



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO DE CARTÍLAGO EN UNA MATRIZ DE
COLÁGENA/AGAROSA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. CANO RAMÍREZ YOLANDA GABRIELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

Ciudad Universitaria, CD. MX., Junio, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/325/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de enero de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **CANO RAMÍREZ YOLANDA GABRIELA** con número de cuenta **411024714** con la tesis titulada "**GENERACIÓN DE UN SUSTITUTO DE CARTÍLAGO EN UNA MATRIZ DE COLÁGENA/AGAROSA**", realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
Vocal: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
Secretario: DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE
Suplente: DR. DAVID GARCADIIEGO CAZARES
Suplente: DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de marzo de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución a la que le debo mi formación académica en la investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante la realización de mis estudios en el periodo del 2 de febrero 2018 al 1 de febrero de 2020 con el número de registro 887878.

A mi Comité Tutor conformado por el Dr. Mathieu Hautefeuille y el Dr. Edgar Kröttsch por su consejo, colaboración y apoyo para el desarrollo de este proyecto, y mi profundo agradecimiento a mi tutor principal el Dr. Andrés Castell por el respaldo y confianza depositados en mí para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Biol. Beatriz Hernández Téllez por su colaboración, asesoría y trabajo en este proyecto, sin todo esto no lo habría logrado. A Katia Jarquín Yáñez por su instrucción y asesoría en los experimentos. Y a los miembros del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos que con sus ideas hicieron crecer este proyecto.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias del Laboratorio de Microscopía de la Biodiversidad 1 del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo y asesoría en el procesamiento de las muestras para microscopía de barrido y, sobretodo, gracias por la paciencia para la observación de cada una de ellas, la calidad en las imágenes fue sólo posible por su disposición al trabajo.

A la Dra. Silvia Antuna Bizarro por enseñarme y asesorarme en el procesamiento de las muestras para microscopía de barrido, gracias por compartir su experiencia y tiempo conmigo.

A la Histotecnóloga Raquel Guerrero Alquicira por su colaboración en el procesamiento de muestras.

Dedicatoria

A Óscar mi amigo, confidente, secuaz y amor de mi vida. Gracias por estar ahí cuando te necesité, gracias por escucharme y aconsejarme, pero sobretodo, gracias por cuidar de mí en todo momento. I love you...

A mi mamá por su apoyo incondicional en los proyectos que he emprendido y su sabio consejo para enfrentar las adversidades y a mi papá por su guía. Me siento feliz y completa por tener esta familia.

To my most beloved sister, you are truly a blessing. Thanks for the company and your complicity, you are so important in my life. *"...it's crystal clear that now I'm in a whole new world with you"*. 사랑해

A Tere y Elia por cuidar de mí y estar conmigo en los momentos más importantes.

A mis amigas Ili, Alda y Cas que me hicieron crecer con su consejo e ideas, pero sobretodo por su amistad sincera que ha trascendido del laboratorio.

A mis amigos y colegas del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, en particular a Moni, Aline y Moni que fueron la alegría de cada día de trabajo.

A mi familia y amigos.

A Lorenzo, Helena, Lau y Hermelinda que desde el cielo me cuidan.

너와 함께한 시간 모두 눈부셨다.

날이 좋아서

날이 좋지 않아서

날이 적당해서

모든 날이 좋았다.

그리고 무슨 일이 벌어져도

나는 사랑해요.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Cartílago articular	5
Generalidades del cartílago articular.....	5
Origen del cartílago articular.....	6
Composición	7
Condrocitos.....	7
Matriz extracelular	8
Líquido sinovial.....	11
Zonas del cartílago articular	12
Propiedades mecánicas.....	13
Propiedades compresivas	14
Propiedades de tracción y esfuerzo cortante.....	15
Mecanotransducción.....	15
Tratamiento de lesiones del cartílago articular.....	17
Patologías del cartílago articular.....	17
Estrategias para el tratamiento de lesiones articulares.....	18

Técnicas de reparación	19
Técnicas de regeneración	20
Resultados y comparación de las técnicas	21
Ingeniería del tejido articular	22
Biomateriales.....	23
Agarosa.....	25
Colágena.....	27
<i>Objetivos particulares</i>	30
Antecedentes.....	31
<i>Metodología</i>.....	33
Cultivo de condrocitos	33
Cultivo primario.....	33
Expansión celular	33
Preparación de constructos	34
Procedimiento de elaboración	34
Viabilidad de condrocitos en geles	35
Análisis cuantitativo de las muestras.....	35
Análisis histológico	36
Técnica histológica	36
Análisis cuantitativo de las muestras.....	36
Inmunohistoquímicas.....	37

Análisis cuantitativo de las muestras	38
Análisis estadístico	38
Microscopía de barrido.....	39
Resultados.....	40
Cultivo de condrocitos.....	40
Cultivo primario.....	40
Expansión celular	41
Preparación de constructos	42
Análisis de viabilidad.....	45
Análisis morfológico	47
Análisis histológico.....	56
Discusión	75
Conclusiones.....	82
Perspectivas	84
Literatura citada	85

índice de abreviaturas

Ab	Antibiótico
CA	Cartílago hialino articular
Col-I	Colágena tipo I
Col-II	Colágena tipo II
Col-X	Colágena tipo X
CS	Condroitín sulfato
GAGs	Glucosamiglicanos
H&E	Hematoxilina y eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
IM	Matriz intraterritorial
IOD	Intensidad óptica integrada
KS	Queratán sulfato
MACI	Condrocitos autólogos encapsulados en una matriz
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MEC	Matriz extracelular
MSCs	Células mesenquimales
OA	Osteoartrosis
PCC	Cápsula pericelula
PCM	Matriz pericelular
PGs	Proteoglucanos
Pro-Col-II	Pro-colágena tipo II
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TM	Matriz territorial

Resumen

El cartílago hialino es un tejido especializado que recubre las superficies de los huesos en las articulaciones móviles como la rodilla, es una superficie lubricada que amortigua y disipa las cargas mecánicas por el movimiento, protegiendo el hueso subyacente y facilitando el movimiento. Los condrocitos son el único residente celular y se encargan del mantenimiento de la matriz extracelular, cuya composición define la habilidad del tejido para la disipación de las cargas y articular movimiento sin dolor. Debido a la baja densidad celular, a que es un tejido avascular y no innervado, las lesiones de gran tamaño en el cartílago no son reparables.

La ingeniería de tejidos es una alternativa para la regeneración del cartílago, el proceso implica el trasplante de constructos que contienen condrocitos que se desarrollan en el material como si fuera el cartílago. El proceso requiere grandes cantidades de células que sólo es posible obtenerlas si se lleva a cabo la expansión *in vitro* de las células. Sin embargo, la expansión de condrocitos se caracteriza por el cambio morfológico de célula redondeada a alargada tipo fibroblasto y la pérdida de marcadores característicos del cartílago hialino, como Sox-9 y la síntesis de colágena II, IX, XI y agregano, entre otros. Y en cambio ser positivos para Runx2 y sintetizar colágena X, moléculas características de condrocitos hipertróficos. Para revertir el proceso de transdiferenciación se propone el uso de constructos que induzcan la expresión de los marcadores de cartílago hialino. Los hidrogeles son materiales adecuados para el cultivo de condrocitos porque permiten la adhesión, la viabilidad, la diferenciación y la proliferación de las células encapsuladas. Los polímeros naturales son ampliamente utilizados en la clínica, en particular los de colágena I. Debido a que la rigidez de la matriz en la que se desarrollan los condrocitos afecta el proceso de diferenciación, los geles de agarosa se emplean como constructos porque los cambios en la concentración modifican la rigidez sin alterar sus propiedades químicas. En este proyecto se propone por primera vez un andamio de colágena I (proteína fibrilar) con agarosa como la matriz no fibrilar altamente hidratada del cartílago.

Los condrocitos se obtuvieron del cóndilo femoral de cerdo, las células en cultivo se llevaron hasta pase 3 y después del cual fueron encapsuladas con 100 o 200 μL de colágena I (7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y con 5, 10 y 15

mg mL⁻¹ de agarosa. El volumen final de cada constructo fue de 1 mL y cada uno contenía 1 millón de células, los constructos se seccionaron (1 para cada fecha de análisis) y cultivaron por 1, 7, 14, 21 y 28 días (n=6 por cada día).

Para el día 1 había una gran proporción de células muertas, aunque, en las siguientes evaluaciones el porcentaje disminuyó. Por la naturaleza de los materiales el proceso de encapsulación conlleva la exposición a condiciones no favorables para las células, a esto se atribuye la mortalidad inicial. Después del proceso de encapsulación las células se mantienen viables en el constructo.

A través de imágenes con microscopía de barrido se observó que las células formaron prolongaciones hacia el material sugiriendo su adhesión, además que generaban espacios en el material, y a pesar de ello conservaban su forma redondeada como en el cartílago.

El análisis histológico reveló que las células a partir de los 7 días de cultivo estaban rodeadas por una matriz pericelular densa en GAG, evidenciada con la tinción de azul alcian, que tiñe GAGs, y glicoproteínas. La demostración de colágena tenida con la tinción de Masson no fue tan evidente, debido probablemente a que la colágena combinada con la agarosa, las fibras de colágena están dispersas entre la agarosa y no se tiñen.

El perfil molecular de las células fue analizado con inmunohistoquímica contra pro-colágena II (marcador de cartílago hialino) y contra colágena tipo X (marcador de cartílago hipertrófico). Los resultados mostraron un comportamiento diferencial de acuerdo con la concentración de agarosa, en los constructos con la menor concentración de agarosa la expresión de Col X fue mayor.

Abstract

Articular hyaline cartilage is a specialized tissue, which provides a smooth, lubricated surface for low-friction articulation. Chondrocytes are specialized cells responsible for ECM production and maintenance. Cartilage is neither innervated nor vascularized, because of these, recovery of damage is problematic due to the limited capacity for self-repair, besides its low cell density and limited ability of mature chondrocytes to proliferate or produce sufficient amount of ECM.

Matrix-based cell therapy involves transplantation of a 3D scaffold comprised of autologous chondrocytes. It is necessary for chondrocytes to be expanded *in vitro* to obtain a sufficient number of cells, however, the expansion process is associated with chondrocyte de-differentiation, reduction in the expression of cartilage specific collagens type II, IX, and XI, as well as aggrecan and glycosaminoglycans, and elevated synthesis of collagen type I. To overcome de-differentiation process culture chondrocytes in 3D systems can grow with a preserved phenotype and exhibit the highest chondrogenic capacity *in vitro*. Hydrogels are suitable matrices for chondrocyte encapsulation, promoting cell viability, cell adhesion, differentiation and proliferation. Natural polymers are most widely used in clinical studies, and particularly scaffolds of collagen type. Because of the relevance of stiffness for chondrocyte phenotype agarose has been used as a model due to the dependency of mechanical properties and concentration. In this work, we propose a scaffold that combines collagen I, biofunctional fibrillar protein, with agarose as hydrogel that mimics the surrounding nonfibrillar and high hydrotreated ECM.

Chondrocytes from pig cartilage were excised from the medial femoral condyle, cells were passaged and encapsulated in passage 3. Collagen solutions containing 100 or 200 μl were combined with agarose 5, 10 or 15 mg mL^{-1} to yield cylindrical solid gel. The final volume of each construct was 1 mL and contained 1 million of cells, then the constructs were cut into slices and each one cultured 1, 7, 14, 21 or 28 days (n=6 per group per endpoint).

By day 1 there were countable death cells, however, decrease with culture time. Despite the violent process to encapsulate cells and the considerable death at the beginning of the culture, cells survive and exhibit distribution in cell clusters that suggest proliferation in the construct.

By SEM imageology it was exhibited that cells in the construct displayed a rounded morphology like chondrocytes in their native matrix. Also, it was revealed cell-matrix adhesion and the ability of cells to modify the surrounded matrix.

Histological analysis display that cells were surrounded by a pericellular matrix dense in GAG, shown by the specific staining alcian blue, binds to sulfated GAGs and glycoproteins. Masson's staining, collagen specific, was negative in all samples.

Molecular expression profile was evidence by immunohistochemical assay against a cartilage marker pro-Col II and a hypertrophic marker Col X, results demonstrated a differential behavior. In constructs with the lowest agarose concentration the expression was higher with the culture time, by the contrary in the highest concentration the expression decreased with the culture time.

Introducción

Cartílago articular

Generalidades del cartílago articular

El cartílago es un tejido conjuntivo avascular no inervado, en el que más del 95% de su volumen corresponde a matriz extracelular (MEC). Los condrocitos, junto con los condroclastos y células osteoprogenitoras, residen en el cartílago. La densidad promedio es de 14 millones células/mL, representando menos del 5% del volumen total del cartílago articular. Los condrocitos se encargan de la síntesis y mantenimiento de la MEC, puesto que no existe una red vascular en el cartílago, la composición de la matriz extracelular es crucial para la supervivencia de los condrocitos (Inkinen et al., 2014).

Se distinguen tres tipos de cartílago: hialino, elástico y fibroso y cada uno tiene propiedades bioquímicas, biomecánicas y estructurales diferentes. Estas diferencias son resultado de los estímulos particulares a que están sometidos durante el desarrollo del esqueleto, en consecuencia, las diferentes formas de cartílago, dependiendo de la articulación en que se localicen, permiten mucho, poco o nada de movimiento (Camarero-Espinosa et al., 2016).

El fibrocartílago es el cartílago más duro y fuerte en todo el cuerpo y se encuentra en los discos intervertebrales, meniscos, en la interfaz entre tendones y hueso. La principal característica son las abundantes fibras de colágena tipo I (Col-I). El cartílago elástico está presente en el lóbulo de la oreja, en la epiglotis y en otros cartílagos laríngeos y su función es mantener la forma y flexibilidad de los órganos. Se caracteriza por tener una gran elasticidad provista por las abundantes fibras de elastina que contiene (Camarero-Espinosa et al., 2016). El cartílago hialino sirve como un molde para la posterior formación de los huesos durante el desarrollo embrionario, persistiendo en algunas regiones del esqueleto al finalizar el crecimiento. Se localiza en articulaciones móviles como en el codo, hombro, cadera y rodilla. Al revestir a las extremidades de los huesos les provee una superficie de baja fricción

y distribuye las fuerzas aplicadas al hueso subyacente (figura 1) (Chen et al., 2013; Chevalier y Richette, 2016; Ross y Pawlina, 2015).

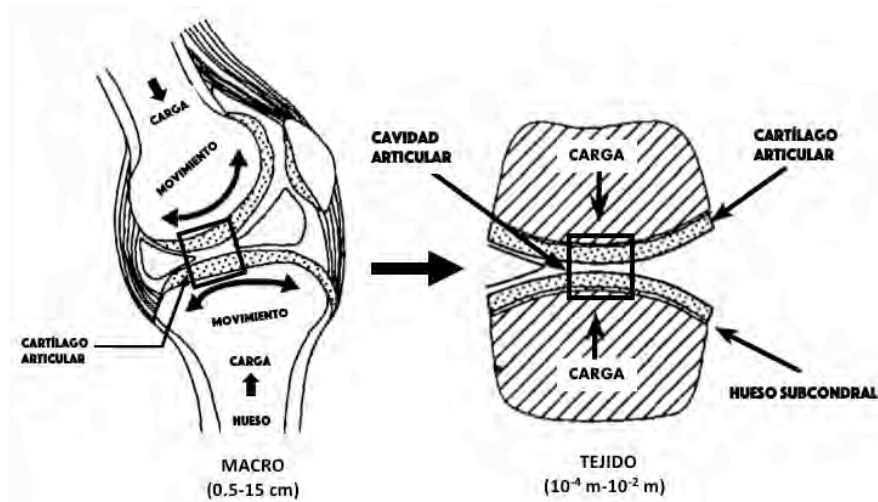


Figura 1.. Estructura y ubicación del cartílago articular, modificado de Mow, 1991)

Los principales constituyentes del cartílago hialino articular (CA) son el líquido intersticial y los componentes de la MEC como colágena tipo II (Col-II) y glucosaminoglucanos (GAGs), que le confieren estructuración y elasticidad al tejido cartilaginoso. Debido a la baja densidad celular, reducida actividad proliferativa, su naturaleza avascular y a su falta de pericondrio, el cartílago es incapaz de regenerarse o repararse tras una lesión o procesos degenerativos como la osteoartritis. Esto puede resultar en la degeneración del tejido articular y provocar dolor incapacitante en el paciente (D. Chen et al., 2017). Dos estrategias terapéuticas predominan en la actualidad para reparar al cartílago articular: la regeneración del tejido y la ingeniería de tejidos. La terapia celular representa una colección de métodos *in vivo* que persiguen la formación de nuevo tejido *in situ*, mientras que la ingeniería de tejidos está basada en técnicas que buscan la formación de neocartílago *in vitro* que posteriormente pueda ser implantado en el cuerpo (Spiller et al., 2011).

Origen del cartílago articular

La formación del CA comienza en el mesénquima por el agrupamiento y posterior diferenciación de células mesenquimales (MSCs) en pre-condrocitos. Durante esta fase de condensación, las células

expresan Col-I y II, GAGs, y moléculas de adhesión como cadherina y N-CAM. Simultáneamente, la mayoría de los vasos sanguíneos desaparece. A continuación, los pre-condrocitos expresan factores de transcripción específicos como Sox-9, L-Sox-5 y Sox-6 y en este punto los condrocitos son maduros y producen MEC abundante en proteoglicanos (PGs), en particular agregano, y colágena II, IX y XI. En el curso del desarrollo embrionario, el proceso de osificación endocondral que forma los huesos tiene origen en los cúmulos de células cartilaginosas, que maduran y proliferan formando columnas verticales de células, al mismo tiempo que las células aumentan de tamaño debido a que se “edematizan” porque se diferencian hacia una etapa hipertrófica. Los condrocitos en esta zona no sintetizan más colágena II sino colágena X, que está involucrada en el depósito de calcio en la matriz cartilaginosa. En esta zona se sintetiza fosfatasa alcalina, enzima que libera fosfato inorgánico que se une a calcio permitiendo la formación de cristales de hidroxapatita. Los condrocitos hipertróficos producen VEGF, que induce la formación de vasos sanguíneos. Las células en el área calcificada mueren por apoptosis y el espacio es invadido por osteoclastos que preparan el espacio para la llegada de osteoblastos (Demoor et al., 2014).

