de dicho polímero, si bien es cierto que existe una discrepancia en la cuantificación del mismo, probablemente debida al uso de agarosas diferentes. En los hidrogeles combinados con alginato, se apreció un descenso de G' y, por tanto, el material fue menos rígido que la agarosa 1%. El alginato afectó de forma negativa a la resistencia del material, haciéndolo menos resistente, algo previsible puesto que el alginato posee una muy baja consistencia. La combinación de ambos polímeros permitió obtener un hidrogel con un módulo elástico de 3754,26Pa, que, aunque dista mucho del módulo del cartílago (0,45-0,8 MPa (215) , era suficiente para permitir una adecuada manipulación en el quirófano. Estos valores se alcanzaron con copolímeros de alginato al 3% y agarosa al 1%. La decisión de no aumentar más la concentración de agarosa se debió a que no se quiso afectar negativamente a las propiedades del alginato como inductor condrogénico.

Aunque la citotoxicidad de ambos hidrogeles había sido reportada como negativa o baja por algunos autores (216–219), decidimos evaluar *in vitro* dicho parámetro. Sorprendentemente, detectamos que todas las formulaciones utilizadas exhibían cierta citotoxicidad que, si bien no comprometía la proliferación ni diferenciación celular, como se demuestra en los estudios *in vitro*, era necesario analizar. Como ya hemos comentado, durante el cultivo celular se produce una

despolimerización del alginato como consecuencia de una pérdida de iones calcio hacia el medio de cultivo. Es posible que dicha liberación de calcio estuviese generando los efectos citotóxicos detectados. Por ese motivo realizamos un estudio de citotoxicidad, incorporando calcio, en concentraciones crecientes, al medio de cultivo. Los resultados obtenidos indican que las concentraciones más altas de calcio inducen toxicidad celular, en especial a las hDPSCs, siendo los efectos mínimos sobre los condrocitos. El calcio es un importante mediador bioquímico que media mecanismos intracelulares relacionados, por ejemplo, con la contracción, la secreción de vesículas o el reordenamientos del citoesqueleto. Así mismo, es un segundo mensajero involucrado tanto en procesos inflamatorios como apoptóticos. Los efectos del calcio están mediados por una población heterogénea de receptores de membrana, como los receptores sensibles al calcio (CASR), relacionados con funciones tan variadas como la transmisión del impulso contráctil en fibras musculares, la diferenciación y proliferación celular, etc. La población de dichos receptores y de otros relacionados con los flujos iónicos es altamente heterogénea, lo que podría explicar el efecto citotóxico detectado. No obstante, es importante remarcar que este efecto es transitorio, puesto que no afecta a la proliferación ni diferenciación discutidas más adelante, lo que no quiere decir que no deba ser tenido en cuenta, en especial en

relación al papel del calcio, no como inductor de la apoptosis, sino como posible agente regulador de funciones en relación con la diferenciación celular, que sí podrían tener un efecto que debe ser considerado en nuestro modelo. Este efecto está siendo estudiado en estos momentos por nuestro grupo de investigación (220–223).

Llegados a este punto, nos planteamos estudiar el potencial condrogénico del nuevo hidrogel generado. Para ello cultivamos condrocitos humanos articulares y hDPSCs en medio de inducción condrogénica, utilizando células cultivadas en medio de proliferación como control de referencia. Los resultados obtenidos indican que, ya en tiempos iniciales de cultivo, las células cultivadas en nuestros hidrogeles experimentan ciertos cambios fenotípicos. Por una parte, adquieren una morfología redondeada. Esto se debe a la incapacidad de las células para interactuar con el hidrogel, puesto que ni el alginato ni la agarosa presentan dominios RGD ni de unión a integrinas. Esta ausencia de estímulos en la superficie celular lleva a las células a reorganizar su citoesqueleto, tal y como se evidencia en los experimentos de fluorescencia (163,171). Este estímulo físico es más patente en los condrocitos y se acentúa notablemente en los constructos cultivados en medio de cultivo de inducción condrogénica, indicando la clara relación entre forma y función que impera en todos los sistemas biológicos. Por otra parte, las

células cultivadas en medio de diferenciación tienden a aparecer agrupadas, formando lo que hemos denominado esferoides, y que probablemente son consecuencia de la proliferación celular. Las células proliferan y permanecen agrupadas dada su incapacidad para migrar utilizando la matriz en la que están cultivadas. Así, de manera semejante a lo que ocurre en el cartílago nativo, aparecen formaciones similares a condronas. Estos esferoides son más grandes y abundantes en las muestras en las que se han incorporado condrocitos al hidrogel y que además han sido cultivadas en medio de diferenciación. Son más pequeños en las muestras donde no se emplea el medio de inducción, apareciendo en proporción células mayoritariamente aisladas.

En relación a la formación de esferoides, y en especial en el caso de las muestras cultivadas con medio de inducción condrogénica, observamos depósitos de colágeno evidenciados por la tinción de rojo sirio (163,182).

La formación de esferoides se relaciona directamente con la expresión de colágeno tipo II y agregano, así como por un descenso en la expresión de colágeno tipo I, tal y como evidencian los experimentos de inmunofluorescencia. Así, podemos afirmar que las células contenidas en los mismos no solo proliferan más, sino que además secretan mayor cantidad

de matriz rica en proteínas características de la matriz condral. En el caso de los condrocitos, estos efectos son significativos incluso en los grupos en los que no se ha utilizado medio de diferenciación, de manera que el estímulo físico consistente en la imposibilidad de interactuar con un sustrato parece suficiente para iniciar el proceso de diferenciación en estas células (172,224,225). No ocurre así en el caso de las hDPSCs, donde el uso de medios específicos resulta imperativo (139,140,142,166,188,226).

La caracterización morfométrica de los esferoides, realizada mediante microscopía de fluorescencia, demostró un patrón diferencial en función del tipo celular estudiado. En el caso de los condrocitos, los datos demuestran una mayor cantidad y tamaño de los esferoides en las muestras cultivadas con medio de diferenciación condral. Este patrón diferencial es coherente con la estructura histológica del cartílago en proceso madurativo. El cartílago inmaduro contiene abundantes células aisladas que posteriormente se organizan estableciéndose grupos isogénicos responsables del crecimiento de la matriz condral (5). Del mismo modo, en nuestros cultivos observamos que, con el tiempo, como consecuencia de la adición de factores de diferenciación en el medio de cultivo, aparecen gradualmente esferoides, que alcanzan su tamaño máximo a las 6 semanas de cultivo. No ocurre así con las hDPSCs. En estas células, los

contajes muestran que hay un mayor número de esferoides en los grupos cultivados con medio de proliferación. El efecto del medio de inducción se refleja en el tamaño de los esferoides, que aumenta gradualmente como consecuencia de la inducción del fenotipo condral. Esto probablemente esté en relación con la elevada tasa de proliferación de estas células (mayor en las muestras cultivados con medio de proliferación) y en la mayor tasa de deposición de matriz (más abundante en los grupos cultivados con medio de diferenciación).

Todos estos cambios observados a nivel proteico se correlacionan con los resultados de los estudios de expresión génica mediante técnicas de biología molecular. Los patrones de expresión de los principales genes codificantes para cadenas polipeptídicas del colágeno tipo I (COL1A1) y colágeno tipo II (COL2A1), y para el agregano (ACAN) son similares a los encontrados en los estudios microscópicos.

En lo referente al colágeno tipo X, de nuevo observamos un incremento significativo en la expresión del gen COL10A1, principal componente de dicho colágeno. La explicación es similar a la ya comentada para los cultivos bidimensionales, y probablemente se deba a la existencia de islas de metilación que de alguna manera estén actuando como mecanismo de memoria molecular. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios

para verificar si esto es así, o si realmente las células acaban derivando a un fenotipo hipertrófico, que podría ocasionar un fracaso del constructo a largo plazo. La ausencia de estudios en este sentido obliga a diseñar estrategias experimentales para resolver esta cuestión, que desde nuestro punto de vista es de importancia.

Los genes de la familia RUNX constituyen elementos clave en la diferenciación, determinando el *bypass* hacia la diferenciación a estirpes condrogénicas u osteoblásticas (227). Los datos encontrados en cuanto a la inducción de RUNX1, considerando además los perfiles de expresión de los genes SOX estudiados, apoyan de forma coherente las observaciones microscópicas, y son indicativos de una posible diferenciación hacia fenotipos condrales, relacionada por ejemplo con la inducción de COL2A1 o de ACAN (10,182,227).

Con lo que respecta al gen HIF1A, que codifica un factor inducible por hipoxia que regula la transcripción de proteínas de resistencia a la misma, hemos detectado un patrón de expresión diferencial entre condrocitos y hDPSCs, de manera que únicamente detectamos una inducción significativa en la expresión de dicho factor en el caso de las células pulpares. Quizás esta situación se deba a que el condrocito es una célula adaptada y especializada a realizar sus funciones en entornos

altamente hipóxicos. De hecho, un sistema para diferenciar dichas células consiste en cultivarlas en *pellets* donde la difusión parcial de oxígeno es mínima (124,228–230). No ocurre así con las hDPSCs, que residen en la proximidad de capilares sanguíneos, bajo condiciones óptimas en relación a la presión parcial de oxígeno (5), y quizá sea por este motivo que en presencia de un ambiente hipóxico, dichas células transcriban proteínas de estrés que les permitan adaptarse a esta nueva situación.

Las metaloproteinasas constituyen una familia de proteínas clave en el remodelado de la matriz extracelular. Hemos detectado un claro incremento de estas proteínas (en especial de la MMP13 en el caso de los condrocitos y de MMP1 en el caso de las hDPSCs). Es necesario tener en cuenta que nuestro constructo puede entenderse como un escenario donde está generándose un tejido cartilaginoso a partir de un molde previo que debe ser degradado y sustituido por matriz similar a la condral. En este aspecto la secreción de proteínas relacionadas con dicho remodelado es clave, de manera que no solo estaríamos observando la síntesis de componentes de una matriz condral neoformada, sino además la remodelación de esta matriz a fin de generar una matriz madura. Las evidencias encontradas, en especial en relación a la MMP13, se correlacionan con los datos reportados por Brand et al (93).

Ahora bien, ¿qué papel desempeña específicamente cada una de las metaloproteinasas estudiadas? Es difícil responder a estas cuestiones dada la ausencia de trabajos publicados que aborden esta cuestión. Serían necesarios experimentos de silenciamiento génico dirigidos hacia cada una de las mismas a fin de determinar el rol exacto que cada una de ellas cumple en este sistema.

La calcificación de los tejidos esqueléticos depende de muchos factores. Entre ellos podemos destacar la proteína codificada por el gen SPARC, que está directamente relacionada con la calcificación del colágeno en el proceso de mineralización del tejido óseo (231). Nosotros no hemos encontrado ningún cambio en la expresión de dicho gen en los cultivos de condrocitos, esperable si acaso en el supuesto de que se desarrollase un fenotipo hipertrófico. Por lo que respecta a las hDPSCs, sí que hemos detectado un incremento en la expresión de dicho gen. Este incremento, relacionado además con la expresión del factor inhibidor de metaloproteinasas (TIMP) y el VEGF, podría indicar una deriva de las células hacia fenotipos hipertróficos en los grupos experimentales en los que se han incluido estas células. Así, aunque no tenemos evidencias morfológicas del desarrollo de dicho fenotipo, es necesario tener presente este dato, de especial relevancia para interpretar los experimentos *in vivo* planificados por nuestro grupo de

investigación, y que forman parte de otros trabajos experimentales en desarrollo.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo hemos diseñado un constructo que, dadas sus características biomecánicas, biocompatibilidad y capacidad de inducción condrogénica demostradas *in vitro*, podría ser de utilidad para la regeneración del cartílago articular. A continuación, procedemos a enumerar las principales conclusiones obtenidas en este trabajo en función de los objetivos planteados:

1. Se han aislado células madre de pulpa dental humanas y se han caracterizado. Estas células expresan marcadores propios de células madre mesenquimales (CD105, CD146, CD29, CD44 y STRO-1), y no expresan los marcadores CD31 y CD45, propios de otros linajes.
2. Hemos sido capaces de obtener y cultivar condrocitos humanos a partir de cartílago articular de donantes, los cuales proliferan y son capaces de diferenciarse, expresando marcadores típicos de cartílago.
3. Tanto los condrocitos aislados como las hDPSCs han demostrado su capacidad de diferenciación a estirpes condrales, ateniéndonos a los resultados obtenidos en los estudios de expresión génica y proteica y a las características morfológicas desarrolladas, propias de esta estirpe celular.

4. Respecto a los constructos de alginato, únicamente los manufacturados en forma cilíndrica y a la concentración del 3% han demostrado ser útiles para su uso *in vivo*.
5. Tanto los condrocitos como las hDPSCs cultivados en constructos cilíndricos de alginato al 3% han desarrollado una morfología y citotectura características de condrocitos maduros.
6. Los constructos de alginato al 3% cilíndricos asociados con condrocitos y hDPSCs han demostrado su capacidad de regeneración del cartílago en un modelo *in vivo*, desarrollado en rodilla de conejo. De los dos tipos celulares empleados, las hDPSCs han demostrado un mayor potencial regenerativo, quizás debido a su efecto antiinflamatorio.
7. Los copolímeros alginato-agarosa manufacturados han demostrado mejores propiedades biomecánicas que los hidrogeles de alginato, alcanzando un módulo elástico de 3754,3 Pa. Aunque hemos detectado cierta citotoxicidad del constructo en tiempos de cultivo cortos, dicha toxicidad no ha resultado significativa en lo relativo a su efecto sobre la proliferación y la diferenciación de las células cultivadas en los mismos.
8. Los copolímeros de alginato-agarosa han demostrado su capacidad de promover la diferenciación condrogénica