En las primeras etapas de desarrollo los condrocitos proliferan y producen proteínas de MEC de manera activa, antes de alcanzar la maduración, entre los 18 y 21 años, las células responden a las fuerzas mecánicas aplicadas, remodelando el tejido al variar la composición y estructura. Cuando se alcanza la madurez, la actividad celular decae, disminuye la síntesis de MEC y la mayoría de los condrocitos no vuelven a dividirse (Álvarez et al., 2002). En general, en el cartílago maduro, la densidad celular disminuye, se produce menor cantidad de MEC y las células tienen menor respuesta a los factores de crecimiento (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Composición

Condrocitos

Los condrocitos son el único tipo de células presentes en la MEC cartilaginosa, aunque la actividad proliferativa es baja o inexistente, son el principal responsable del mantenimiento de la homeostasis del tejido. Los condrocitos maduros tienen una forma esférica con bordes aplanados, núcleos prominentes, abundante retículo endoplásmico y aparato de Golgi, que se explica por su activa

producción de proteínas matriciales. En estado maduro los condrocitos carecen de interacciones célula-célula, ya que cada una de ellas está rodeada por la denominada matriz pericelular. Al conjunto formado por varios (en promedio de 2 a 5) condrocitos y la zona de MEC que los rodea se le denomina *condrón* la que constituye la unidad anatómica, citogenética y mecánica del cartílago (Álvarez et al., 2002; Camarero-Espinosa et al., 2016). Estos condrones se originan cuando los condrocitos que realizan una o dos divisiones mitóticas se organizan en cúmulos atrapados en lagunas que se denominan grupos isógenos o isogénicos (figura 4). Conforme es sintetizada la matriz que los rodea, los condrocitos recién divididos comienzan a alejarse unos de otros. Los condrocitos también secretan metaloproteasas, enzimas que degradan la matriz cartilaginosa para permitir que las células se expandan y se reubiquen dentro del grupo isógeno en crecimiento (Ross y Pawlina, 2015).

Al ser un tejido avascular, la nutrición de las células depende de la difusión de nutrientes desde el líquido sinovial. La glucosa es el principal nutrimento energético del condrocito que metaboliza básicamente por la vía de la glucólisis anaeróbica y/o se transforma en glucosamina para la síntesis de los proteoglicanos (Chevalier y Richette, 2016).

Matriz extracelular

El principal componente de la MEC del cartílago es la colágena, que representa entre el 50-80% del peso seco del cartílago. La Col-II es la más abundante, seguida de la colágena tipo IX y XI. Sin ser específica del CA, la Col-II es sintetizada en los condrocitos normales e indica, en ensayos *in vitro*, la diferenciación de estos (Chevalier y Richette, 2016). A partir de la col II se desarrolla una compleja red fibrilar a la que se atribuye la rigidez y resistencia a la tracción del tejido, que se enlaza y estabiliza con otros componentes de la matriz (figura 2) (Mow et al., 1992).

La MEC de cartílago contiene otras proteínas no colagénicas, la mayoría de ellas en forma de proteoglicanos (PGs). Los PGs están compuestos de una proteína nuclear, a la que se asocian perpendicularmente glucosaminoglicanos formando una escobetilla (figura 3) (Iozzo y Schaefer, 2015). Los GAGs son cadenas largas lineales no ramificadas de disacáridos que se unen a través de enlaces glicosídicos. Los GAGs más abundantes en el cartílago son hialuronato, dermatán sulfato, queratán

sulfato (KS) y condroitín 4-sulfato y 6-sulfato (CS). Todos los GAGs presentes en cartílago, a excepción del hialuronato, contienen grupos sulfato que están cargados negativamente (Camarero-Espinosa et al., 2016).

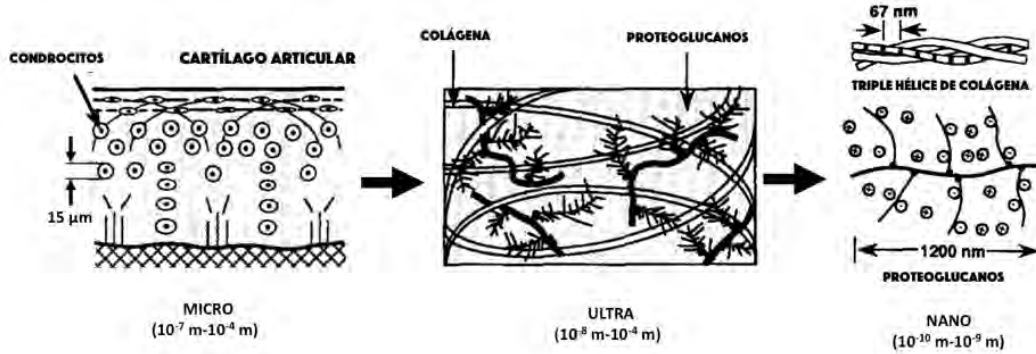


Figura 2. Estructura y composición molecular del cartílago articular a diferentes escalas, modificado de Mow, 1991)

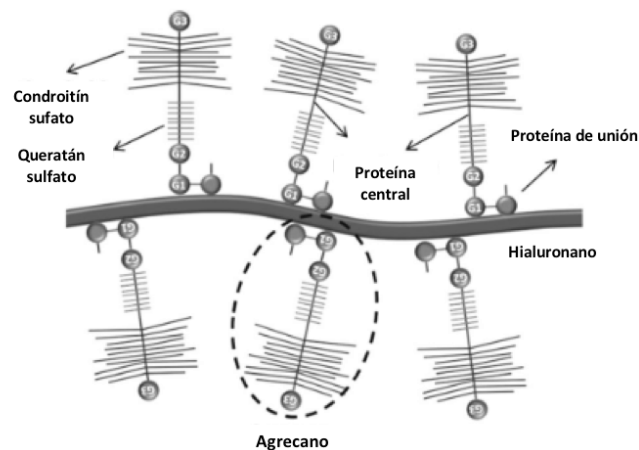


Figura 3. Estructura del proteoglicano agregano unido a hialuronato. Condroitín sulfato y queratán sulfato se unen a la proteína central entre los dominios globulares G2 y G3 formando agregano (señalado con una elipse punteada). Agregano interactúa con el hialuronano a través de la proteína de unión. Modificado de Camarero-Espinosa, 2016.

El agregano es el PG más abundante de la matriz de cartílago, está formado por CS y KS, unidos a una molécula de hialuronano (Mow et al., 1992). Esta interacción no se disocia en condiciones fisiológicas y conduce a la formación de grandes agregados de PGs. Estos agregados generan un empacamiento denso, hidratado, que se refuerza con la unión de las fibras de colágena. La carga negativa de los ácidos carboxílicos y los grupos sulfato en los GAGs, resultan en una carga global negativa de la MEC cartilaginosa, lo que provoca la atracción de iones que mantienen la neutralidad eléctrica resultando

en la entrada de agua por efecto osmótico (Iozzo y Schaefer, 2015). El fluido es atrapado y produce un efecto de hinchamiento, sin embargo, la red de col II forma un almacén que limita el desplazamiento, manteniéndolo contenido (Chevalier y Richette, 2016; Iozzo y Schaefer, 2015).

Los componentes de la MEC del CA no están distribuidos de manera uniforme, y se han descrito tres regiones en el cartílago de acuerdo con sus propiedades territoriales: la matriz pericelular (PCM) encapsulada por la cápsula pericelular (PCC), la matriz territorial (TM) y la matriz intraterritorial (IM) (figura 4).

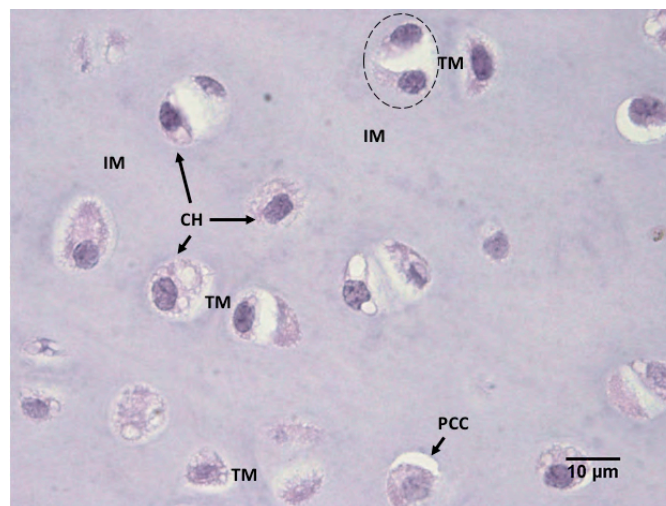


Figura 4. Tinción H&E del cartílago articular 100x. Los condrocitos (CH) están rodeados por la capsula pericelular (PCC) que contiene la matriz pericelular. De manera característica la matriz territorial (TM) se tiñe más intensa que la matriz interterritorial (MI). La línea punteada se señala a un grupo isógeno.

Cada condrocito está rodeado por una estrecha PCM que funciona como trasmisor de señales biomecánicas y bioquímicas para el condrocito. Tiene la concentración más elevada de proteoglicanos sulfatados y hialuronato; sin embargo, las macromoléculas no forman el complejo agregano-hialuronano. El contenido de col II es de diámetro pequeño (10-15nm) y está enredada formando una estructura que rodea la célula, la cápsula pericelular. Se considera que esta arquitectura se cree tiene una función hidrodinámica que protege al condrocito, sirviendo como un cojín que se deforma reversiblemente ante cargas mecánicas. La colágena IX y VI están presentes en la PCM en una mayor concentración respecto a la TM (Camarero-Espinosa et al., 2016; Wilusz et al., 2014). En imágenes de

microscopía de iones de helio de las secciones transversales del cartílago articular se observa la morfología tipo canasta de la colágena en la matriz pericelular (figura 5)(Vanden Berg-Foels et al., 2012).

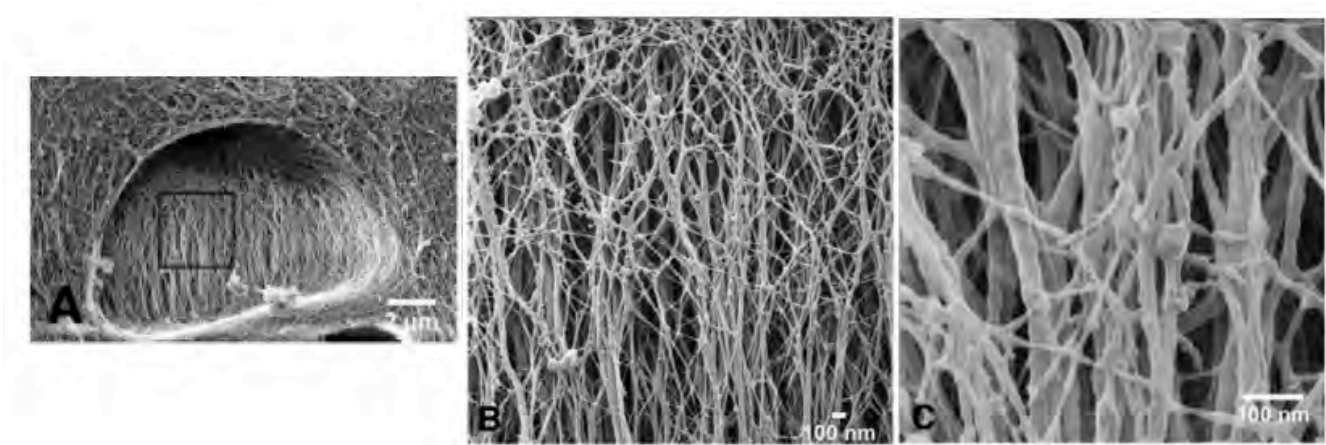


Figura 5. Microscopía por iones de helio (HIM) de la matriz pericelular de condrocitos articulares (A). La capa interna de la estructura tipo canasta que rodea la célula es una malla de microfibrillas que difieren en morfología de las fibras de colágena bandeadas que se observan al fondo (B). Modificado de Vanden Berg-Foels et al.

La matriz territorial está más alejada de los condrocitos. Rodea el grupo isógeno y contiene una red de distribución aleatoria de colágena II con pequeñas cantidades de colágena tipo IX. La composición de la matriz es similar a la IM, pero las fibras de colágena son más delgadas y una mayor proporción de PGs ricos en CS (Camarero-Espinosa et al., 2016; Ross y Pawlina, 2015).

La matriz interterritorial (IM) es una región que rodea la matriz territorial y ocupa el espacio que hay entre los grupos de condrocitos. Tiene una mayor concentración de PGs ricos en KS y fibras de colágena más gruesas (Camarero-Espinosa et al., 2016; Ross y Pawlina, 2015).

Líquido sinovial

El líquido sinovial es un fluido encapsulado en la articulación, es una mezcla de proteínas del ultrafiltrado del plasma y hialuronano. Electrolitos como sodio, potasio, calcio y cloro están en la misma concentración que en el plasma, mientras que el hialuronano está tres veces más concentrado. También contiene otras proteínas responsables de la lubricación (Camarero-Espinosa et al., 2016).

El líquido sinovial es responsable de la nutrición y remoción de desechos del cartílago. El transporte de nutrientes ocurre por difusión y transporte de masa en los ciclos de compresión-relajación del tejido. Además, actúa como lubricante articular, amortigua los golpes y evita el contacto de los cartílagos articulares entre sí. El líquido sinovial es un fluido no Newtoniano que al aplicar presión responde con un incremento en la viscosidad que soporta la carga. Con la aplicación continua de presión, la viscosidad del fluido decrece y el tejido segrega el líquido atrapado, soportando la carga (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Zonas del cartílago articular

En los adultos, el cartílago articular mide de 2 a 5mm de espesor y conforme a la profundidad las características de los constituyentes de la MEC varían, así como la forma y el arreglo de los condrocitos. Se divide en cuatro zonas y es resultado de la maduración del tejido. No se describen como capas superpuestas, sino capas que difieren entre sí según criterios bioquímicos (cantidad de proteoglicanos) y anatómicos (disposición de fibras de colágeno) (Ross y Pawlina, 2015).

En la zona superficial del cartílago las fibras de col II son de diámetros pequeño y se organizan en fascículos paralelos a la superficie, esta organización optimiza la disipación de esfuerzo cortante. La concentración de PGs es baja, debido a que sufren una degradación más rápida y se sintetiza en menor cantidad (Álvarez et al., 2002). Hay poca colágena y la mayor concentración de fibronectina y agua, por lo que la permeabilidad del tejido es mayor que en otras zonas. Los condrocitos en esta zona presentan crecimiento aposicional, son alargados, aplanados y están rodeados por una red densa de fibras de colágena. Los condrocitos en esta región secretan Col-I (ilustración 6) (Camarero-Espinosa et al., 2016).

La zona intermedia está debajo de la superficial y se caracteriza por tener baja densidad celular. Los condrocitos son redondos y están distribuidos al azar en la matriz. Las fibras de col II son el componente de la MEC más prominente en la zona, están menos organizadas y se disponen en orientación oblicua. Esta zona es la de mayor concentración de PGs (ilustración 6) (Camarero-Espinosa et al., 2016).

La zona profunda se caracteriza por tener condrocitos redondeados y ligeramente más grandes que se disponen en columnas cortas y perpendiculares a la superficie libre del cartílago, la densidad celular es menor que en las zonas media y superficial. Las fibras de la colágena están dispuestas entre las columnas paralelas al eje longitudinal del hueso, donde la Col-X es característica en esta zona. La zona calcificada se caracteriza por una matriz rica en calcio con la presencia de condrocitos hipertróficos, sirve como interfaz entre el hueso y el cartílago. Esta zona está separada de la zona profunda por una línea regular, ondulada y muy calcificada, que recibe el nombre de marca de marea (*tide-mark*) que forma una barrera que impide el ingreso de los vasos subcondrales, pero no de algunas sustancias (ilustración 6)(Ross y Pawlina, 2015).

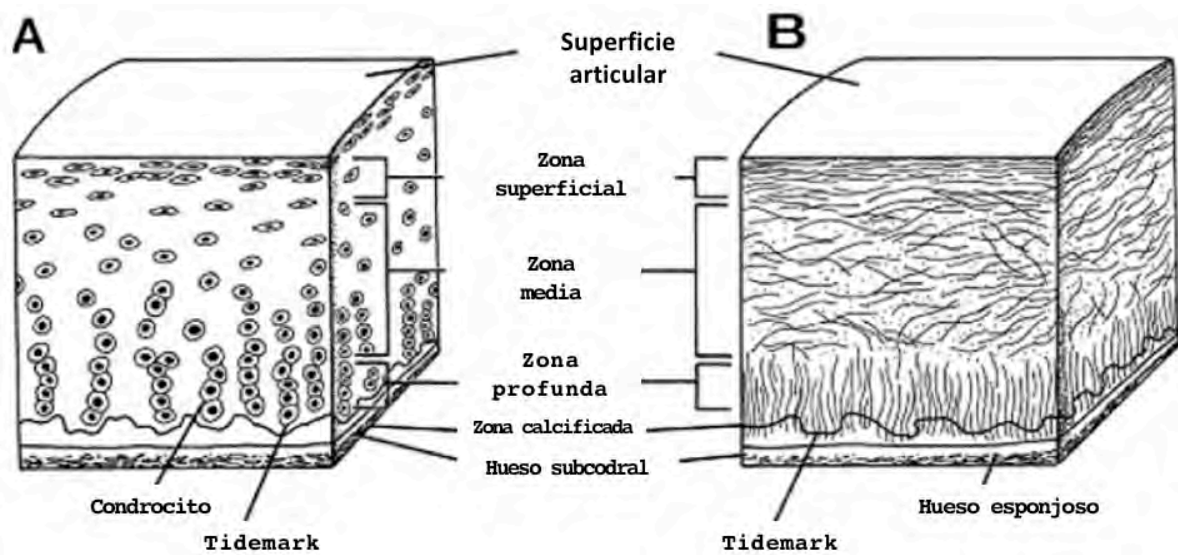


Figura 6. Esquema de la sección transversal del cartílago articular. Distribución celular en las diferentes zonas del cartílago (A). Arquitectura de las fibras de colágeno en las diferentes zonas del cartílago (B). Modificado de Fox, 2009.