de las células cultivadas en ellos. De los dos tipos celulares ensayados, los condrocitos han mostrado un mejor perfil de diferenciación condral, evidenciado por los cambios fenotípicos, por la organización de las células cultivadas en el constructo y por la expresión génica y proteica de los diversos marcadores condrales medidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Welsch U, Sobotta J. **Histología**. Ed. Médica Panamericana; 2008.
2. Geneser F. **Histología**. 3º Edición. Panamericana, editor. 2000.
3. Tortora G, Derrickson B. **Principios de anatomía y fisiología**. 2013.
4. RL D, RL D. **Gray, atlas de anatomía para estudiantes**.
5. Ross MH, Pawlina W. **Histología: Texto y Atlas**. Ed. Médica Panamericana; 2007.
6. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. **Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix**. *J Orthop Res*. 1992;10(6):745–58.
7. Zhou S, Cui Z, Urban JPG. **Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: A modeling study**. *Arthritis Rheum*. 2004;50(12):3915–24.
8. Zurriaga Carda J. **Soportes tridimensionales biodegradables basados en micropartículas para la regeneración del cartílago articular**. Universidad de Valencia; 2017.
9. Eames BF, De La Fuente L, Helms JA. **Molecular ontogeny of the skeleton**. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2003;69(2):93–101.
10. Lefebvre V, Li P, Crombrughe B de. **A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis**

- and cooperatively activate the type II collagen gene.** *EMBO J.* 1998;17(19):5718–33.
11. Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. **L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway.** *Osteoarthr Cartil.* 2001;9(SUPPL. A):S69–75.
 12. Weiss C, Rosenberg L, Helfet AJ. **An Ultrastructural Study of Normal Young Adult Human Articular Cartilage.** *J Bone Jt Surg.* 1968;50(4):663–74.
 13. Hunziker EB. **Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.** *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(6):432–63.
 14. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. **Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints.** *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1659–64.
 15. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. **The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(7):437–41.
 16. Hunter Hsu; Ryan M. Siwec. **Knee Osteoarthritis - StatPearls - NCBI Bookshelf.** 2020.
 17. Brandt KD. **Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease.** *Ann Rheum Dis.* 2006;65(10):1261–4.
 18. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper

- C, Goldring MB, et al. **Osteoarthritis**. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(1):16072.
19. Prieto-Alhambra D, Arden N, Hunter D. **Osteoarthritis: the facts**. 2nd ed. Oxford; 2014.
 20. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. **Osteoarthritis: the genesis of pain**. *Rheumatology*. 2018;57(suppl_4):iv43–50.
 21. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. **Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis**. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):412–20.
 22. Afzali T, Fangel MV, Vestergaard AS, Rathleff MS, Ehlers LH, Jensen MB. **Cost-effectiveness of treatments for non-osteoarthritic knee pain conditions: A systematic review**. Lhachimi SK, editor. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209240.
 23. Hsia AW, Emami AJ, Tarke FD, Cunningham HC, Tjandra PM, Wong A, et al. **Osteophytes and fracture calluses share developmental milestones and are diminished by unloading**. *J Orthop Res*. 2017;36(2):699–710.
 24. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. **Osteoarthritis**. *Lancet*. 2015;386(9991):376–87.
 25. Manlapaz DG, Sole G, Jayakaran P, Chapple CM. **Risk Factors for Falls in Adults with Knee Osteoarthritis: A Systematic Review**. *PM&R*. 2019;11(7):745–57.
 26. Hulshof CTJ, Colosio C, Daams JG, Ivanov ID, Prakash KC, Kuijjer PPFM, et al. **WHO/ILO work-related burden of disease and**

- injury: Protocol for systematic reviews of exposure to occupational ergonomic risk factors and of the effect of exposure to occupational ergonomic risk factors on osteoarthritis of hip or knee and selected other . *Environ Int.* 2019;125:554–66.**
27. Cameron ML, Briggs KK, Steadman JR. **Reproducibility and Reliability of the Outerbridge Classification for Grading Chondral Lesions of the Knee Arthroscopically.** *Am J Sports Med.* 2003;31(1):83–6.
 28. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nestic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. **A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II.** *Am J Sports Med.* 2010;38(5):880–90.
 29. Pritzker K, Gay S, Jimenez S, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell PA, et al. **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.** *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(1):13–29.
 30. Vaquero J, Forriol F. **Knee chondral injuries: Clinical treatment strategies and experimental models.** *Injury.* 2012;43(6):694–705.
 31. Alford JW, Cole BJ. **Cartilage Restoration, Part 2: Techniques, Outcomes, and Future Directions.** *Am J Sports Med.* 2005;33(3):443–60.
 32. Engkvist O, Wilander E. **Formation of Cartilage from RIB Perichondrium Grafted to an Articular Defect in the Femur Condyle of the Rabbit.** *Scand J Plast Reconstr Surg.*

- 1979;13(3):371–6.
33. Ohlsbn L. **Cartilage formation from free perichondrial grafts: an experimental study in rabbits.** Vol. 29, *British Jwrnal ofPlastic Surgery.* 1976.
 34. Skoog T, Ohlséan L, Sohn SA. **Perichondrial Potential for Cartilagenous Regeneration.** *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1972;6(2):123–5.
 35. Cohen J, Lacroix P. **Bone and cartilage formation by periosteum: assay of experimental autogenous grafts.** *J Bone Jt Surg Am.* 1955;37-A(4):717–30.
 36. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. **Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo.** *J Orthop Res.* 1991;9(4):465–76.
 37. Hickey M, Ohta I, Shigetomi M, Hurley J, Kuwata N, O'Brien B. **Vascularized Heterotopic Osteochondral Allografts in a Rat Model Following Long-Term Immunosuppression.** *J Reconstr Microsurg.* 1994;10(04):255–60.
 38. Shigetomi M, Hickey M, Hurley J, Riccio M, Niazi Z, Ohta I. **Orthotopic Vascularized Osteochondral Allografts in an Immunosuppressed Rat Model.** *J Reconstr Microsurg.* 1996;12(02):113–9.
 39. Stevenson S, Dannucci G, Sharkey N, Pool R. **The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs.** *J Bone Jt Surg Am.*

- 1989;71(9):1297–307.
40. Thmford W, Springfield D, Mankin H. **Fresh and frozen articular cartilage allografts.** *Orthopedics.* 1992;15(10):1183–8.
 41. McDermott A, Langer F, Pritzker K, Gross A. **Fresh small-fragment osteochondral allografts. Long-term follow-up study on first 100 cases.** *Clin Orthop Relat Res.* 1985;197:96–102.
 42. Mahomed M, Beaver R, Gross A. **The long-term success of fresh, small fragment osteochondral allografts used for intraarticular post-traumatic defects in the knee joint.** *Orthopedics.* 1992;15(10):1191–9.
 43. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges.** *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;2(1):403–30.
 44. **ICRS - International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society.**
 45. Sancho-Tello M, Milián L, Mata Roig M, Martín de Llano JJ, Carda C. **Cartilage Regeneration and Tissue Engineering.** In: *Advances in Biomechanics and Tissue Regeneration.* Elsevier; 2019. p. 361–78.
 46. Johnstone B, Alini M, Cucchiarini M, Dodge G, Eglin D, Guilak F, et al. **Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art.** *Eur Cells Mater.* 2013;25:248–67.
 47. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Martino A, Marcacci M. **Scaffold-Based Repair for Cartilage Healing: A Systematic Review and**

- Technical Note.** *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2013;29(1):174–86.
48. Sancho-Tello M, Forriol F, Gastaldi P, Ruiz-Saurí A, Martín de Llano JJ, Novella-Maestre E, et al. **Time Evolution of in Vivo Articular Cartilage Repair Induced by Bone Marrow Stimulation and Scaffold Implantation in Rabbits.** *Int J Artif Organs.* 2015;38(4):210–23.
49. Filardo G, Drobnic M, Perdisa F, Kon E, Hribernik M, Marcacci M. **Fibrin glue improves osteochondral scaffold fixation: study on the human cadaveric knee exposed to continuous passive motion.** *Osteoarthr Cartil.* 2014;22(4):557–65.
50. Drobnic M, Perdisa F, Kon E, Cefalì F, Marcacci M, Filardo G. **Implant strategy affects scaffold stability and integrity in cartilage treatment.** *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2018;26(9):2774–83.
51. Pradas MM, Vicent MJ. **Polymers in Regenerative Medicine.** Pradas MM, Vicent MJ, editors. *Polymers in Regenerative Medicine: Biomedical Applications from Nano- to Macro-Structures.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2014. 1–393 p.
52. Gugjoo M, Amarpal, Sharma G, Aithal H, Kinjavdekar P. **Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds.** *Indian J Med Res.* 2016;144(3):339.
53. Zhang L, Webster TJ. **Nanotechnology and nanomaterials:**

- Promises for improved tissue regeneration.** *Nano Today*. 2009;4(1):66–80.
54. Li W-J, Jiang YJ, Tuan RS. **Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies.** *Tissue Eng Part A*. 2008;14(5):639–48.
 55. Yang X, Lu Z, Wu H, Li W, Zheng L, Zhao J. **Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering.** *Mater Sci Eng C*. 2018;83:195–201.
 56. Li L, Yu F, Zheng L, Wang R, Yan W, Wang Z, et al. **Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application.** *J Orthop Transl*. 2019;17:26–41.
 57. Lee K, Chen Y, Li X, Wang Y, Kawazoe N, Yang Y, et al. **Solution viscosity regulates chondrocyte proliferation and phenotype during 3D culture.** *J Mater Chem B*. 2019;7(48):7713–22.
 58. Li X, Chen Y, Kawazoe N, Chen G. **Influence of microporous gelatin hydrogels on chondrocyte functions.** *J Mater Chem B*. 2017;5(29):5753–62.
 59. Brändstedt S, Rank F, Olson S. **Wound Healing and Formation of Granulation Tissue in Normal and Defibrinogenated Rabbits.** *Eur Surg Res*. 1980;12(1):12–21.
 60. Hinsbergn VWM, Collen A, Koolwijk K P. **Role of Fibrin Matrix in Angiogenesis.** *Ann N Y Acad Sci*. 2006;936(1):426–37.
 61. Whatley JS, Dejardin LM, Arnoczky SP. **The Effect of an Exogenous Fibrin Clot on the Regeneration of the Triangular**

- Fibrocartilage Complex: An In Vivo Experimental Study in Dogs.** *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2000;16(2):127–36.
62. Paletta GA, Arnoczky SP, Warren RF. **The repair of osteochondral defects using an exogenous fibrin clot.** *Am J Sports Med.* 1992;20(6):725–31.
63. Haisch A, Loch A, David J, Pruß A, Hansen R, Sittinger M. **Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering.** *Med Biol Eng Comput.* 2000;38(6):686–9.
64. Kawabe N, Yoshinao M. **The repair of full-thickness articular cartilage defects. Immune responses to reparative tissue formed by allogeneic growth plate chondrocyte implants.** *Clin Orthop Relat Res.* 1991;268:279–93.
65. Hansen MK, Selnes A, Simonsen E, Sørensen KM, Pedersen GT. **[Polyglycolic acid (Dexon) used as suture material for the repair of episiotomies].** *Ugeskr Laeger.* 1975;137(11):617–20.
66. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. **Synthetic Polymers Seeded with Chondrocytes Provide a Template for New Cartilage Formation.** *Plast Reconstr Surg.* 1991;88(5):753–9.
67. Ruuskanen MM, Kallioinen MJ, Kaarela OI, Laiho JA, Törmälä PO, Waris TJ. **The Role of Polyglycolic Acid Rods in the Regeneration of Cartilage from Perichondrium in Rabbits.** *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1991;25(1):15–8.
68. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R. **Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells**

- cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(1):11–23.**
69. Zhu W, Chen K, Lu W, Sun Q, Peng L, Fen W, et al. **In vitro study of nano-HA/PLLA composite scaffold for rabbit BMSC differentiation under TGF- β 1 induction.** *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2014;50(3):214–20.
70. Anderson JM, Shive MS. **Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres.** *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28(1):5–24.
71. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. **Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover.** *J Intern Med.* 1997;242(1):27–33.
72. Goa KL, Benfield P. **Hyaluronic Acid.** *Drugs.* 1994;47(3):536–66.
73. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. **Osteochondral Defect Repair with Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in an Injectable, In Situ , Cross-Linked Synthetic Extracellular Matrix.** *Tissue Eng.* 2006;12(12):3405–16.
74. Zhu Y, Wu H, Sun S, Zhou T, Wu J, Wan Y. **Designed composites for mimicking compressive mechanical properties of articular cartilage matrix.** *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014;36:32–46.
75. Zhang Y, Zhang M, Jiang H, Shi J, Li F, Xia Y, et al. **Bio-inspired layered chitosan/graphene oxide nanocomposite hydrogels with high strength and pH-driven shape memory effect.** *Carbohydr Polym.* 2017;177:116–25.
76. Ravanetti F, Galli C, Manfredi E, Cantoni AM, Scarpa E,