Propiedades mecánicas

El cartílago articular funciona como un elemento que soporta y distribuye cargas mecánicas, a la vez que permite el movimiento traslacional y rotacional de la articulación. La compleja estructura y composición del cartílago lo hace una red fibrosa y permeable que retiene líquido, durante el movimiento y cuando la articulación se somete a compresión se producen cambios transitorios y regionales del contenido acuoso. El líquido sinovial es presionado y fluye a través del tejido

cartilinoso, ejerciendo fricción en la matriz sólida, transfiriendo la carga aplicada (Ross y Pawlina, 2015).

La composición y la estructura del cartílago explican sus propiedades biomecánicas. Los PGs son moléculas polianiónicas, que se agregan y ocupan un gran volumen. El aumento en el volumen por la hidrofiliidad de los PGs, se contiene por efecto de la red de fibras de colágeno tipo II. Cuando el cartílago es comprimido, las cargas negativas en el agregado se acercan entre ellas, lo que incrementa su fuerza de repulsión provocando mayor rigidez en el cartílago. Los PGs que no forman agregados no serían tan efectivos en resistir la compresión, ya que no estarían atrapados por la red de colágena. Los daños en la red de colágena reducen la rigidez del tejido, ya que los agregados de PGs no son contenidos con tanta eficiencia (Mansour, 2009).

El cartílago es un material heterogéneo, anisotrópico y viscoelástico que, debido a esta naturaleza, no responde linealmente a la aplicación de fuerzas mecánicas. El cartílago se comporta como esponja, no obstante, es una esponja que no permite el flujo de fluidos fácilmente, esto se explica por su baja permeabilidad que se define como la resistencia a que fluya un fluido (Mansour, 2009). Que el flujo de fluidos y la deformación sean eventos interdependientes ha llevado a modelar el comportamiento del tejido como una mezcla de fluidos y sólidos, llamado el modelo bifásico del cartílago. En este modelo los PGs, la colágena, las células y los lípidos son la fase sólida que tiene un comportamiento lineal en esfuerzo-deformación. El fluido intersticial que tiene libre movimiento a través de la matriz es la fase fluida.

Propiedades compresivas

En el cartílago las propiedades compresivas del tejido varían dependiendo de la profundidad del tejido, la zona superficial es muy permeable (los fluidos fluyen relativamente fácil) y deformable por el alto contenido de agua, al exponerse a una fuerza de compresión sufre deformaciones mayores al 50% de su volumen. En la zona media y profunda, donde es menos permeable (los fluidos fluyen con dificultad) y la red de colágena está incrementada, la deformación en compresión es menor al 5% del volumen (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Al aplicar una carga constante el cartílago se deforma, pero no instantáneamente. De manera inicial, en la compresión el desplazamiento es rápido por la salida de fluido intersticial del cartílago, pero debido a la baja permeabilidad el líquido se presuriza y la fuerza es transmitida en la fase sólida, disipando el estrés. Cuando el material comienza a deformarse, la porosidad decrece y la permeabilidad se reduce, disminuyendo la tasa de flujo y aumentando las fuerzas de arrastre. Por esta razón, el cartílago responde a la aplicación de cargas incrementando la presión hidráulica y la rigidez mecánica (Camarero-Espinosa et al., 2016; Mansour, 2009). Cuando la carga es removida, el cartílago recobra su forma original por la combinación del efecto osmótico que restablece el fluido y las propiedades elásticas de la fase sólida (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Propiedades de tracción y esfuerzo cortante

Al aplicarse una fuerza de compresión en el cartílago ocurre una deformación y se produce en la superficie fuerzas de tracción. Esta fuerza es tangencial a la superficie y es soportada por la fase sólida del cartílago: la red de colágena y PGs. La tracción también provoca una respuesta viscoelástica, que es generada por el movimiento de las fibras de colágena. La orientación, concentración y entrecruzamiento de la colágena varía en la profundidad del tejido, el perfil de tracción-deformación depende en gran medida de la posición (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Mecanotransducción

Los condrocitos en el cartílago articular se desarrollan en un ambiente mecánico dinámico, que combina eventos de compresión, esfuerzo cortante, presión hidrostática y tensión (C. Chen et al., 2013). La matriz actúa como un transductor de señales para los condrocitos incluidos en ella. Por lo tanto, las compresiones aplicadas al cartílago crean señales mecánicas, eléctricas y químicas que contribuyen a dirigir la actividad sintética de los condrocitos, controlando el balance entre eventos catabólicos y anabólicos (Ross y Pawlina, 2015), modificando la composición y organización de la MEC, que en última instancia altera la resiliencia mecánica del cartílago (Sánchez et al., 2011). En condiciones de estimulación mecánica anormal (aplicación de carga excesiva, lesiones articulares, etc.), el balance en el metabolismo del condrocito se modifica, lo que acelera la degradación de la MEC, induce la

degeneración del cartílago y, en última instancia, provoca el desarrollo de osteoartritis. El estímulo mecánico ha sido reconocido como el factor clave en el inicio y desarrollo de dicha enfermedad (C. Chen et al., 2013).

En la actividad metabólica del condrocito en el cartílago no sólo afecta la exposición a estímulos mecánicos sino el tipo y duración de estos. Los condrocitos en compresión dinámica aumentan la expresión de agregano y col II, respecto a condrocitos en compresión estática. La expresión de PGs y colágena aumenta al aplicar esfuerzo cortante respecto a aplicar compresión. La presión hidrostática sobreexpresa genes anabólicos (agregano y col II) y catabólicos (metaloproteinasas 3 y 13) (C. Chen et al., 2013).

Los mecanismos moleculares para la transmisión de los estímulos mecánicos incluyen la señalización por integrinas, canales de calcio, liberación de mediadores solubles (citoquinas y factores de crecimiento). Las integrinas son proteínas transmembranales heterodiméricas que participan en la unión de ligandos de la MEC con componentes del citoplasma que interactúan con proteínas que median señalización intracelular, además, se unen y ayudan a organizar las proteínas del citoesqueleto incluida talina, paxilina, vinculina, tensina y actina. Por esto, las integrinas “integran” la MEC con estructuras del citoesqueleto y componentes de señalización en respuesta a señales extracelulares, las integrinas pueden regular funciones celulares importantes como proliferación, diferenciación, supervivencia, migración, morfogénesis y remodelación tisular. La principal función de las integrinas es mediar la adhesión de las células a la MEC, la integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ reconocen y unen a secuencias RGD (Arg-Gly-Asp) presente en diversas proteínas como fibronectina y colágena. En experimentos en ratones, la pérdida del gen codificante para la integrina con subunidad $\alpha 1$, favorecía el desarrollo rápido de artrosis espontánea. Además, se produjo un aumento del número de condrocitos muertos asociado a la pérdida de la integrina $\alpha 1$ (Loeser, 2014).

Una estrategia para evaluar *in vitro* los efectos de la mecánica en las células es encapsularlas en materiales a través de los que se transmite el esfuerzo aplicado, con estos modelos se ha demostrado que condrocitos encapsulados que se sometieron a deformación física a través de ciclos de presión-relajación modificaron el perfil de moléculas secretadas durante el cultivo (Bougault et al., 2012),

aumentó la acumulación de GAGs, col II y de células al compararlo con cultivos estáticos (Appelman et al., 2011; Soltz, 2000).

Tratamiento de lesiones del cartílago articular

Patologías del cartílago articular

Existen muchas enfermedades asociadas con el cartílago articular que pueden ser clasificadas como: traumáticas (lesiones condrales), inflamatorias (artritis reumatoide), metabólicas (gota) o degenerativas (osteoartrosis) (Demoor et al., 2014).

En el caso de lesiones, la falta de circulación colateral impide la reparación espontánea del cartílago y, con el tiempo, puede desembocar en una artrosis (Djian y Versier, 2008). En lesiones de profundidad limitada, las fisuras no alcanzan el hueso subcondral. La reparación es de mala calidad y la escasa proliferación celular no basta para reparar las fisuras. En lesiones profundas que alcanzan el hueso subcondral las capacidades de autorreparación son más eficaces, debido a la lesión del hueso subcondral se forma un hematoma y pueden llegar células mesenquimales procedentes de la médula ósea. El coagulo fibrinoso se transforma de forma progresiva en tejido fibroblástico y en condrocitos. Inicialmente predomina Col-I y forma fibrocartílago. La concentración de Col-II aumenta de forma progresiva durante 2 años y se vuelve predominante. El cartílago formado se aproxima al cartílago hialino sin igualarlo jamás, pues siempre existe un contenido importante de Col-I (Djian y Versier, 2008).

La osteoartrosis (OA) es la enfermedad reumática más frecuente a nivel mundial y una de las principales causas de dolor articular y discapacidad de la población adulta. La OA de rodilla es una enfermedad caracterizada por degeneración, pérdida del cartílago y alteración del hueso subcondral, asociado a cambios en tejidos blandos (Sánchez et al., 2011). La prevalencia de la OA incrementa con la edad, siendo mayor en mujeres que en hombres, otros factores de riesgo incluyen obesidad, traumatismos, factores genéticos, mecánicos y relacionados con la ocupación. El diagnóstico de OA es eminentemente clínico, debiendo sospechar el diagnóstico de OA de rodilla en todo paciente mayor de 50 años, que presenta rigidez matinal, crepitación ósea, dolor persistente e insidioso y engrosamiento óseo de la

rodilla. Los hallazgos radiográficos como disminución del espacio articular, osteofitos, esclerosis y quistes subcondrales, contribuyen a definir el pronóstico y manejo del paciente, siendo importante destacar que no hay alteraciones de laboratorio específicas que definan el diagnóstico de OA de rodilla (Secretaría de Salud, 2009).

El principal factor de riesgo para el desarrollo de OA es el envejecimiento, el proceso de senescencia celular se asocia con eventos como el acortamiento de telómeros, daño al ADN, estrés oxidativo y alteración de la expresión de receptores membranales (Toh et al., 2016), alterando el comportamiento metabólico celular y de respuesta a estímulos externos. En el envejecimiento diversas vías metabólicas se desregulan, afectando la homeostasis de la MEC, provocando modificaciones estructurales y alterando, en última instancia, las propiedades mecánicas del cartílago (Martin y Buckwalter, 2003). De entre las alteraciones moleculares se destaca la disminución en la concentración de hialuronano, CS y KS, provocando que los agregados de agregano disminuyan. Además, se modifica la identidad de las moléculas como el predominio del GAG CS-4, a diferencia de jóvenes donde predomina el CS-6 (Kuiper y Sharma, 2015). Las fibras de colágena aumentan el diámetro incrementando la rigidez del tejido y reduciendo la resistencia a la tensión (Rahmati et al., 2017).

Debido a que los mecanismos involucrados en el inicio y progreso de la OA no se han descrito por completo, no existe en la actualidad tratamientos que permitan restaurar el tejido dañado o detener el proceso degenerativo (D. Chen et al., 2017). Actualmente, la atención clínica se enfoca en el control del dolor y sólo en etapas avanzadas se opta por estrategias quirúrgicas, con resultados satisfactorios en pocos casos (D. Chen et al., 2017). La ingeniería de tejidos ha hecho un progreso en la reparación del tejido articular dañado, sin embargo, quedan por superar varios obstáculos.

Estrategias para el tratamiento de lesiones articulares

En la actualidad se emplean diversas técnicas para el tratamiento de la lesión articular y se enfocan en la reparación, reconstrucción o regeneración del tejido. Los métodos de reparación, como la microfractura, inducen la formación de nuevo tejido fibrocartilaginoso exponiendo el hueso subcondral y formando un coagulo de fibrina; mientras que los métodos reconstructivos, como la mosaicoplastia,

buscan cubrir la lesión con autoinjertos. Finalmente, los métodos regenerativos se basan en técnicas de ingeniería de tejidos para desarrollar condrocitos autólogos en andamios y con factores de crecimiento que inducen el depósito de matriz extracelular similar a la nativa (García-Carvajal et al., 2013) (Versier y Barbier, 2014).

Técnicas de reparación

El trasplante de periostio es una técnica muy antigua. Consiste en utilizar a las células pluripotentes de la capa celular del periostio para producir una regeneración del cartílago hialino. Brevemente, de la cara interna de la tibia se extrae un colgajo de periostio. Luego se aplica el colgajo sobre la lesión colocando su cara superficial en contacto con la lesión. Dos inconvenientes comprometen las posibilidades de reparación: por una parte, el riesgo de calcificación del cartílago a mediano plazo, probablemente por la presencia de Col-X; por otra parte, la densidad de células progenitoras disminuye con la edad. La técnica está abandonada debido al riesgo de osificación tardía (Djian y Versier, 2008).

La técnica de microfractura fue descrita en 1994. El principio de esta técnica consiste en obtener la cicatrización de un defecto cartilaginoso mediante la movilización y la estimulación de las células mesenquimales contenidas en el hueso subcondral (Versier y Barbier, 2014). En una primera etapa, las lesiones se liberan de cualquier fragmento de cartílago hasta quedar libre el hueso subcondral. En la superficie del hueso libre se realizan perforaciones de 3-4 mm de profundidad cada 2-3 mm de distancia, con las que se provoca una hemorragia que induce un coágulo fibrinohemático, después de la multiplicación y diferenciación de las células mesenquimales aparece un tejido de relleno y de sustitución que es mayoritariamente fibrocartilaginoso, con colágena tipo I (Versier y Barbier, 2014)). El apoyo se reanuda 8 semanas después con el objetivo de proteger el coágulo y permitir la proliferación, la diferenciación celular y la maduración del tejido (Djian y Versier, 2008). Se destacan dos factores desfavorables de la técnica: la magnitud de las lesiones cartilagosas erosivas (<3 cm²) y la condición del paciente, esta técnica tiene mejor pronóstico en pacientes delgados, si tienen menos de 30 años y si se aplica tras un lapso corto entre accidente y cirugía (Djian y Versier, 2008).

El injerto se indica, en general, cuando hay pérdidas de cartílago considerables. La técnica de mosaicoplastía consiste en la transferencia de una unidad anatómica y funcional de tejido osteocondral extraída de la rodilla, que se injerta en una lesión. El injerto tiene una osteointegración excelente, con presencia de cartílago hialino sobre los injertos cilíndricos, pero con una interfase cartilaginosa fibrosa. Las ventajas incluyen la formación de cartílago hialino en la zona del defecto, preservación en bloque del cartílago y de su hueso subcondral para conservar la interfase hueso cartílago. Los inconvenientes esenciales son la morbilidad del sitio donante y el riesgo de hemartrosis (Versier y Barbier, 2014).

Técnicas de regeneración

Las técnicas de regeneración se han realizado desde hace tiempo y se pueden clasificar en generaciones debido a las innovaciones que tienen en cada una de ellas. La técnica de primera generación consistía en colocar en la lesión un cultivo de condrocitos autólogos que se han multiplicado *in vitro*. El trasplante de condrocitos se desarrolló en 1988 y los primeros resultados clínicos se reportaron en 1994 (Brittberg et al., 1994). Para la implantación del cultivo se realizaba un desbridamiento de la zona de la lesión hasta el hueso subcondral, el cultivo celular en líquido se inyectaba en la lesión y se sujetaba con una cubierta de tejido que podía ser periostio o una membrana de colágena y pegamento de fibrina para evitar fugas (Djian y Versier, 2008). El resultado más importantes era el alivio del dolor, pero se presentaban complicaciones como adherencias intraarticulares, hipertrofia perióstica y deslaminación del defecto (Ortega-Orozco et al., 2018). Las biopsias realizadas demostraron que el cartílago hialino sólo estuvo presente en menos del 50% de los casos y que los condrocitos implantados perdían sus características fenotípicas, proceso asociado al uso del parche perióstico (Versier y Barbier, 2014).

Para evitar problemas de osificación, calcificaciones y fugas, en las técnicas de regeneración de segunda generación se desarrollaron matrices que actuaban como membranas artificiales. Estas matrices eran sintéticas, proteicas o de naturaleza polisacárida. El principio técnico y los plazos de cultivo eran los mismos, con sustitución del periostio por la matriz. El costo era mayor y suponía cuatro o cinco veces el precio de una prótesis total de rodilla, sin embargo, la calidad de los condrocitos implantados no era equiparable al tejido nativo (Versier y Barbier, 2014).