- Macaluso GM, et al. **Chitosan-based scaffold modified with D-(+) raffinose for cartilage repair: an in vivo study.** *J Negat Results Biomed.* 2015;14(1):2.
77. Griffon D, Sedighi M, Schaeffer D, Eurell J, Johnson A. **Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering.** *Acta Biomater.* 2006;2(3):313–20.
78. Zhao M, Chen Z, Liu K, Wan Y, Li X, Luo X, et al. **Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes.** *J Zhejiang Univ B.* 2015;16(11):914–23.
79. Oliveira I, Carvalho AL, Radhouani H, Gonçalves C, Oliveira JM, Reis RL. **Promising Biomolecules.** In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2018. p. 189–205.
80. Kessler MW, Grande DA. **Tissue engineering and cartilage.** *Organogenesis.* 2008;4(1):28–32.
81. Popa EG, Reis RL, Gomes ME. **Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage.** *Crit Rev Biotechnol.* 2015;35(3):410–24.
82. Completo A, Bandejas C, Fonseca F. **Comparative assessment of intrinsic mechanical stimuli on knee cartilage and compressed agarose constructs.** *Med Eng Phys.* 2017;44:87–93.
83. Kock LM, Geraedts J, Ito K, van Donkelaar CC. **Low Agarose Concentration and TGF- β 3 Distribute Extracellular Matrix in**

- Tissue-Engineered Cartilage.** *Tissue Eng Part A.* 2013;19(13–14):1621–31.
84. Cigan AD, Roach BL, Nims RJ, Tan AR, Albro MB, Stoker AM, et al. **High seeding density of human chondrocytes in agarose produces tissue-engineered cartilage approaching native mechanical and biochemical properties.** *J Biomech.* 2016;49(9):1909–17.
85. Yin Z, Yang X, Jiang Y, Xing L, Xu Y, Lu Y, et al. **Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An in vitro study.** *J Biomater Appl.* 2014;28(7):1039–50.
86. Diekman BO, Christoforou N, Willard VP, Sun H, Sanchez-Adams J, Leong KW, et al. **Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells.** *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(47):19172–7.
87. Weisser J, Rahfoth B, Timmermann A, Aigner T, Bräuer R, von der Mark K. **Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose.** *Osteoarthr Cartil.* 2001;9(SUPPL. A):S48–54.
88. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo P V, et al. **Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering.** *Histol Histopathol.* 2007;22(6):631–40.
89. Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M. **Tissue engineering of the peripheral nervous system.** *Expert*

- Rev Neurother.* 2014;14(3):301–18.
90. García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, del Carmen Sánchez-Quevedo M, Garzón I, Alaminos M, et al. **Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels.** *Histochem Cell Biol.* 2017;147(1):83–95.
 91. Tan H, Marra KG. **Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications.** *Materials (Basel).* 2010;3(3):1746–67.
 92. Guo J, Jourdian GW, Maccallum DK. **Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads.** *Connect Tissue Res.* 1989;19(2–4):277–97.
 93. Brand JA, McAlindon TE, Zeng L. **A 3D System for Culturing Human Articular Chondrocytes in Synovial Fluid.** *J Vis Exp.* 2012;(59):1–5.
 94. Wong M, Siegrist M, Wang X, Hunziker E. **Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis.** *J Orthop Res.* 2001;19(3):493–9.
 95. Lima EG, Bian L, Mauck RL, Byers BA, Tuan RS, Ateshian GA, et al. **The Effect of Applied Compressive Loading on Tissue-Engineered Cartilage Constructs Cultured with TGF- β 3.** In: 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE; 2006. p. 779–82.
 96. Mauck RL, Byers BA, Yuan X, Tuan RS. **Regulation of**

- Cartilaginous ECM Gene Transcription by Chondrocytes and MSCs in 3D Culture in Response to Dynamic Loading.** *Biomech Model Mechanobiol.* 2007;6(1–2):113–25.
97. Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. **Synergistic Action of Growth Factors and Dynamic Loading for Articular Cartilage Tissue Engineering.** *Tissue Eng.* 2003;9(4):597–611.
98. Mata M, Milian L, Oliver M, Zurriaga J, Sancho-Tello M, Llano JJM de, et al. **In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate Scaffold: A Preliminary Study.** *Stem Cells Int.* 2017;2017:1–9.
99. Zhang Y, Guo W, Wang M, Hao C, Lu L, Gao S, et al. **Co-culture systems-based strategies for articular cartilage tissue engineering.** *J Cell Physiol.* 2018;233(3):1940–51.
100. Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, Van Blitterswijk CA, Alves NM, et al. **Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair.** *Biomaterials.* 2011;32(4):1068–79.
101. Nath SD, Abueva C, Kim B, Lee BT. **Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2.** *Carbohydr Polym.* 2015;115:160–9.
102. Recha-Sancho L, Moutos FT, Abellà J, Guilak F, Semino CE. **Dedifferentiated human articular chondrocytes redifferentiate to a cartilage-like tissue phenotype in a poly("-**

- caprolactone)/self-assembling peptide composite scaffold. *Materials (Basel)*. 2016;9(6).
103. Ionescu A-M, Alaminos M, Cardona J de la C, García-López Durán J de D, González-Andrades M, Ghinea R, et al. **Investigating a novel nanostructured fibrin–agarose biomaterial for human cornea tissue engineering: Rheological properties.** *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(8):1963–73.
104. Alaminos M, Garz I, Fern A, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, et al. **Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa.** *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(August):350–9.
105. Nieto-Aguilar R, Serrato D, Garzón I, Campos A, Alaminos M. **Pluripotential Differentiation Capability of Human Adipose-derived Stem Cells in a Novel Fibrin-agarose Scaffold.** *J Biomater Appl*. 2011;25(7):743–68.
106. Levorson EJ, Santoro M, Kurtis Kasper F, Mikos AG. **Direct and indirect co-culture of chondrocytes and mesenchymal stem cells for the generation of polymer/extracellular matrix hybrid constructs.** *Acta Biomater*. 2014;10(5):1824–35.
107. Ahmed TAE, Hincke MT. **Mesenchymal stem cell - Based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage.** Vol. 29, Histology and Histopathology. Histology and Histopathology; 2014. p. 669–89.
108. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vécsei V, et al. **Dedifferentiation-associated changes in morphology**

- and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture.** *Osteoarthr Cartil.* 2002;10(1):62–70.
109. Darling EM, Athanasiou KA. **Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations.** *J Orthop Res.* 2005;23(2):425–32.
110. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. **Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage.** *Biomaterials.* 2016;98:1–22.
111. Roberts S, Menage J, Sandell LJ, Evans EH, Richardson JB. **Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation.** *Knee.* 2009;16(5):398–404.
112. Jiang Y, Cai Y, Zhang W, Yin Z, Hu C, Tong T, et al. **Human Cartilage-Derived Progenitor Cells From Committed Chondrocytes for Efficient Cartilage Repair and Regeneration.** *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(6):733–44.
113. Fellows CR, Matta C, Zakany R, Khan IM, Mobasheri A. **Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair.** *Front Genet.* 2016;7(DEC).
114. Fisher JN, Tessaro I, Bertocco T, Peretti GM, Mangiavini L. **The Application of Stem Cells from Different Tissues to Cartilage Repair.** *Stem Cells Int.* 2017;2017:1–14.
115. Trankhanh N, Hoemann C, Mckee M, Henderson J, Buschmann M. **Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to**

- produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix.** *J Orthop Res.* 2005;23(6):1354–62.
116. Fuentes-Boquete IM, Arufe Mdel C, Díaz SM, Hermida T, Santos FJ de T, Blanco FJ. **Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular.** *Reumatol clínica.* 2007;3:63–9.
117. Sancho-Tello M, Forriol F, de Llano JJM, Antolinos-Turpin C, Gómez-Tejedor JA, Ribelles JLG, et al. **Biostable Scaffolds of Polyacrylate Polymers Implanted in the Articular Cartilage Induce Hyaline-Like Cartilage Regeneration in Rabbits.** *Int J Artif Organs.* 2017;40(7):350–7.
118. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. **Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies.** *Tissue Eng.* 2001;7(2):211–28.
119. Awad HA, Quinn Wickham M, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. **Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds.** *Biomaterials.* 2004;25(16):3211–22.
120. Wu S-C, Chang J-K, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. **Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment.** *Biomaterials.* 2010;31(4):631–40.
121. Afizah H, Yang Z, Hui JHP, Ouyang H-W, Lee E-H. **A Comparison Between the Chondrogenic Potential of Human Bone Marrow Stem Cells (BMSCs) and Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Taken from the Same Donors.** *Tissue Eng.* 2007;13(4):659–66.

122. Ronzière MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria A-M. **Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells.** *Biomed Mater Eng.* 2010;20(3–4):145–58.
123. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. **Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial.** *Stem Cells.* 2014;32(5):1254–66.
124. Gómez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, et al. **Hypoxia Is a Critical Parameter for Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Type I/III Collagen Sponges.** *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1933.
125. Marmotti A, Mattia S, Castoldi F, Barbero A, Mangiavini L, Bonasia DE, et al. **Allogeneic Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Potential Source for Cartilage and Bone Regeneration: An In Vitro Study.** *Stem Cells Int.* 2017;2017:1–16.
126. Desancé M, Contentin R, Bertoni L, Gomez-Leduc T, Branly T, Jacquet S, et al. **Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy.** *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):537.
127. White JL, Walker NJ, Hu JC, Borjesson DL, Athanasiou KA. **A Comparison of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal**

- Stem Cells for Cartilage Self-Assembly.** *Tissue Eng Part A.* 2018;24(15–16):1262–72.
128. Park Y-B, Ha C-W, Lee C-H, Park Y-G. **Restoration of a large osteochondral defect of the knee using a composite of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel: a case report with a 5-year follow-up.** *BMC Musculoskelet Disord.* 2017;18(1):59.
129. Liu S, Jia Y, Yuan M, Guo W, Huang J, Zhao B, et al. **Repair of Osteochondral Defects Using Human Umbilical Cord Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model.** *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–12.
130. Fu W-L, Zhou C-Y, Yu J-K. **A New Source of Mesenchymal Stem Cells for Articular Cartilage Repair.** *Am J Sports Med.* 2014;42(3):592–601.
131. Chong P-P, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. **Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res.* 2012;30(4):634–42.
132. Saw K-Y, Anz A, Siew-Yoke Jee C, Merican S, Ching-Soong Ng R, Roohi SA, et al. **Articular Cartilage Regeneration With Autologous Peripheral Blood Stem Cells Versus Hyaluronic Acid: A Randomized Controlled Trial.** *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2013;29(4):684–94.
133. Saw K-Y, Anz A, Jee CS-Y, Ng RC-S, Mohtarrudin N, Ragavanaidu

- K. **High Tibial Osteotomy in Combination With Chondrogenesis After Stem Cell Therapy: A Histologic Report of 8 Cases.** *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2015;31(10):1909–20.
134. Chijimatsu R, Kobayashi M, Ebina K, Iwahashi T, Okuno Y, Hirao M, et al. **Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro.** *Cytotechnology.* 2018;70(2):819–29.
135. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. **Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase After Meniscus Injury.** *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(5):1357–64.
136. Jia Z, Liu Q, Liang Y, Li X, Xu X, Ouyang K, et al. **Repair of articular cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial fluid-derived mesenchymal stem cells.** *J Transl Med.* 2018;16(1):123.
137. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. **Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.** *J Dent Res.* 2002;81(8):531–5.
138. Potdar PD. **Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine.** *World J Stem Cells.* 2015;7(5):839.
139. Dai J, Wang J, Lu J, Zou D, Sun H, Dong Y, et al. **The effect of co-culturing costal chondrocytes and dental pulp stem cells combined with exogenous FGF9 protein on chondrogenesis and ossification in engineered cartilage.** *Biomaterials.*

- 2012;33(31):7699–711.
140. Chen K, Xiong H, Xu N, Shen Y, Huang Y, Liu C. **Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo.** *Acta Odontol Scand.* 2014;72(8):664–72.
141. Zainal Ariffin SH, Kermani S, Megat Abdul Wahab R, Senafi S, Zainal Ariffin Z, Abdul Razak M. **In Vitro Chondrogenesis Transformation Study of Mouse Dental Pulp Stem Cells.** *Sci World J.* 2012;2012:1–7.
142. Nemeth CL, Janebodin K, Yuan AE, Dennis JE, Reyes M, Kim D-H. **Enhanced Chondrogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Using Nanopatterned PEG-GelMA-HA Hydrogels.** *Tissue Eng Part A.* 2014;20(21–22):2817–29.
143. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. **Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors.** *Trends Biotechnol.* 2009;27(5):307–14.
144. Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. **Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair.** *Injury.* 2008;39(1):88–96.
145. Gazzo E, Canalis E. **Bone morphogenetic proteins and their antagonists.** *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;7(1–2):51–65.
146. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W. **The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage**

- regeneration.** *Int Orthop.* 2015;39(5):995–1003.
147. Grimaud E, Heymann D, Rédini F. **Recent advances in TGF- β effects on chondrocyte metabolism.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(3):241–57.
148. Fan H, Hu Y, Qin L, Li X, Wu H, Lv R. **Porous gelatin–chondroitin–hyaluronate tri-copolymer scaffold containing microspheres loaded with TGF- β 1 induces differentiation of mesenchymal stem cells in vivo for enhancing cartilage repair.** *J Biomed Mater Res Part A.* 2006;77A(4):785–94.
149. Sopory S, Nelsen SM, Degnin C, Wong C, Christian JL. **Regulation of Bone Morphogenetic Protein-4 Activity by Sequence Elements within the Prodomain.** *J Biol Chem.* 2006;281(45):34021–31.
150. Sieron AL, Louneva N, Fertala A. **Site-specific interaction of bone morphogenetic protein 2 with procollagen II.** *Cytokine.* 2002;18(4):214–21.
151. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. **Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma.** *Cell Tissue Res.* 2005;320(2):269–76.
152. Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, et al. **Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads.** *Osteoarthr Cartil.* 2004;12(7):559–67.