Las técnicas de regeneración de tercera generación siguen el principio de realizar el cultivo de condrocitos en una matriz biológica implantable artificial tridimensional con propiedades ideales: biocompatible, biodegradable, bioactiva en la conservación de las características fenotípicas, que favorezca la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular, permeable, fácil de utilizar y barata. Estas matrices deben poder recubrir superficies importantes y deben presentar propiedades mecánicas y biológicas parecidas a las del cartílago normal. La técnica consiste en extraer condrocitos (aprox. 200 mg) de una zona de cartílago sano, las células se cultivan 3-6 semanas seguido de la integración de estas células en matrices, por artroscopia se desbrida la lesión, seguido de la implantación a presión por impactación suave o con adhesivos biológicos. El objetivo consiste en obtener una superficie armoniosa sin escalones, ni ausencia de continuidad articular (Versier y Barbier, 2014).

Resultados y comparación de las técnicas

Por lo asequible de la técnica, bajos costos y mínimos efectos adversos reportados de la microfractura, lo convierte en el tratamiento predilecto para las lesiones condrales, sin embargo, los resultados clínicos son superados por otros tratamientos, p. ej. en 2018 Ortega et al. desarrollaron un estudio que comparó la eficacia clínica y la seguridad de la terapia de microfracturas (MF) versus implantación de condrocitos autólogos encapsulados en una matriz (MACI) de col I/III reabsorbible. Un año después del procedimiento, los pacientes tratados con MACI tuvieron una mejoría significativa con alivio del dolor, funcionalidad y arcos de movimiento comparado con los pacientes tratados con MF (Ortega-Orozco et al., 2018).

La investigación en el uso de MACI como tratamiento a llevado al desarrollo de materiales para ser utilizados como matrices para células; al respecto, en 2008, un estudio evaluó los parámetros clínicos, radiológicos, de artroscopia e histológicos de pacientes con lesiones condrales que fueron implantados con MACI de alginato-agarosa. Las lesiones disminuyeron en promedio de 2.7 a 0.4 cm² y en el 60% de los casos el tejido formado fue cartílago hialino. Los resultados favorables no se correlacionaban sólo con pacientes delgados y jóvenes, sino que, persistían incluso en pacientes con obesidad y de edad avanzada (Selmi et al., 2008). Para contrastar los resultados de este material con otras técnicas, en 2015 se publicó un estudio que comparó el mismo material implantado versus mosaicoplastía. Los pacientes

con mosaicoplastía tuvieron un puntaje superior en pruebas de funcionalidad y la mitad de los eventos adversos reportados respecto a los que recibieron MACI. Concluyendo que los pacientes tratados con mosaicoplastía tenían mejores resultados a mediano plazo (2 años) que los tratados con un implante de condrocitos en una matriz.

En contraste, en 2003, Bently et al. desarrollaron un estudio que comparó el injerto autólogo de condrocitos en 58 pacientes con mosaicoplastía en 42 pacientes. El 88% de los pacientes con autoinjerto de condrocitos mostró buenos resultados a 1 año, frente al 69% en el grupo de mosaicoplastía. En los pacientes con mosaicoplastía no hubo integración de los implantes con el tejido circundante, evidenciado por menor grosor del tejido implantado y estructura de la matriz diferente, sugiriendo que el tejido no está adaptado para soportar las mismas cargas mecánicas (Kish y Hangody, 2004).

Los resultados variables entre las técnicas que emplean MACI son atribuidos principalmente a la composición de las matrices en las que se encapsulan las células. Persisten dos problemas significativos: el costo y, sobre todo, el de la necesidad de una transformación *in situ* aún no dominada que, no obstante, es indispensable para la maduración del tejido. La mejora de los materiales, técnicas y procesos para la generación de tejidos *ex vivo* es el objetivo de la Ingeniería de Tejidos.

Ingeniería del tejido articular

La ingeniería de tejidos es una disciplina que combina los principios de las ciencias biológicas con la ingeniería para producir sustitutos biológicos que restablezcan la función de tejidos dañados. El principio de la ingeniería del tejido cartilaginoso implica el aislamiento de células que se expanden *in vitro* y luego se encapsulan en una matriz tridimensional para ser subsecuentemente implantadas en el sitio de lesión. Los andamios resguardan de infiltración celular, admiten la proliferación y diferenciación en respuesta a señales moleculares y estimulación mecánica, además proporcionan la resistencia mecánica inicial.

El sustituto de tejido se espera que sea biocompatible, que mantenga el fenotipo celular, que sea permeable y difunda moléculas, nutrientes y factores de crecimiento, y finalmente, que sea

biodegradable a un ritmo que permita la integración con el tejido receptor sin desproteger anticipadamente a las células que protege (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016). En la actualidad, en la clínica se emplean matrices con células para el tratamiento de lesiones articulares, sin embargo, los resultados favorables en la recuperación de la funcionalidad son limitados, lo que lleva al desarrollo de materiales, técnicas de fabricación y estrategias de cultivo que en conjunto signifiquen la obtención del sustituto de cartílago que cumpla con los requisitos.

Biomateriales

La expansión de condrocitos en cultivo es ventajosa porque supera la limitante que representa la baja densidad de población celular normal en el cartílago, requiriendo menos tejido para generar constructos de mayor tamaño. Sin embargo, la expansión de condrocitos en cultivos en monocapa tiene la desventaja de la pronta pérdida del fenotipo condrogénico, caracterizado por cambios morfológicos de células redondeadas a alargadas tipo fibroblasto, incremento del tamaño celular y decremento en la secreción de componentes matriciales específicos de cartílago. Los genes de Col-II, agregano y Sox-9 se encuentran disminuidos, mientras que los de Col-I, Col-X, Tenascina y Versicano aumentan. Los condrocitos desdiferenciados son inutilizables en la ingeniería de tejidos porque inducen la formación de fibrocartílago que carece de las propiedades mecánicas requeridas (Demoor et al., 2014).

El estado de diferenciación condrogénico es posible, hasta cierto número de pases, en cultivos 3D como en botón y células encapsuladas en andamios (Huang, Hu, y Athanasiou, 2016). El empleo de andamios se orienta a definir el espacio para el depósito de nuevo tejido y para mejorar la maduración del tejido que ha sido dirigido a crecer dentro del andamio.

Los hidrogeles son una red tridimensional de polímeros hidrofílicos que pueden absorber agua del 10-20% hasta cientos de veces su peso debido a su estructura de entrecruzamiento. La estructura porosa e hidratada permite el transporte de moléculas de bajo peso y nutrientes al interior, así como desechos al exterior fenómenos críticos en la viabilidad celular (Buckley et al, 2009). Los hidrogeles basados en biopolímeros imitan muchas de las características de la MEC por lo que tienen en potencial de dirigir la migración, crecimiento y organización de las células durante la regeneración del tejido (Balakrishnan y

Banerjee, 2011). Los biopolímeros empleados como andamios de hidrogel incluyen polisacáridos como hialuronato, condroitín sulfato, quitosano, alginato y agarosa, y proteínas como fibrina y la colágena (Liu et al., 2017; Spiller et al., 2011; Zhao et al., 2013).

Los biopolímeros difieren entre sí por su origen, composición y estructura, por lo que al formar una matriz del material la respuesta celular varía considerablemente. Cada biopolímero posee aspectos favorables y desfavorables que son más o menos trascendentales para la producción de matrices útiles que puedan ser utilizadas para la fabricación de sustitutos de cartílago hialino articular. Las categorías más valoradas, por la influencia en la respuesta celular son: la toxicidad, la adhesión al material, la difusión de sustancias, la integridad del material en cultivo, la transmisión de señales mecánicas y el efecto en el fenotipo celular.

En hidrogeles con motivos de adhesión reconocibles por los condrocitos, se induce la unión celular de forma similar a la de la MEC nativa, en consecuencia, la supervivencia de las células se incrementa con respecto a hidrogeles que carecen de los motivos de adhesión celular y la actividad metabólica de la célula se desarrolla con normalidad (Keeney et al., 2011). Los biopolímeros de proteína como fibrina y colágena son constituyentes normales de los tejidos y, por lo tanto, tienen motivos de adhesión reconocidos por las células. Los biopolímeros como agarosa y alginato no forman parte de los tejidos y las células son incapaces de adherirse a ellos. En hidrogeles de fibrina, las células se adhieren al material y al implantarlo en lesiones articulares el material se une al tejido circundante exitosamente, al comparar los andamios de fibrina con hidrogeles de alginato la producción de MEC es mayor en los primeros, aunque las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibrina no emulan las del cartílago que se busca reemplazar, lo que ha resultado en capacidades funcionales limitadas desestimulando su empleo clínico (Balakrishnan y Banerjee, 2011). En geles de Col-I sembrados con condrocitos la supervivencia, la proliferación, la producción de GAGs de los condrocitos es mayor con respecto a geles de agarosa y alginato, lo que se asocia a los ligandos de la colágena que favorecen la unión celular, en contraste la agarosa que carece de estos ligandos nativos y la proliferación celular y secreción de componentes de la MEC resulta disminuida (Miao et al., 2017).

Los condrocitos encapsulados depositan componentes de la MEC, la acumulación de los componentes está influenciada por las propiedades físicas, como permeabilidad, porosidad y difusión, de los constructos. Los hidrogeles de alginato y agarosa ponen resistencia a la difusión de grandes moléculas, y resulta en la acumulación de los componentes de matriz secretados en la región pericelular (Zhao et al., 2013). En constructos de agarosa con condrocitos embebidos, después de 20 días de cultivo se observan tanto células aisladas como múltiples grupos de células rodeados por una matriz densa con abundantes GAGs sulfatados. En cambio, en constructos de alginato, colágena y fibrina se observan células aisladas y algunos grupos pequeños, con la matriz menos densa y extensa (Mouw et al., 2005).

La desdiferenciación de los condrocitos en cultivo se caracteriza por cambios morfológicos y de secreción de componentes matriciales específicos de cartílago. Células cultivadas en gelatina, que es colágena desnaturalizada, muestran una morfología alargada tipo fibroblasto (Awad et al, 2004), mientras que en geles de agarosa, alginato, Colágena y Fibrina tienen morfología redondeada, similar a la de los condrocitos en su matriz nativa (Mouw et al., 2005). La capacidad de interacción entre el andamio y las células podría explicar las diferencias morfológicas, ya que el confinamiento de las células en hidrogeles no permite la extensión de la célula, mientras que en la gelatina las células se adhieren y modifican su morfología predominando la forma “fibroblástica” (Awad et al., 2004).

En relación con el perfil molecular secretado por las células en cultivo, en geles de alginato y agarosa se ha observado que predomina la síntesis de Col-II sobre Col-I; por el contrario, los geles de gelatina y fibrina inducen un mayor depósito de Colágena tipo I, lo que conduce hacia la formación de fibrocartílago (Leddy et al., 2004). El análisis de los GAGs depositados en la matriz ha demostrado que condrocitos embebidos en geles de agarosa muestran un perfil más cercano a los encontrados en el cartílago nativo, respecto a otros polímeros como Fibrina, Colágena y alginato (Mouw et al., 2005).

Agarosa

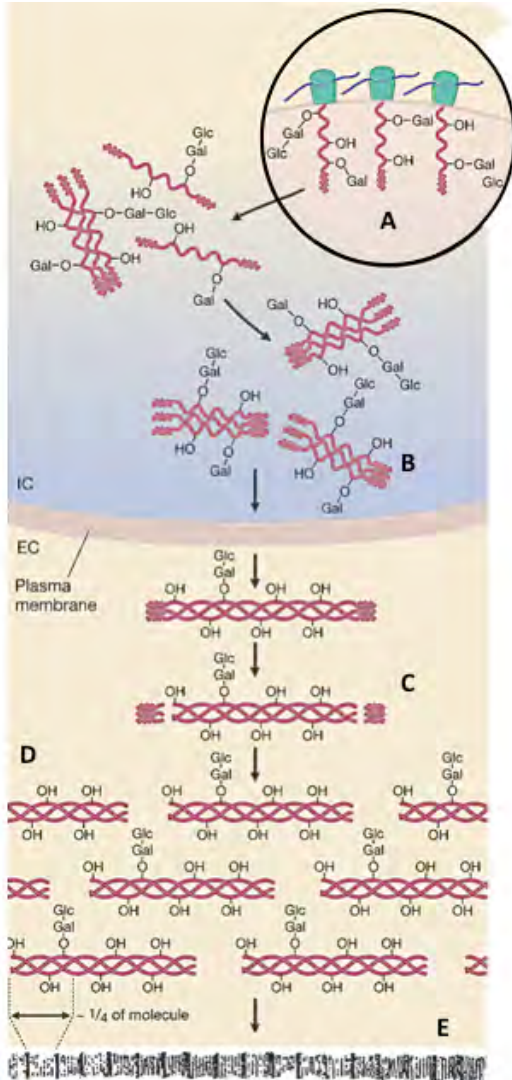
La agarosa es una familia de polisacáridos extraídos de algas marinas rojas, está compuesto de secuencias alternantes de 3,6-anhidro- α -L-galactosa y β -D-galactosa. La agarosa es soluble en agua a

temperaturas mayores de 65°C y gelifica en el rango de 17-40°C dependiendo del grado de sustituciones hidroxietil en las cadenas laterales.

El empleo de agarosa como andamio está relacionado con que el proceso de fabricación y encapsulación es fácil, además los geles tienen forma definida a 37 °C, no poseen cargas eléctricas, es decir, por ser eléctricamente neutros y no son sensibles a cambios de pH (Zhao et al., 2013). Una de las principales razones del uso de geles de agarosa es el control de la rigidez del material que depende de la concentración. Se ha observado que los condrocitos encapsulados en geles de baja concentración de agarosa (poco rígidos) tienen un perfil metabólico similar a un proceso de OA, en contraste, al ser encapsulados en geles de alta concentración el perfil metabólico se asemejaba al del cartílago sano (Jutila et al., 2015). La facilidad de fabricación de los geles y la relación concentración-rigidez permitió desarrollar una técnica de construcción de constructos cartilagosos de agarosa por capas, en el que produjeron constructos con propiedades mecánicas variables de acuerdo con la profundidad, con el objetivo de replicar la variación de las propiedades mecánicas y la distribución de los condrocitos dependiendo de la profundidad en el cartílago (Ng et al., 2009). Una aplicación interesante de los geles de agarosa son los ensayos en los que se desea transmitir cargas mecánicas al cultivo de condrocitos, ya que se ha demostrado que los cultivos a los que se aplica cargas dinámicas depositan más GAGs sulfatados y Col-II si se comparan con andamios estáticos (Soltz, 2000).

Uno de los principales inconvenientes del uso de agarosa como polímero para la fabricación de matrices es su falta de sitios de adhesión reconocibles por las células; dado que la interacción célula-matriz determina el destino celular, la falta de secuencias de adhesión restringe la respuesta celular de los condrocitos (Miao et al., 2017). Por esta razón, Yamada et al. conjugaron péptidos bioactivos de laminina a quitosán, alginato y agarosa, y fabricaron geles en los que sembraron células neuronales y observaron cambios en la morfología que se asociaban no sólo a la adhesión de las células sino también a variaciones en la rigidez de los geles (Yamada et al., 2012). Ellos concluyeron que las matrices de agarosa con rigidez variable asociada a la concentración son superiores en el cultivo de células si se funcionalizan para que las células puedan adherirse.

Colágena



La colágena es una glicoproteína estructural y es el principal constituyente de la MEC. Se han descrito 29 diferentes tipos de colágena, basados en su arquitectura se clasifican como fibrilares, red y FACIT (Shoulders y Raines, 2009).

Las colágenas tipo I, II, III, V y XI se ensamblan en fibras, que consisten en triples hélices ininterrumpidas de 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro. El ensamble y depósito de fibras de colágena en estructuras y organización específica involucra eventos en compartimentos intracelulares y extracelulares, en el retículo endoplásmico celular se sintetizan cadenas de pre-procolagena, que se hidroxilan, glicosilan (figura 7A) y se ensamblan en una triple hélice formando la procolágena (figura 7B), la que es secretada al medio extracelular donde se remueven los telopéptidos terminales de la molécula no helicoidales generando tropocolágena (figura 7C) que espontáneamente se alinean en fibras y se estabilizan por enlaces covalentes (figura 7D)

(Wolff et al., 2008). Por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observan en las colágenas fibrilares estriaciones simétricas en el eje axial debido a que la tropocolágena se asocia lateralmente con un retraso de 234 aminoácidos equivalente a 67 nm (figura 7E) (Williams et al., 1978).

Es posible aislar y purificar a la colágena de diversas fuentes (cola de rata, tendón bovino, piel de cerdo, etc.) e inducir posteriormente su polimerización *in vitro*. Las condiciones como pH, saturación de sales y temperatura son determinantes en la formación de la fibra de colágena y las variaciones de estas

Figura 7. Síntesis de procolágena en el espacio intracelular (IC) y ensamble de las fibras de colágena en el espacio extracelular (EC). Modificado de Fitzpatrick, 2014)

condiciones afectan la morfología de las fibras, alterando la continuidad, uniformidad y el patrón de bandeo característico (Williams et al., 1978).

Los métodos de aislamiento de la colágena se clasifican según el tipo de solución empleada para extraer la proteína: con soluciones salinas, ácidas y alcalinas. La eficiencia para extraer la molécula varía con el método, y en este sentido, las soluciones salinas de hidróxido de sodio (0.15-2 M) o ácido acético diluido permiten la extracción de colágena recién sintetizada y poco entrecruzada en los tejidos, sin embargo, la fracción de colágena extraíble por este método es mínima. En contraste, los solventes ácidos son más eficientes en la extracción respecto a soluciones salinas ya que el entrecruzamiento de aldaminas es disociado por ácidos y las cargas de repulsión en la triple hélice conducen al hinchamiento de las estructuras fibrilares provocando su disociación; las soluciones ácidas no disocian el enlace ceto-imina, por lo tanto, los tejidos con alto contenido de este tipo de enlaces como el hueso, cartílago o el tejido obtenido de animales viejos tienen menor solubilidad en soluciones ácidas. Con las soluciones alcalinas la grasa del tejido es saponificada, las regiones telopeptídicas de la colágena son escindidas y la fibra de colágena es desintegrada. El material resultante, llamado atelocolágena, se beneficia de la remoción de los determinantes antigénicos localizados en la región no helicoidal y, por otro lado, el tamaño y el peso de la colágena resultante depende del tiempo y la concentración del alcalino. La colágena aislada de esta manera se considera un material seguro y apropiado para implantarse o como biomaterial inyectable (Friess, 1998; Parenteau-Bareil et al., 2010).