153. Kuo A, Rodrigo J, Reddi A, Curtiss S, Grotkopp E, Chiu M. **Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair.** *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(11):1126–35.
154. Garrison K, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, et al. **Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review.** *Health Technol Assess (Rockv).* 2007;11(30).
155. Ornitz DM. **FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease.** *Genes Dev.* 2002;16(12):1446–65.
156. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. **FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *J Cell Physiol.* 2005;203(2):398–409.
157. Davies LC, Blain EJ, Gilbert SJ, Caterson B, Duance VC. **The Potential of IGF-1 and TGF β 1 for Promoting “Adult” Articular Cartilage Repair: An In Vitro Study.** *Tissue Eng Part A.* 2008;14(7):1251–61.
158. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. **Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.** *J Control Release.* 2008;127(1):12–21.
159. Ikeda Y, Sakaue M, Chijimatsu R, Hart DA, Otsubo H,

- Shimomura K, et al. **IGF-1 Gene Transfer to Human Synovial MSCs Promotes Their Chondrogenic Differentiation Potential without Induction of the Hypertrophic Phenotype**. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1–10.
160. Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. **The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes**. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2188–96.
161. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB. **Growth Factor Regulation of Growth Factors in Articular Chondrocytes**. *J Biol Chem.* 2009;284(11):6697–704.
162. De Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M. **Culture of Chondrocytes in Alginate Beads**. In: *Cartilage and Osteoarthritis*. New Jersey: Humana Press; 2004. p. 015–22.
163. Tritz J, Rahouadj R, de Isla N, Charif N, Pinzano A, Mainard D, et al. **Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering**. *Soft Matter.* 2010;6(20):5165.
164. Roylance D. **MECHANICAL PROPERTIES OF MATERIALS**. 2008.
165. Mezger TG. **The Rheology Handbook: For Users of Rotational and Oscillatory Rheometers**. 2006.
166. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo**. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(25):13625–30.

167. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. **Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cells.* 2014;32(6):1408–19.
168. Kawashima N. **Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?** *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439–58.
169. Ogura T, Tsuchiya A, Minas T, Mizuno S. **Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct.** *BMC Res Notes.* 2015;8(1):644.
170. **GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search.**
171. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. **Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to Interleukin-1 β .** *J Cell Physiol.* 1998;176(2):303–13.
172. Caron MMJ, Emans PJ, Coolen MME, Voss L, Surtel DAM, Cremers A, et al. **Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures.** *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(10):1170–8.
173. Moks SS, Masudaso K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonars EJA, Kuettner KE. **Aggrecan Synthesized by Mature Bovine Chondrocytes Suspended in Alginate associated matrix and the further removed matrix.** *J Biol Chem.* 1994;269(52):33021–7.
174. Beekman B, Verzijl N, Bank R, Mark K, Tekoppele J. **Synthesis of**

- Collagen by Bovine Chondrocytes Cultured in Alginate; Posttranslational Modifications and Cell–Matrix Interaction**☆. *Exp Cell Res.* 1997;237(1):135–41.
175. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. **Reexpression of Cartilage-Specific Genes by Dedifferentiated Human Articular Chondrocytes Cultured in Alginate Beads.** *Exp Cell Res.* 1994;212(1):97–104.
176. Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA. **Gene Expression by Human Articular Chondrocytes Cultured in Alginate Beads.** *J Histochem Cytochem.* 2001;49(10):1211–9.
177. Petit B, Masuda K, D’Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, et al. **Characterization of Crosslinked Collagens Synthesized by Mature Articular Chondrocytes Cultured in Alginate Beads: Comparison of Two Distinct Matrix Compartments.** *Exp Cell Res.* 1996;225(1):151–61.
178. Focaroli S, Teti G, Salvatore V, Orienti I, Falconi M. **Calcium/Cobalt Alginate Beads as Functional Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering.** *Stem Cells Int.* 2016;2016:1–12.
179. Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ. **Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools.** *J Biol Chem.* 1994;269(52):33021–7.
180. Beekman B, Verzijl N, de Roos JADM, TeKoppele JM. **Matrix degradation by chondrocytes cultured in alginate: IL-1 β**

- induces proteoglycan degradation and proMMP synthesis but does not result in collagen degradation.** *Osteoarthr Cartil.* 1998;6(5):330–40.
181. Min W, Demoor-Fossard M, Boittin M, Pujol JP, Redini F, Min W, et al. **Differential expression of membrane-anchored proteoglycans in rabbit articular chondrocytes cultured in monolayers and in alginate beads. Effect of transforming growth factor-beta 1.** *Biochim Biophys Acta.* 1997;1355(1):20–32.
182. Reppel L, Schiavi J, Charif N, Leger L, Yu H, Pinzano A, et al. **Chondrogenic induction of mesenchymal stromal/stem cells from Wharton’s jelly embedded in alginate hydrogel and without added growth factor: an alternative stem cell source for cartilage tissue engineering.** *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):260.
183. Quinn TM, Häuselmann HJ, Shintani N HE. **Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles - PubMed.** *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(12):1904–12.
184. Patil R, Kumar BM, Lee W-J, Jeon R-H, Jang S-J, Lee Y-M, et al. **Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor.** *Exp Cell Res.* 2014;320(1):92–107.
185. Suchánek J, Víšek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivančáková

- R, Mokřý J, et al. **Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth – Isolation, Long Term Cultivation and Phenotypical Analysis.** *Acta Medica (Hradec Kral Czech Republic)*. 2010;53(2):93–9.
186. Suchanek J, Soukup T, Ivancakova R, Karbanova J, Hubkova V, Pytlík R, et al. **Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation.** *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2007;50(3):195–201.
187. Estrela C, Alencar AHG de, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. **Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration.** *Braz Dent J*. 2011;22(2):91–8.
188. Lei M, Li K, Li B, Gao L-N, Chen F-M, Jin Y. **Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation.** *Biomaterials*. 2014;35(24):6332–43.
189. Wu W, Zhou J, Xu C-T, Zhang J, Jin Y-J, Sun G-L. **Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages.** *Mol Med Rep*. 2015;12(4):5127–34.
190. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. **Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament.** *Iran J Reprod Med*. 2013;11(3):235–42.
191. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. **Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during**

- cell passaging.** *BMC Cell Biol.* 2010;11(1):32.
192. Huang C-E, Hu F-W, Yu C-H, Tsai L-L, Lee T-H, Chou M-Y, et al. **Concurrent Expression of Oct4 and Nanog Maintains Mesenchymal Stem-Like Property of Human Dental Pulp Cells.** *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18623–39.
193. Yang X, van den Dolder J, Walboomers XF, Zhang W, Bian Z, Fan M, et al. **The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro.** *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(1):66–73.
194. Zimmermann P, Boeuf S, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W. **Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter.** *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2743–53.
195. Zurriaga Carda J, Lastra ML, Antolinos-Turpin CM, Morales-Román RM, Sancho-Tello M, Perea-Ruiz S, et al. **A cell-free approach with a supporting biomaterial in the form of dispersed microspheres induces hyaline cartilage formation in a rabbit knee model.** *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2020;108(4):1428–38.
196. Chung J, Song M, Ha C-W, Kim J-A, Lee C-H, Park Y-B. **Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model.** *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):39.

197. Wang M, Yang Y, Yang D, Luo F, Liang W, Guo S, et al. **The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.** *Immunology.* 2009;126(2):220–32.
198. Singer NG, Caplan AI. **Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation.** *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):457–78.
199. Lohan P, Treacy O, Lynch K, Barry F, Murphy M, Griffin MD, et al. **Culture expanded primary chondrocytes have potent immunomodulatory properties and do not induce an allogeneic immune response.** *Osteoarthr Cartil.* 2016;24(3):521–33.
200. Mauck RL, Soltz MA, Wang CCB, Wong DD, Chao P-HG, Valhmu WB, et al. **Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels.** *J Biomech Eng.* 2000;122(3):252–60.
201. Benya P. **Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.** *Cell.* 1982;30(1):215–24.
202. Vinardell T, Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ. **Chondrogenesis and Integration of Mesenchymal Stem Cells Within an In Vitro Cartilage Defect Repair Model.** *Ann Biomed Eng.* 2009;37(12):2556–65.
203. Capretto L, Mazzitelli S, Luca G, Nastruzzi C. **Preparation and characterization of polysaccharidic microbeads by a microfluidic technique: Application to the encapsulation of**

- Sertoli cells.** *Acta Biomater.* 2010;6(2):429–35.
204. González-Quevedo D, Díaz-Ramos M, Chato-Astrain J, Sánchez-Porras D, Tamimi I, Campos A, et al. **Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose-based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model.** *Bone Joint J.* 2020;102-B(8):1095–106.
205. Scionti G, Moral M, Toledano M, Osorio R, Durán JDG, Alaminos M, et al. **Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model.** *J Biomed Mater Res Part A.* 2014;102(8):2573–82.
206. Rico-Sánchez L, Garzón I, González-Andrades M, Ruíz-García A, Punzano M, Lizana-Moreno A, et al. **Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea.** *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(12):2142–54.
207. Carriel V, Vizcaíno-López G, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, et al. **Scleral surgical repair through the use of nanostructured fibrin/agarose-based films in rabbits.** *Exp Eye Res.* 2019;186:107717.
208. Campos-Cuerva R, Fernández-Muñoz B, Farfán López F, Pereira Arenas S, Santos-González M, Lopez-Navas L, et al. **Nanostructured fibrin agarose hydrogel as a novel haemostatic agent.** *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(4):664–73.
209. Carriel V, Garzón I, Jiménez J-M, Oliveira C-X, Arias-Santiago S,

- Campos A, et al. **Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials.** *Cells Tissues Organs.* 2011;196(1):1–12.
210. Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno JA, et al. **Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration.** *J Neural Eng.* 2013;10(2):026022.
211. de la Cruz Cardona J, Ionescu A-M, Gómez-Sotomayor R, González-Andrades M, Campos A, Alaminos M, et al. **Transparency in a Fibrin and Fibrin–Agarose Corneal Stroma Substitute Generated by Tissue Engineering.** *Cornea.* 2011;30(12):1428–35.
212. Alaminos M, Sañchez-Quevedo MDC, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. **Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold.** *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2006;47(8):3311.
213. Barlič A, Drobnič M, Maličev E, Kregar-Velikonja N. **Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation.** *J Orthop Res.* 2008;26(6):847–53.
214. Heo DN, Kim H-J, Lee D, Kim H, Lee SJ, Lee H-R, et al. **Comparison of polysaccharides in articular cartilage regeneration associated with chondrogenic and autophagy-**

- related gene expression.** *Int J Biol Macromol.* 2020;146:922–30.
215. Karpiński R, Jaworski Ł, Zubrzycki J. **Structural analysis of articular cartilage of the hip joint using finite element method.** *Adv Sci Technol Res J.* 2016;10(31):240–6.
216. Wang C-C, Yang K-C, Lin K-H, Liu H-C, Lin F-H. **A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology.** *Biomaterials.* 2011;32(29):7118–26.
217. Jalayeri M, Pirnia A, Najafabad EP, Varzi AM, Gholami M. **Evaluation of alginate hydrogel cytotoxicity on three-dimensional culture of type A spermatogonial stem cells.** *Int J Biol Macromol.* 2017;95:888–94.
218. Cohen J, Zaleski KL, Nourissat G, Julien TP, Randolph MA, Yaremchuk MJ. **Survival of porcine mesenchymal stem cells over the alginate recovered cellular method.** *J Biomed Mater Res Part A.* 2011;96A(1):93–9.
219. Hai-Yue Yu, Dan-Dan Ma, Bu-Ling Wu. **[Gelatin/alginate hydrogel scaffolds prepared by 3D bioprinting promotes cell adhesion and proliferation of human dental pulp cells in vitro].** *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2017;37(5):668–72.
220. Matta C. **Calcium signalling in chondrogenesis implications for cartilage repair.** *Front Biosci.* 2013;S5(1):S374.
221. Gigout A, Jolicoeur M, Buschmann MD. **Low calcium levels in serum-free media maintain chondrocyte phenotype in**

- monolayer culture and reduce chondrocyte aggregation in suspension culture.** *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(11):1012–24.
222. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. **S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes.** *EMBO Rep.* 2007;8(5):504–9.
223. Diaz-Romero J, Nestic D. **S100A1 and S100B: Calcium Sensors at the Cross-Roads of Multiple Chondrogenic Pathways.** *J Cell Physiol.* 2017;232(8):1979–87.
224. Loty S, Forest N, Boulekbache H, Sautier J-M. **Cytochalasin D induces changes in cell shape and promotes in vitro chondrogenesis: A morphological study.** *Biol Cell.* 1995;83(2–3):149–61.
225. Kino-oka M, Morinaga Y, Kim M-H, Takezawa Y, Kawase M, Yagi K, et al. **Morphological regulation of rabbit chondrocytes on glucose-displayed surface.** *Biomaterials.* 2007;28(9):1680–8.
226. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Ansari S, Xu X, Chee WW, et al. **Alginate hydrogel as a promising scaffold for dental-derived stem cells: an in vitro study.** *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(12):3041–51.
227. Wang Y, Belflower RM, Dong Y-F, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Drissi H. **Runx1/AML1/Cbfa2 Mediates Onset of Mesenchymal Cell Differentiation Toward Chondrogenesis.** *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1624–36.
228. Meretoja V V., Dahlin RL, Wright S, Kasper FK, Mikos AG. **The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-**

- cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds.** *Biomaterials*. 2013;34(17):4266–73.
229. Tang X, Fan L, Pei M, Zeng L, Ge Z. **Evolving concepts of chondrogenic differentiation: history, state-of-the-art and future perspectives.** *Eur Cells Mater*. 2015;30:12–27.
230. Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RLP, et al. **Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages.** *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R34.
231. Rosset EM, Bradshaw AD. **SPARC/osteonectin in mineralized tissue.** *Matrix Biol*. 2016;52–54:78–87.