Las fibrillas de colágena aisladas se autoensamblan en fibras helicoidales con propiedades similares a las fibras nativas de colágena, sólo es necesario ajustar el pH y la temperatura de la solución para que se forme un hidrogel de colágena. Las propiedades del hidrogel dependen del método por el que se extrajo la colágena y de la concentración de la solución (Kreger et al., 2010).

Los condrocitos cultivados en hidrogeles de colágena tipo I o II interactúan con el andamio a través de integrinas, lo que promueve su proliferación y la producción de MEC cartilaginosa y en contraparte el andamio es remodelado a través de la secreción de colagenasas (Glowacki y Mizuno, 2008). Se ha demostrado que condrocitos cultivados en matrices de Col-I se mantienen viables y pueden secretar componentes extracelulares específicos de cartílago al ser, lo que implica que la Col-I es un biomaterial competente en la regeneración articular (Balakrishnan y Banerjee, 2011; Miao et al., 2017^a; Yuan et al., 2014).

Es importante considerar que las soluciones comerciales de colágena tienen una menor concentración de colágena (<4 mg/mL) respecto a un tejido nativo, por lo que los hidrogeles formados son modelos del tejido limitados puesto que no tienen la microestructura ni la resistencia fisiológica, que resulta en la incapacidad de emplearse como materiales aislados en la fabricación de constructos. El incrementar la concentración de las soluciones de colágena no resuelve el problema, ya que, geles con concentración mayor a 20 mg/mL forman estructuras densas que no permiten ni la viabilidad ni la migración celular (Antoine et al., 2014). Así, una alternativa es emplear geles de colágena en combinación con otros materiales que aporten en la estructura y mecánica de los geles. Al respecto, se realizaron pruebas con geles de gelatina-metacrilato con diferentes grados de rigidez, la misma densidad de secuencias RGD y la misma concentración de gelatina. La rigidez se incrementó con la adición del metacrilato y cuando se sembraron condrocitos en los geles más rígidos mostraron morfología redondeada y secretaron mayor cantidad de matriz tipo cartilaginosa y tuvieron mayor expresión de Col-II y Agrecano comparados con los geles de media y baja rigidez (Li et al., 2016).

Objetivo general

Generar un sustituto de cartílago hialino articular a partir de andamios de colágena/agarosa y condrocitos de cerdo.

Objetivos particulares

- Establecer el cultivo de condrocitos primarios a partir de cartílago articular de cerdo.
- Determinar las concentraciones de agarosa que permitan la formación de fibras de colágena en la matriz por medio de la evaluación con microscopía electrónica de barrido.
- Evaluar la sobrevivencia de condrocitos cultivados en matrices de colágena/agarosa.
- Comparar la morfología de condrocitos encapsulados en las matrices colágena/agarosa a través de microscopía electrónica de barrido.
- Analizar la presencia de glucosaminoglucanos y proteoglucanos sulfatados secretada por condrocitos cultivados en matrices de colágena/agarosa con las tinciones de azul alcian y hematoxilina y eosina.
- Demostrar la producción de pro-colágena II en condrocitos encapsulados en matrices de colágena/agarosa con ensayo de Inmunohistoquímica.

Antecedentes

Los condrocitos cultivados en constructos tridimensionales modifican su perfil secretor, su interacción con la colágena (que es un componente nativo de la matriz extracelular) es a través de secuencias que los receptores de los condrocitos reconocen y se adhieren, proliferando y secretan matriz extracelular. Las propiedades mecánicas de los geles de colágena no asemejan al cartílago nativo, atribuyéndose a este factor que el tejido formado no iguale las propiedades del cartílago. Es posible modificar la rigidez de geles de colágena cambiando la concentración de los monómeros de colágena; sin embargo, dichos cambios modifican la cinética de gelificación, el número y diámetro de las fibras, la porosidad y la densidad de sitios de unión, lo que en última instancia afecta la viabilidad celular del cultivo.

Una estrategia para modificar la rigidez del constructo es el entrecruzamiento químico de la colágena o con radiación UV y gamma; sin embargo, la velocidad, costos y citotoxicidad significan limitantes experimentales. La alternativa es combinar materiales que modifiquen la rigidez sin alterar en demasía las propiedades de la colágena, la adición de sacáridos con carga negativa como el dermatán sulfato modifica la cinética de ensamble y gelificación de la colágena. En cambio, al agregar agarosa no se modifica la cinética de ensamble, ni la arquitectura fibrilar, además de que no es incorporado a la estructura fibrilar (Nomura, 2009).

La adición de agarosa reduce el tamaño de la red de colágena y restringe el movimiento de las fibras. Además, la agarosa incrementa la retención de agua y disminuye la permeabilidad fluidos, por lo tanto, resiste la pérdida de volumen. En conjunto, las propiedades elásticas y viscoelásticas de los geles se ven alteradas. Por esta razón, el constructo de colágena-agarosa se ha emplea como modelo para evaluar las interacciones entre la colágena y la matriz no fibrilar de la MEC (Lake y Barocas, 2011).

Por las características señaladas anteriormente, la practicidad y economía de los geles de colágena/agarosa se han evaluado en diversos modelos celulares. Las células de glioma en esferas de colágena a diferentes concentraciones migran de forma constante, a diferencia de los geles de sólo agarosa en los que no hay migración celular, esto demuestra que las señales de adhesión de la colágena son necesarias y suficientes para la movilidad celular. En el modelo con colágena/agarosa el aumento

de la concentración de agarosa se asoció a la inhibición de la migración, resultado del creciente contenido de agarosa que reduce el tamaño de malla de la matriz, que a su vez restringe el movimiento de las fibras de colágeno y de las células (Ulrich, 2010).

Las células mesenquimales embebidas en microesferas de agarosa y colágena I, se distribuyen de manera uniforme y tienen sobrevivencia de entre 75-90% en todas las condiciones, la muerte se atribuye al proceso de fabricación. La morfología difiere conforme a la concentración de agarosa, siendo más alargadas a menor concentración de agarosa y redondeadas sin proyecciones citoplasmáticas en la mayor concentración (Batorsky et al., 2005).

Metodología

Cultivo de condrocitos

Cultivo primario

Las muestras de tejido cartilaginoso se obtuvieron de lechones de 14-16 días de edad que fueron puestos en punto final de acuerdo con las normas NOM067-ZOO del año 2007. Brevemente, los lechones fueron sedados con azaperona a una dosis de 2 mg/kg para realizar el manejo preoperatorio. A continuación, se indujeron con tiletamina- zolazepam 7.5 a 25 mg/kg por vía intramuscular. Se indujo un plano anestésico profundo con pentobarbital sódico a 30 mg/kg por vía intravenosa y finalmente se provocó paro cardíaco mediante una inyección intravenosa de una solución saturada de cloruro de potasio a efecto. Todo el procedimiento fue supervisado por un médico veterinario.

El tejido cartilaginoso se obtuvo de la rodilla de la extremidad trasera del cerdo, se lava 2 veces con solución de Hanks antibiótico 1%, posteriormente en medio DMEM libre de suero se procesó hasta obtener fragmentos de aproximadamente 3x3 mm, a los que se agregó colagenasa tipo II al 0.3% en medio DMEM. Las muestras se dejaron incubando 2-4 horas a 37°C, posteriormente 12-14 horas a 4°C, se recogió el sobrenadante que se colocó en un tubo y se centrifugó a 1250rpm por 10 minutos. Los fragmentos no digeridos se colocaron en colagenasa recién preparada y se dejaron incubar por 5 horas más, transcurrido el tiempo se repitió el proceso de recolección.

Las células obtenidas de la digestión fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo que consistió en DMEM 10% SFB y 1% antibiótico (Ab). El cambio de medio se realizó cada 3 días.

Expansión celular

Al llegar a confluencia se despegaron las células del plato de cultivo con 3 mL de tripsina-EDTA 0.25% por 5 minutos a 37 °C. A través de un ensayo con homodímero de etidio se determinó la densidad y

viabilidad celular, se resembró a una densidad de 7×10^3 células/cm². Al llegar a 95% de confluencia las células se resembraron con objeto de expandir la población.

Con el ensayo de viabilidad celular se obtuvo el promedio de células vivas respecto al total de células, y un promedio de la técnica. El conteo final para la densidad celular se realizó a través de un software que permite distinguir células vivas de muertas, por lo que se tomaron 4 muestras y se promedió el resultado.

Preparación de constructos

Procedimiento de elaboración

Los andamios fueron elaborados con Colágena hidrolizada de cerdo tipo I (concentración de 7.5 µg/µL) de extracción ácida y agarosa con baja temperatura de fusión (Sigma): La concentración de cada componente está colocada en el cuadro 1.

Cuadro 1. Concentraciones finales de los geles de agarosa/colágena.

Código	Colágena (µL)	Agarosa (mg)
Col10Ag5	100	5
Col10Ag10	100	10
Col10Ag15	100	15
Col20Ag5	200	5
Col20Ag10	200	10
Col20Ag15	200	15

Los andamios tuvieron un volumen final de 1 mL, de ese total 250 µL correspondieron a la solución de agarosa en PBS, 100 o 200 µL de colágena, para la neutralización de colágena se agregaron 6 µL de NaOH 1M por cada 100 µL de colágena, 400 µL de 2X DMEM concentrado, 100 µL de la suspensión con células a una densidad de 10×10^6 células/mL en medio, en caso de los geles sin células se agregó sólo el medio. El volumen se completó con PBS.

Para la elaboración de los andamios se utilizó un molde de cilíndrico de polipropileno resistente a altas temperaturas con tapa de rosca. En él se pesó, en una balanza analítica, la agarosa, se agregó el volumen de PBS y se esterilizó por autoclave a 120°C por 20 minutos. En condiciones estériles y previo a la gelificación de la agarosa se agregó el medio concentrado, el PBS y el NaOH, la colágena tipo I, por último, se agrega la suspensión de células. Se tapó y resuspendió la solución en vortex a una velocidad media durante 15 s. Se dejó reposar a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó 30 minutos a 37°C, finalizando con 5 minutos a 4°C.

Cada gel se seccionó en 6 rebanadas de aproximadamente 4 mm de diámetro por 2 mm de alto. Cada rebanada se transfirió a un pozo de una placa de 48 pozos. A cada pozo se le agregaron 800 µL de medio de cultivo. El cambio de medio se realizó cada 48 horas. Se realizaron tres repeticiones y dos réplicas por condición experimental. Cada rebanada se analizó a 1, 7, 14, 21 o 28 días, se retiraron de la placa de cultivo de forma aleatoria.

Viabilidad de condrocitos en geles

Se retiró el medio y se lavó con solución de Hanks tres veces. En 1 mL de Hanks se colocaron 0.5 µL de calceína y 1 µL de homodímero de etidio. Se incubaron los andamios con la solución 30 minutos a 37°C y en oscuridad. Se realizó un lavado con Hanks y se observó con el microscopio invertido de fluorescencia. La calceína AM genera un producto que fluoresce en color verde en las células vivas mediante la actividad inespecífica de las enzimas esterases, mientras que el homodímero de etidio fluoresce en color rojo en las células muertas ya que penetra en las células que tienen la membrana dañada.

Análisis cuantitativo de las muestras

Para la cuantificación de la marca para células vivas y muertas se tomaron fotomicrografías de los cortes histológicos a través del software NIS-ElementsF con una cámara digital Nikon®DS-F que se encuentra acoplada a un microscopio vertical Nikon®Eclipse 80i, por cada muestra se tomaron 3 campos aleatorios 10x, en total de cada condición de cultivo se analizaron 12 imágenes. En cada imagen

se contó el número de células con marca verde (vivas) y el número de células con marca roja (muertas) y se obtuvo el porcentaje de células vivas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%Células\ vivas = \frac{No.\ células\ con\ marca\ verde}{No.\ células\ con\ marca\ verde + No.\ células\ con\ marca\ roja} * 100$$

El porcentaje de células muertas se obtuvo:

$$\%Células\ muertas = 100 - \%Células\ vivas$$

Análisis histológico

Se retiró el medio y se lavó con solución PBS tres veces y se fijaron en formaldehído al 10% en PBS por 1 hora, al cabo de este tiempo se montaron en casetes para técnica histológica y se conservaron en PBS.

Técnica histológica

La técnica histológica consistió en la inclusión de los tejidos en parafina, para su posterior corte y fijación de este al portaobjetos. La inclusión implica una deshidratación gradual en alcoholes de gradación creciente. La inclusión se realiza en parafina líquida que al solidificar permite los cortes de las muestras. Los cortes de 5 µm se realizan con micrótopo y se adhirieron a portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

Las muestras se desparafinaron y se trataron con colorantes para generar las tinciones: azul alcian, Masson y hematoxilina-eosina.

Análisis cuantitativo de las muestras

Para la cuantificación de la marca positiva para la tinción de azul alcian se tomaron fotomicrografías de los cortes histológicos a través del software NIS-ElementsF con una cámara digital Nikon®DS-F que se encuentra acoplada a un microscopio vertical Nikon®Eclipse 80i, por cada muestra se tomaron 3

campos aleatorios 10x, en total de cada condición de cultivo se analizaron 12 imágenes. En cada imagen se contó el número de células con marca azul y el número de células sin marca y se obtuvo el porcentaje de células secretoras de GAG's de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%Células sGAG's = \frac{No. células con marca azul}{No. células con marca azul + No. células sin marca azul} * 100$$

Para la cuantificación del área por cada muestra se tomaron 5 campos aleatorios 40x, en total de cada condición de cultivo se analizaron 20 imágenes. En cada imagen a través del software Image-Pro Plus 7.0 se cuantificó el área de marca azul para cada célula. Las muestras de 1 día de cultivo se cuantificó el área de la célula.

Inmunohistoquímicas

Los cortes se desparafinaron introduciendo los portaobjetos con el corte en una estufa a 70°C durante 20-30 minutos y se colocaron en un baño de 5 minutos en xilol, se rehidrataron en serie de alcoholes de concentración descendente que consiste en baños por 3 minutos en xilol, alcohol absoluto 1 (100%) y alcohol absoluto 2 (100%); en los alcoholes de 90%, 80% y 70% se dieron 30 baños en cada uno, al finalizar se introdujeron en agua destilada.

Se colocaron 30 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% 10 minutos para inhibir la peroxidasa, se realizaron 3 lavados con PBS. Se permeabilizaron las membranas celulares con 30 µL de solución PBS con albúmina y Tween 20 durante 10 minutos.

Los anticuerpos primarios, ver cuadro 2, se diluyeron en PBS-albúmina se incubaron a 4°C por 18 h, se lavaron 3 veces por 3 minutos con PBS, un lavado de PBS albúmina por 10 minutos y se colocó el anticuerpo secundario que se incubó 30 minutos a 37°C. Se lavó con PBS y colocaron 30 µL del cromógeno 3-3, diaminobencidina por 10 minutos, se lavó y contratiñó con hematoxilina de Harris.

Cuadro 2. Listado de anticuerpos y su concentración.

Anticuerpo primario	Concentración	Anticuerpo secundario
Pro-colágena II (Abcam)	1:50	Ratón (IgG)
Colágena X (Abcam)	1:50	Ratón (IgM)

El control negativo de la inmunohistoquímica se llevó a cabo de la misma manera, excepto la incubación con el anticuerpo primario que fue sustituida por PBS/albúmina. La ausencia de coloración café evidenció que no se trató de un depósito inespecífico, sino de reconocimiento de las moléculas en los tejidos.

Análisis cuantitativo de las muestras

Para la cuantificación de la marca positiva Col-X y Pro-Col II se tomaron fotomicrografías de los cortes histológicos a través del software NIS-ElementsF con una cámara digital Nikon®DS-F que se encuentra acoplada a un microscopio vertical Nikon®Eclipse 80i, por cada muestra se tomaron 5 campos aleatorios, en total de cada condición de cultivo se analizaron 20 imágenes.

A través del software Image-Pro Plus 7.0 se caracterizaron las zonas identificadas como positivas, el parámetro adquirido fue la densidad óptica integrada (IOD). En cada imagen se calibró el parámetro espacial para el que se tomó como referencia la barra de medida de la fotomicrografía. Una vez calibradas las imágenes se seleccionó en cada imagen la zona positiva y el rango de color 8-32 (8 bits) definido en el sistema HSI, después se generó el conteo por el programa y los datos se exportaron a Excel para su procesamiento.

Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de células secretoras de GAG's, área, y de IOD se analizaron estadísticamente para determinar si existen diferencias entre las diferentes edades, las pruebas fueron ANOVA de una vía y un HSD de Tukey.

Microscopía de barrido

Las muestras con y sin células fueron lavaron 3 veces con solución tampón de cacodilatos y se fijaron por 1 hora en glutaraldehído al 2.5% y nuevamente se lavaron tres veces. Posteriormente, fueron deshidratadas en series de alcohol de concentración creciente comenzando en 30%, aumentando en 10% hasta llegar a alcohol absoluto. Las muestras fueron sometidas al proceso de secado crítico y se montaron en cinta de carbono con el objeto de ser recubiertas con oro coloidal. Finalmente, las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido HITACHI-SU1510.

Resultados

Cultivo de condrocitos

Cultivo primario

Como ya se comentó en la sección de metodología, las muestras de cartílago articular fueron tomadas del cóndilo femoral de cerdo de 14 días de edad y digeridas con colagenasa para liberar las células de la matriz. El producto de la digestión fue transferido a placas de cultivo donde las células terminaron de digerir la matriz de ácido hialurónico hasta adherirse a la caja de cultivo. En la figura 8 se puede observar la morfología redondeada de las células que no se han adherido, mientras que las adheridas tienen una morfología extendida.

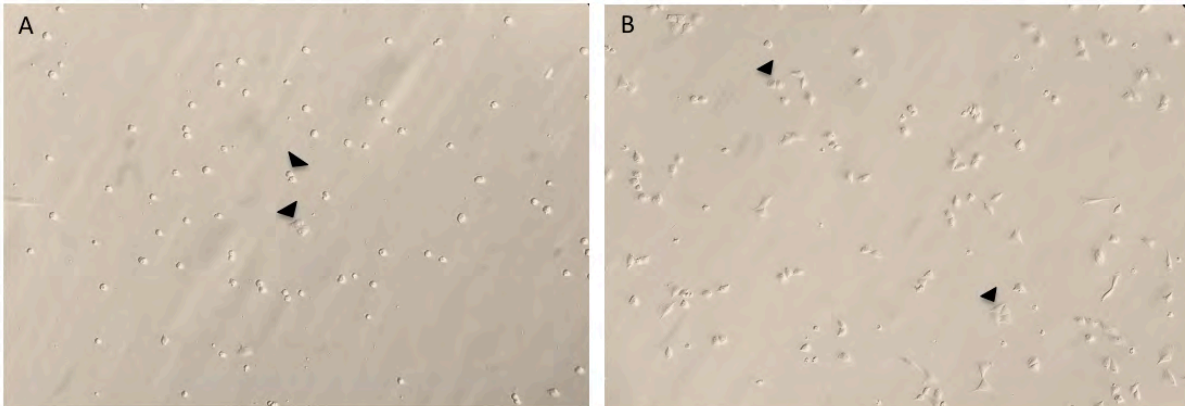


Figura 8. Condrocitos de cartilago articular en cultivo fase 0. La imagen A es un cultivo a 24 horas de ser transferido una caja Petri, las cabezas de flecha señalan células adheridas a la superficie de la caja. El resto de las células conserva una morfología redondeada y se observa en un plano diferente. La imagen B es el cultivo después de 36 horas de haber sido transferido, las células están adheridas.

Al llegar a confluencia las células se desprenden mediante tratamiento con tripsina-EDTA, se contaron y congelaron. Se obtuvieron aproximadamente 30 millones de células con una sobrevivencia del 96%. El promedio las células alcanzan la confluencia a los 12 días.

Expansión celular

El proceso de expansión consistió en descongelar las células, contar y determinar viabilidad, el porcentaje promedio de sobrevivida al proceso de congelación fue del 77.4%. Se sembró en cajas Petri a una densidad promedio de 7,800 células/cm². La figura 9 muestra un cultivo en pase 1 a través del tiempo, cabe destacar que la morfología de las células cambió gradualmente de redondeada a alargada.

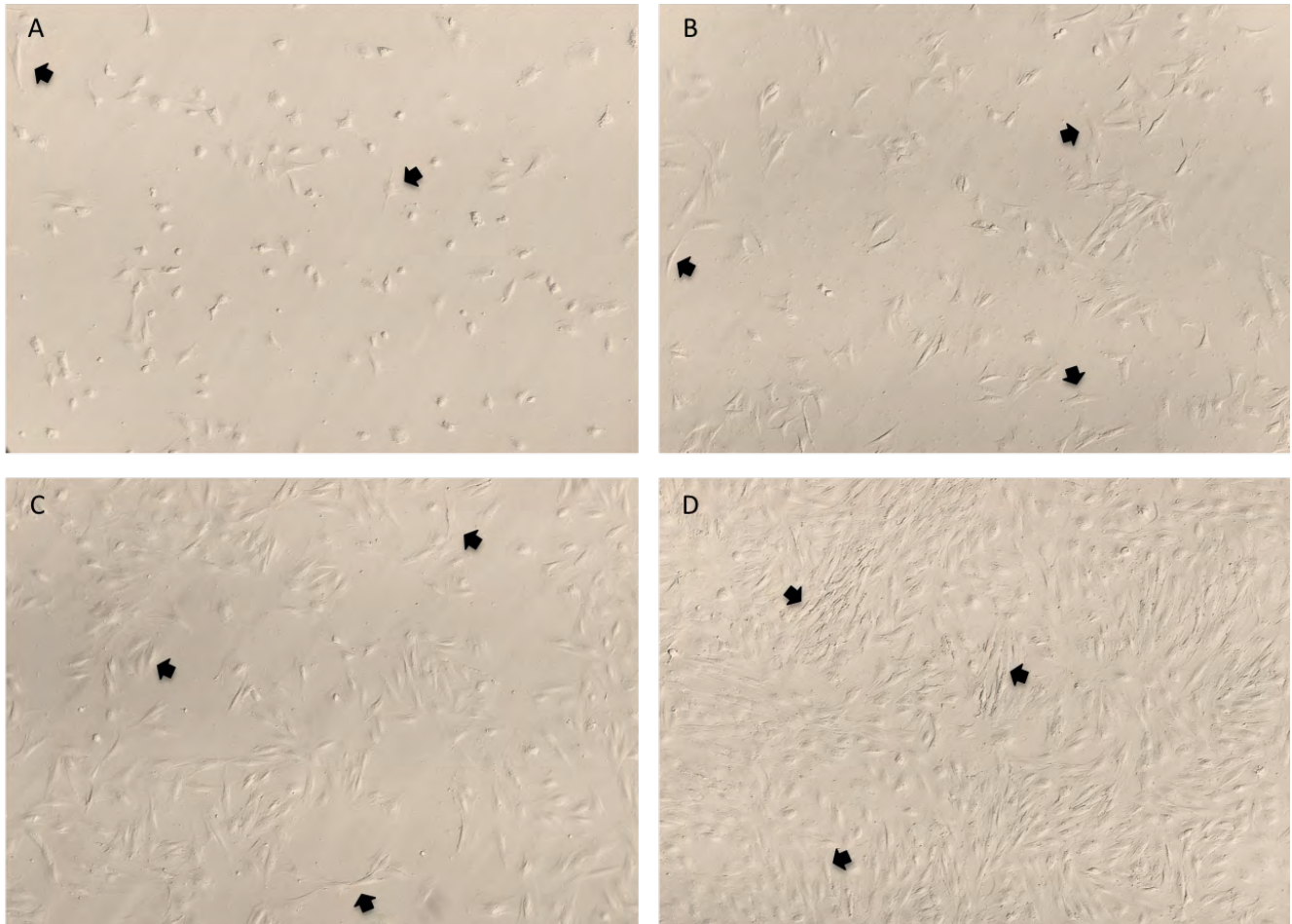


Figura 9. Cultivo 1 de condrocitos articulares en pase 1. La imagen A corresponde a 1 día der ser sembrado, B a 3 días, C a 6 días y D a 9 días cuando se lleo a confluencia y se dio pase. Puede notarse el cambio gradual en la morfología de las células de ser redondas a ser alargadas (flecha).

En promedio los cultivos alcanzan la confluencia a los 10 días, y al llegar a confluencia se tripsinizan, cuentan y se determina la viabilidad. En promedio se tuvo una densidad final 49 mil células/cm². El

promedio de sobrevivencia en promedio fue de 96%. La densidad de sembrado para pase 2 fue de 7,600 células/cm². La figura 10 muestra las células en cultivo en pase 2 a lo largo del tiempo.

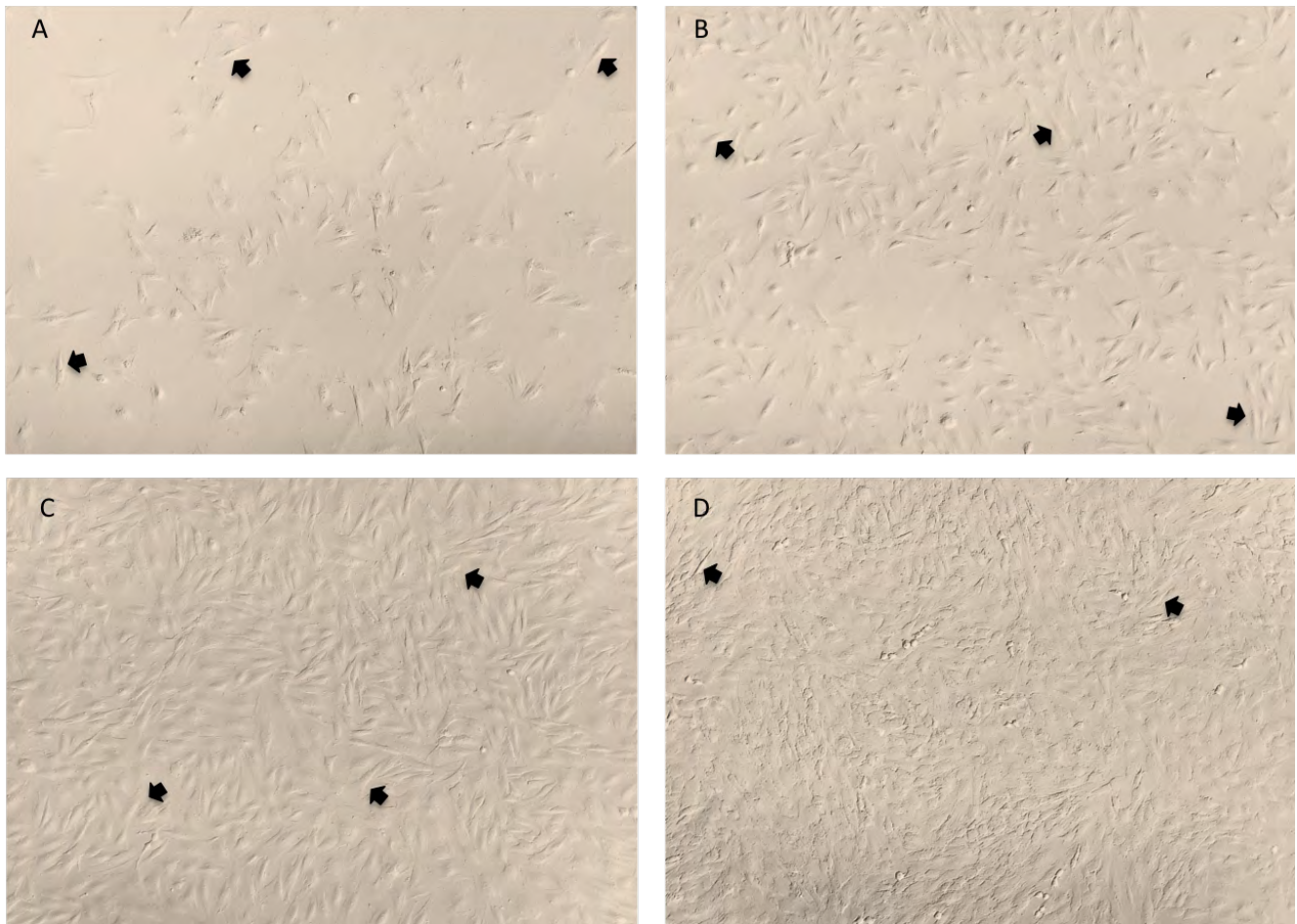


Figura 10. Cultivo 1 de condrocitos articulares en pase 2. La imagen A corresponde a 1 día de ser sembrado, B a 6 días, C a 9 días y D a 12 días. Pueden notarse que la morfología de las células es más alargada conforme el tiempo pasa (flecha).

El promedio de días hasta llegar a confluencia fue de 11.4. Al llegar a confluencia se tripsinó, contó y determinó viabilidad. La densidad promedio fue de 76,000 células/cm². La viabilidad promedio fue de 96.8%. En este pase las células se utilizaron para el proceso de encapsulación.

Preparación de constructos

Como parte de la estandarización para elaborar los geles, resultaba de particular interés el conocer si los procesos de polimerización de la colágena y la agarosa no se obstaculizaban entre sí, y además de

determinar si la distribución del material es homogénea en el gel. Para esto se generaron constructos con 0.0, 0.2, 0.5, 1.5 y 2% de agarosa y 250 μ L de colágena, y se verificó por microscopía electrónica de barrido, distribución y organización de las de fibras de colágena. La figura 11 muestra los resultados obtenidos.

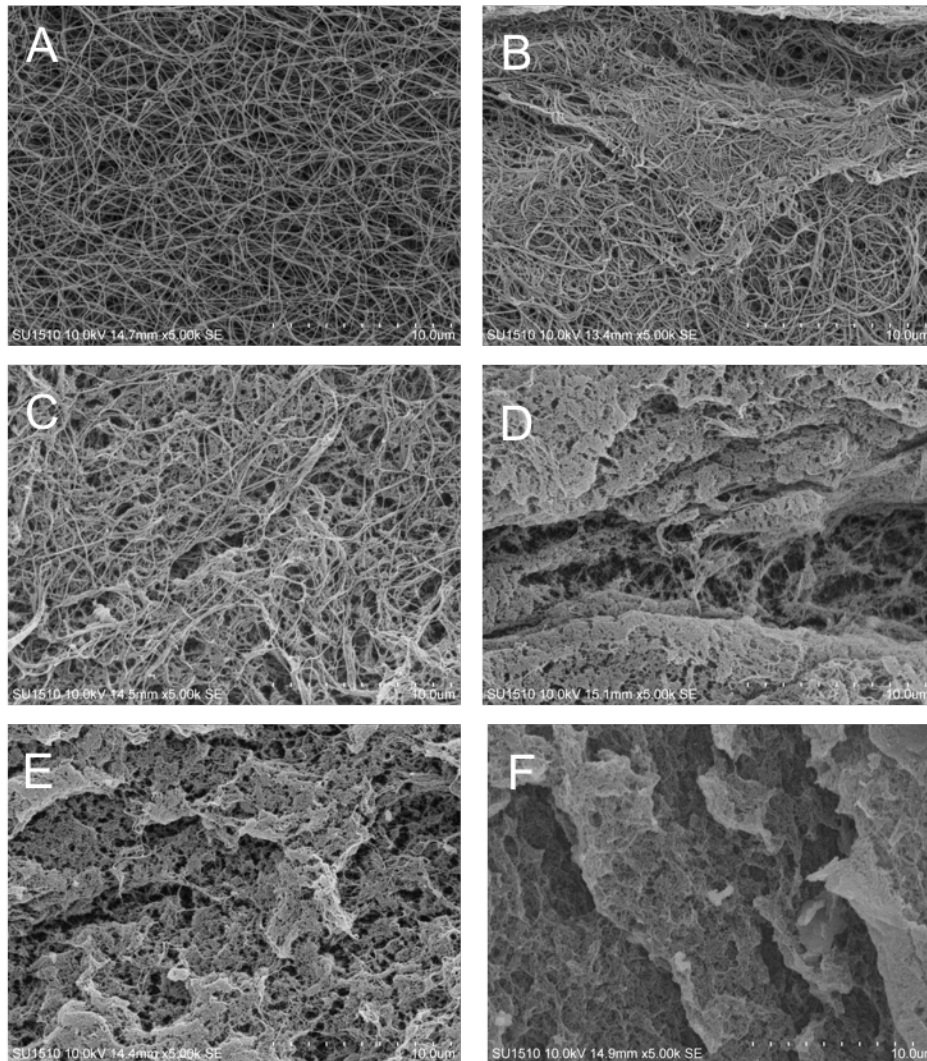


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de geles de colágena-agarosa. En A se muestra el constructo de sólo colágena, se observan fibras independientes, no compactas y de diámetro homogéneo. En B constructo de colágena con 0.2% de agarosa, se pueden notar fibras engrosadas respecto al panel A. En C en el constructo de colágena con 0.5% de agarosa pueden notarse que las fibras de colágena están recubiertas por la agarosa y compactadas. En D el constructo de colágena y 1.5% de agarosa, muestra las fibras integradas con agarosa, sin embargo, se observan fibras formadas. En E muestra el constructo de colágena y 2% de agarosa, donde se distinguen algunas fibras, y predomina agarosa. En el panel F muestra constructo con 2% de agarosa y sin colágena puede notarse la textura suave y compacta de la agarosa. Todas las micrografías fueron tomadas a 5000x aumentos.

A partir de estos resultados se definieron las concentraciones 0.5, 1 y 1.5% de agarosa que no obstruyeran la polimerización de la colágena.

Utilizando la metodología descrita se elaboraron los constructos. Los andamios midieron en promedio 1.71 cm de largo, la figura 12 es un constructo Col20Ag10.

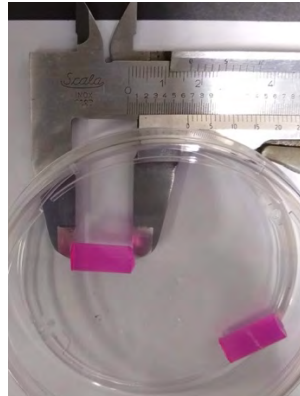


Figura 12. **Constructo de Colágena/Agarosa con células.** Todas las matrices fueron medidas previo a su sección.

La figura 13 muestra la distribución de la longitud de los constructos.

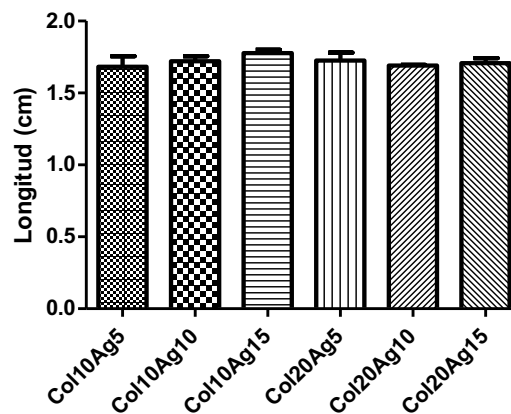


Figura 13. **Análisis de la longitud de constructos de colágena/agarosa.** Las diferentes condiciones y proporciones no influyen en el volumen y, por tanto, la longitud del constructo.

El análisis estadístico con la prueba ANOVA arroja que los datos no tienen variación significativa entre las diferentes condiciones de construcción. Lo que implica que las diferentes proporciones de colágena y agarosa no afectan el volumen del constructo.

Análisis de viabilidad

Una vez encapsuladas las células se comenzó el cultivo de los constructos, en los días 1, 7, 14, 21 y 28 se obtuvieron muestras en las que se realizó el ensayo de vida y muerte. Las figuras 14 y 15 muestran los resultados del ensayo. En la figura 16 se presenta la gráfica del porcentaje de células vivas por días de cultivo.

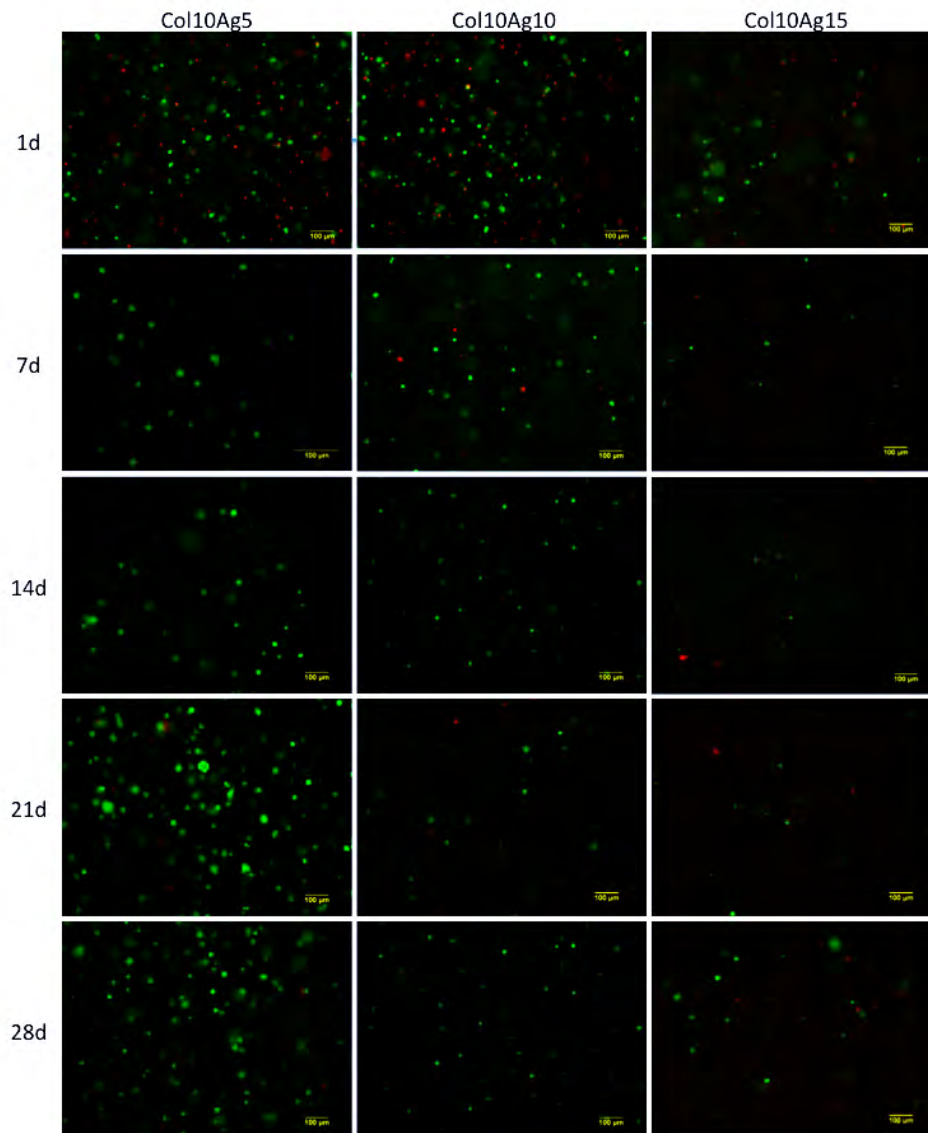


Figura 14. Ensayos de vida y muerte al día 28 días en constructos con 100 µL de colágena 10x. La fluorescencia en color verde, debido a calceína, corresponde a células vivas, la fluorescencia en color rojo corresponde a células muertas. Después de 1 día del proceso de encapsulación la mortalidad fue alta en todos los casos, sin embargo, al seguir el cultivo la proporción de células muertas disminuyó. En todas las muestras la morfología celular fue redondeada.

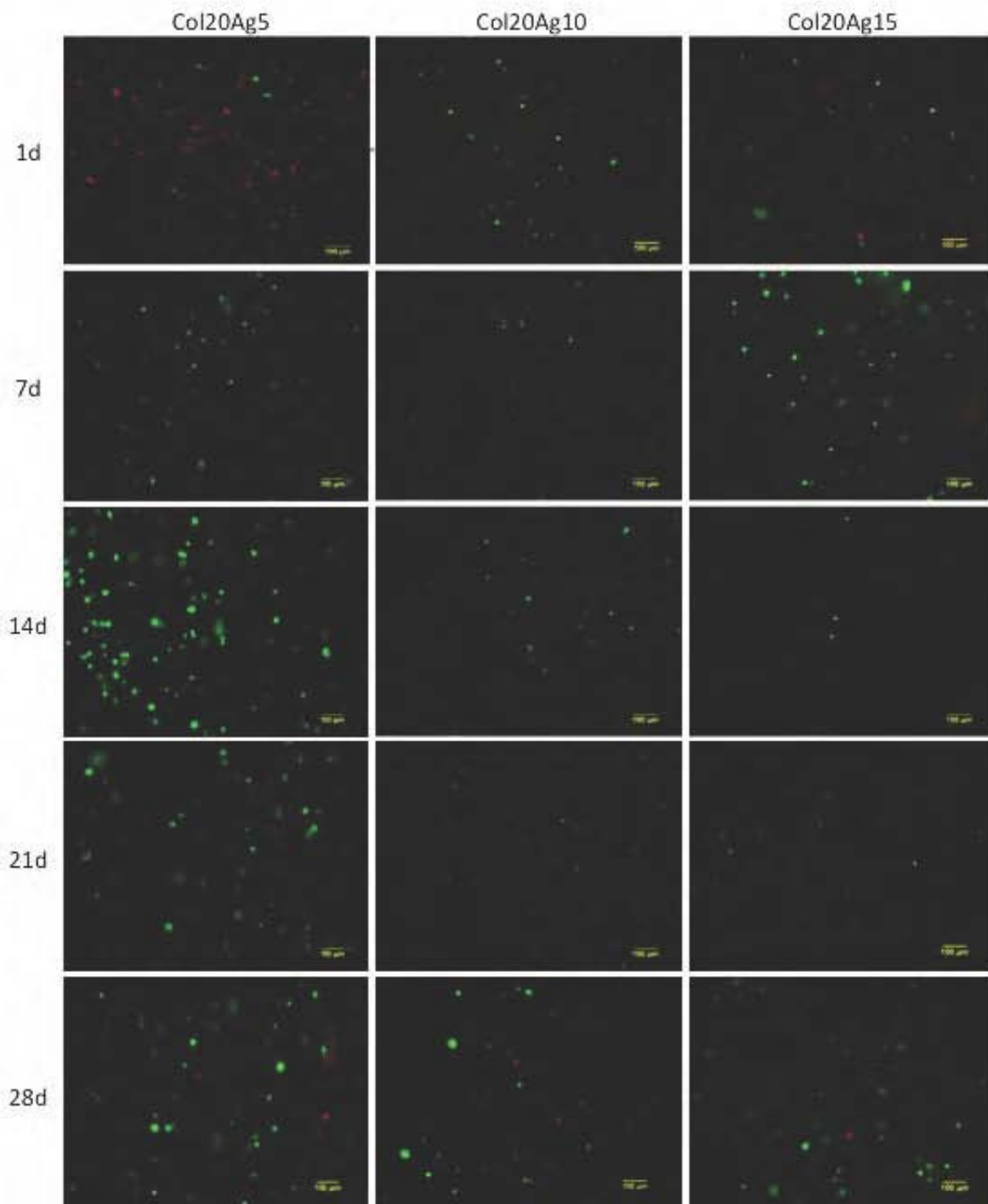


Figura 15. *Ensayo de vida y muerte al día 28 días en constructos con 200 μ L de colágena 10x. La fluorescencia en color verde, debido a calceína, corresponde a células vivas, la fluorescencia en color rojo corresponde a células muertas. Después de 1 día del proceso de encapsulación la mortalidad fue alta en todos los casos, sin embargo, al seguir el cultivo la proporción de células muertas disminuyó. En todas las muestras la morfología celular fue redondeada.*

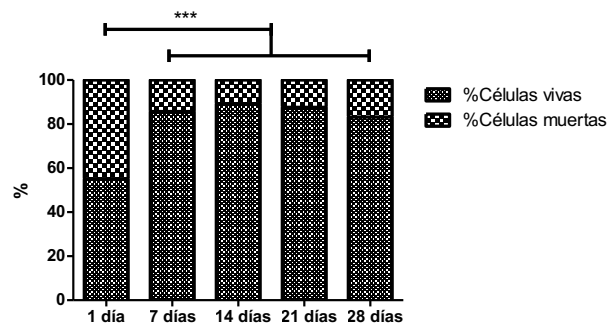


Figura 16. **Análisis de ensayo de vida y muerte.** De cada tiempo de cultivo se obtuvieron imágenes (n=12) de las que se determinó el número de células vivas y muertas.

Análisis morfológico

Por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) se observó la distribución, morfología, adhesión e interacción con el material de las células encapsuladas en el constructo de colágena/agarosa. En la figura 17 se observa cartílago de cerdo sin ningún tratamiento, se destaca la forma redondeada de los condrocitos, su distribución aislada y la abundante matriz que los rodea.

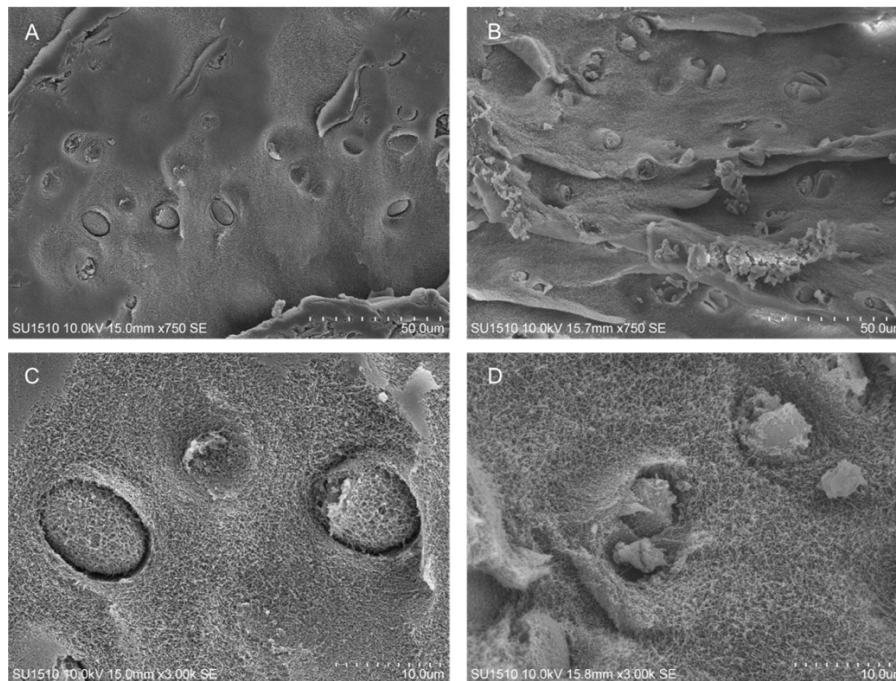


Figura 17. **MEB de muestras de cartilago.** Las estructuras redondeadas son los condrocitos rodeados por una gran cantidad de MEC, las células no están en contacto entre sí y se distribuyen uniformemente a lo largo del tejido. En la imagen C pueden notarse proyecciones de la célula hacia la matriz.

Las figuras 18-33 muestran los resultados del análisis con MEB de condrocitos encapsulados en constructos de colágena/agarosa a diferentes tiempos. En cada una se incluye el material sin células para comparar la apariencia.

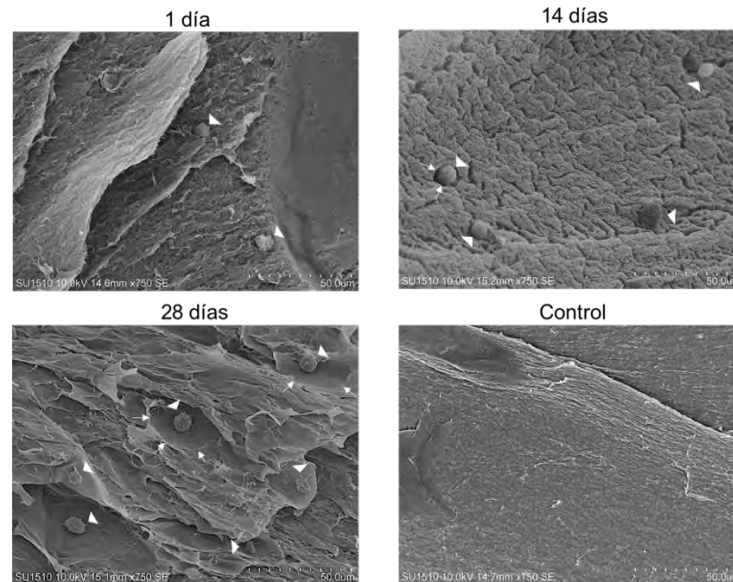


Figura 18. MEB de constructos de Col10Ag5 750x. En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 1 día están rodeadas por el material, sin embargo, a 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

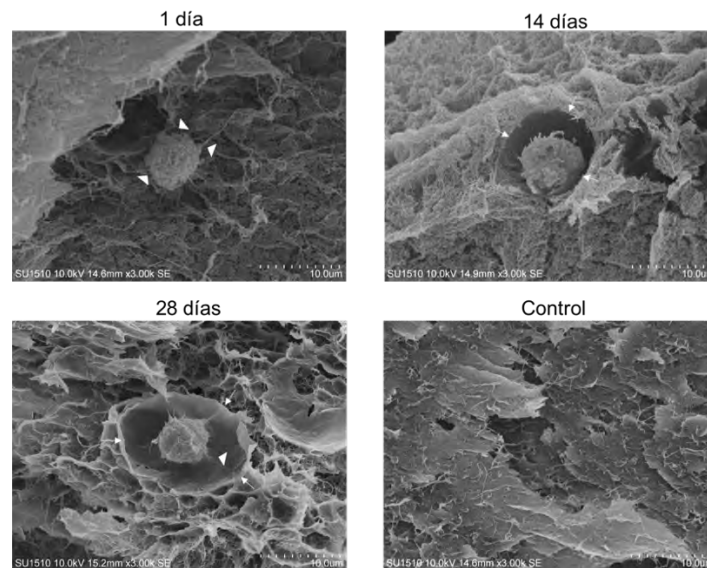


Figura 19. MEB de constructos de Col10Ag5 3000x. En 1 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

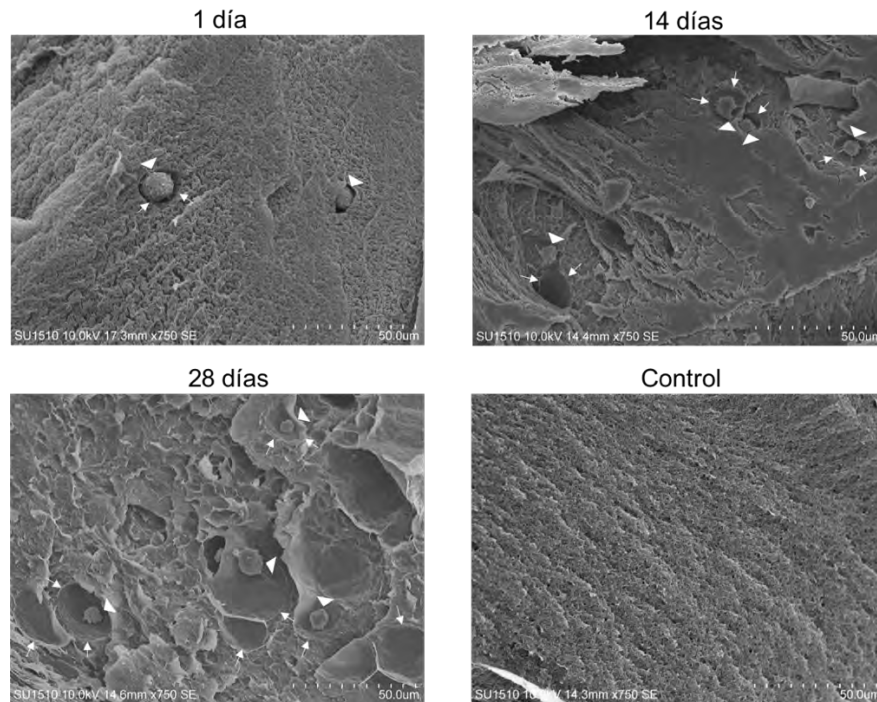


Figura 20. **MEB de constructos de Col10Ag10 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 1 día están rodeadas por el material, sin embargo, a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

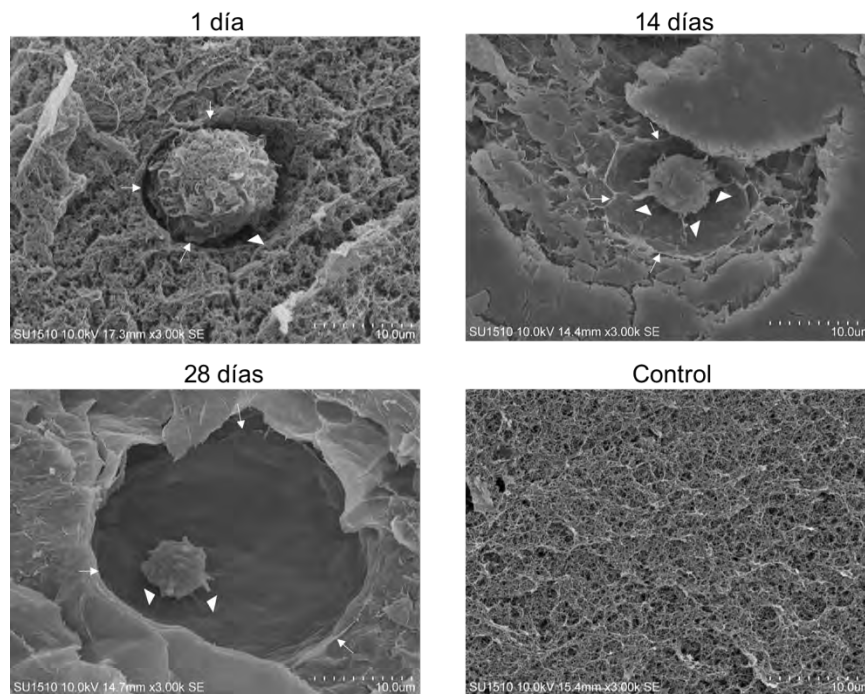


Figura 21. **MEB de constructos de Col10Ag10 3000x.** En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

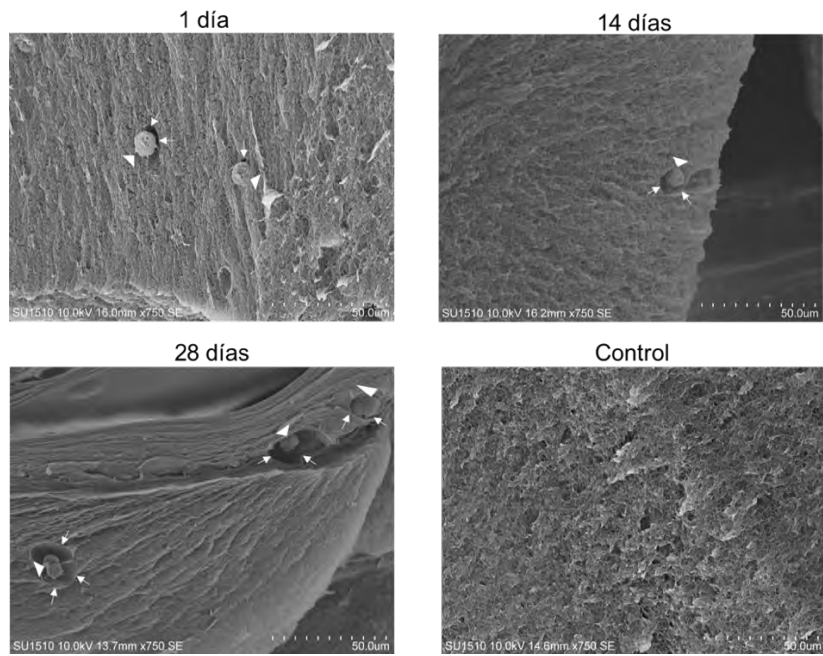


Figura 22. **MEB de constructos de Col10Ag15 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 1 día están rodeadas por el material, sin embargo, a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. a 28 días se destaca dos células contiguas con su espacio delimitado cada una. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

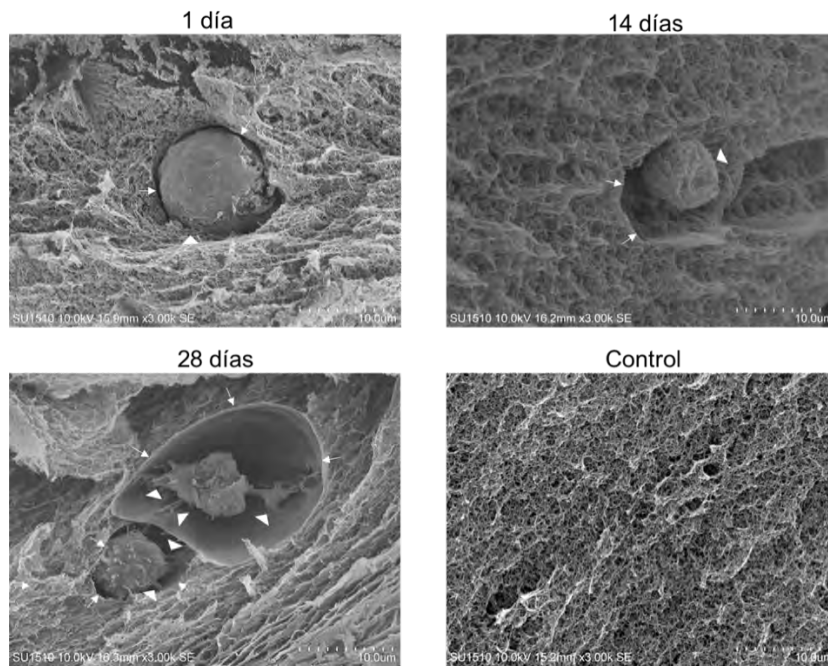


Figura 23. **MEB de constructos de Col10Ag15 3000x.** En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. A 28 días se observan dos células contiguas, una con un hueco considerable. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

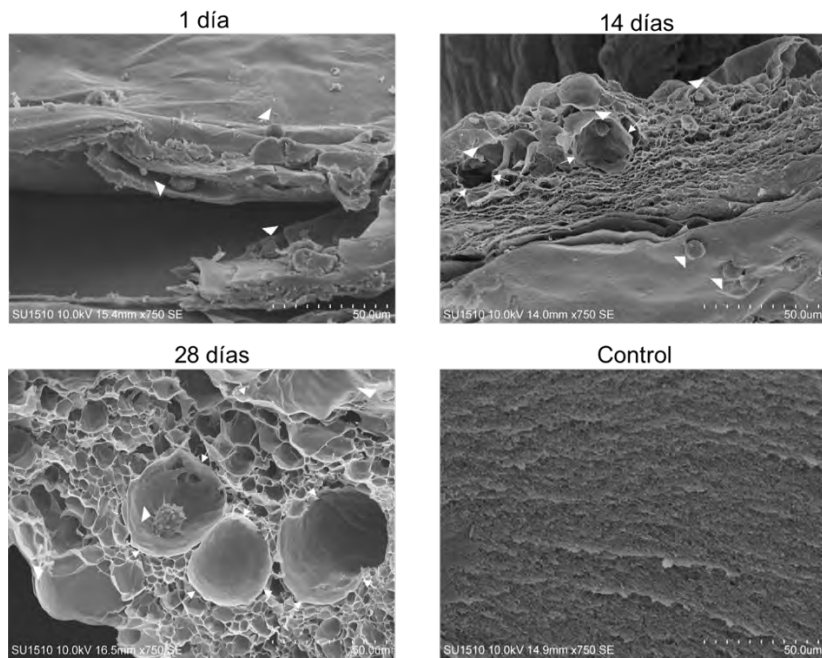


Figura 24. **MEB de constructos de Col20Ag5 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 1 día están rodeadas por el material, sin embargo, a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. A 14 días se notan dos texturas del material, en la parte superior con huecos y en la parte inferior es liso y con las células por encima de este. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

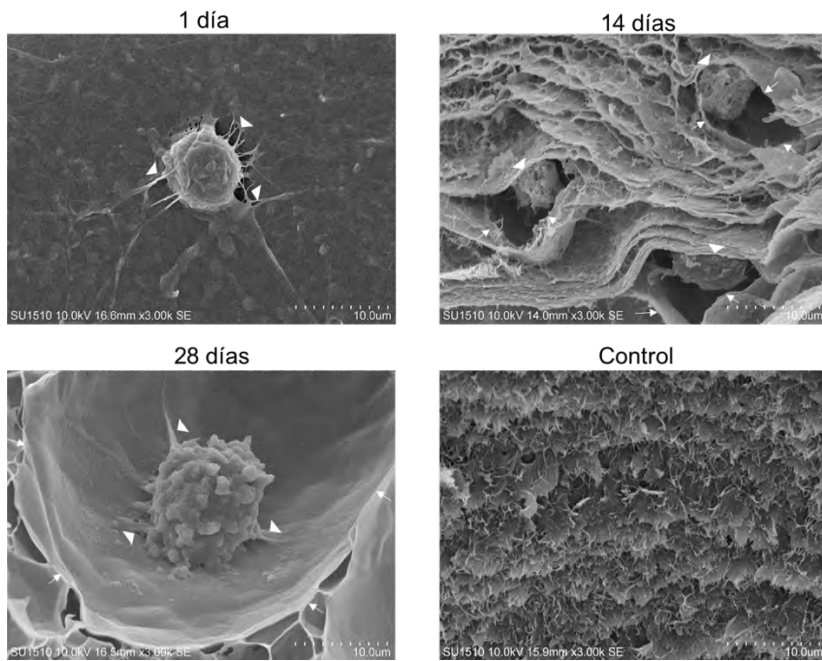


Figura 25. **MEB de constructos de Col20Ag5 3000x.** En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. A 28 días se observan una célula que está adherida sólo por una porción de su superficie, el resto da al espacio abierto del hueco. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

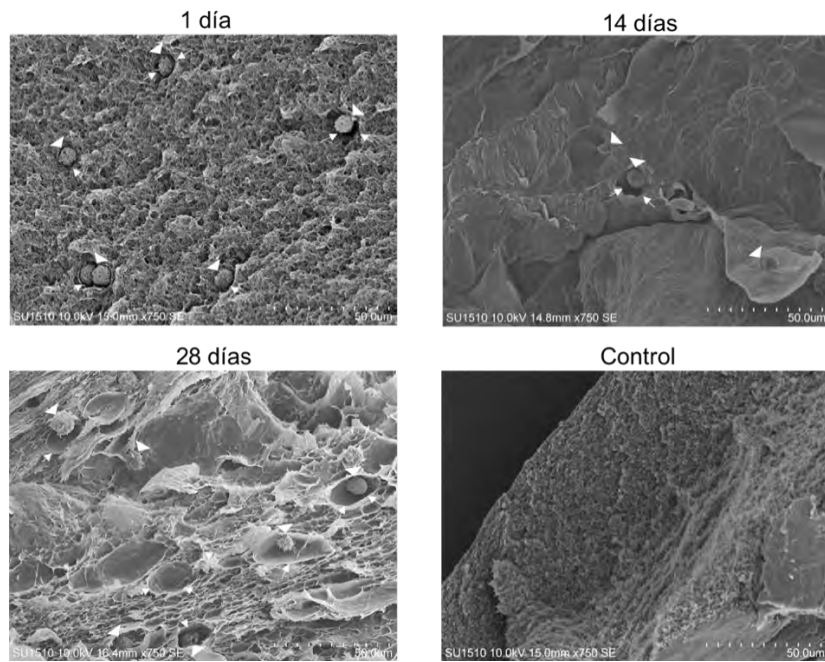


Figura 26. **MEB de constructos de Col20Ag10 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 1 día están rodeadas por el material, sin embargo, a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. En el control se destacan las texturas del material, regiones como la parte superior que parecen porosas y otras como la parte inferior que son compactas.

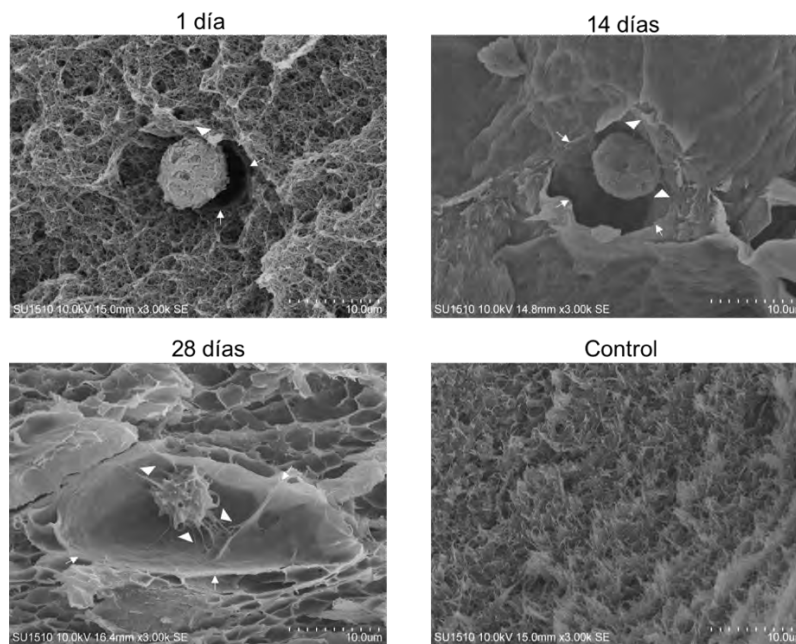


Figura 27. **MEB de constructos de Col20Ag10 3000x.** En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula. A 28 días se observa una célula adherida a las paredes de un hueco, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

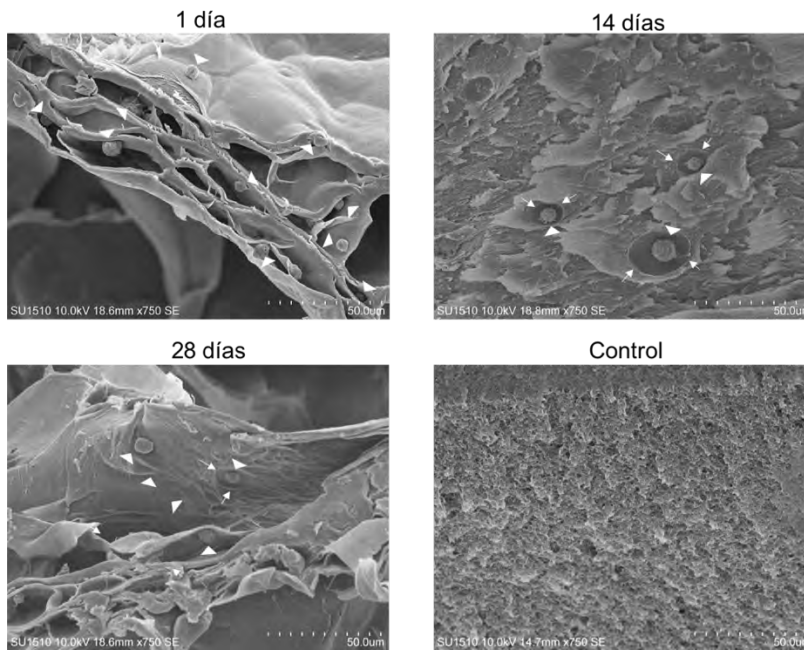


Figura 28. **MEB de constructos de Col20Ag15 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material, a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

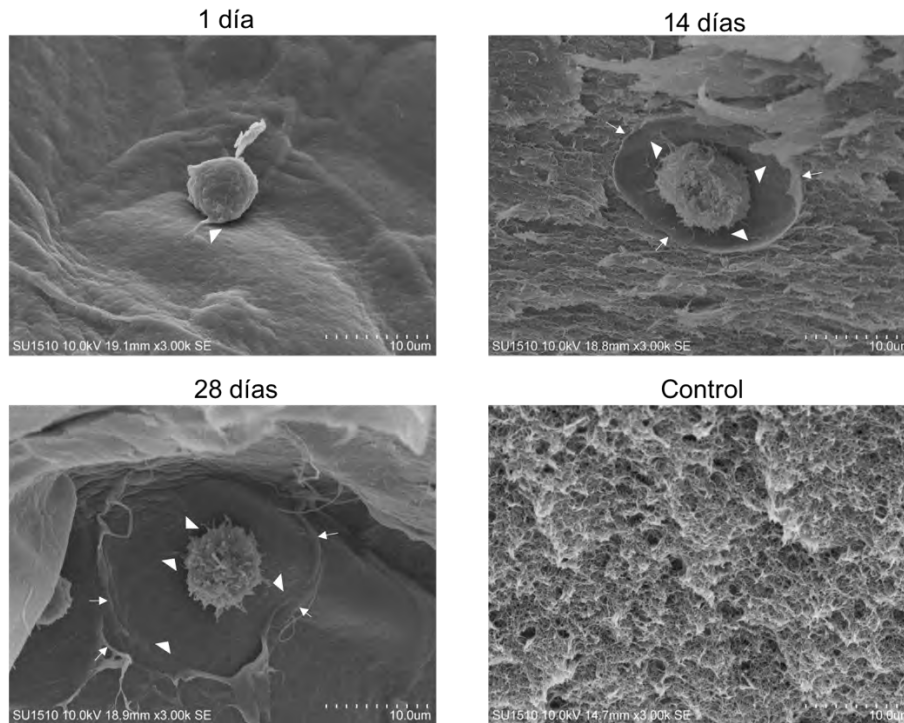


Figura 29. **MEB de constructos de Col20Ag15 3000x.** En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula, la textura del material en la cara interna difiere de la región externa. En el control no se observan estructuras redondeadas similares a las células.

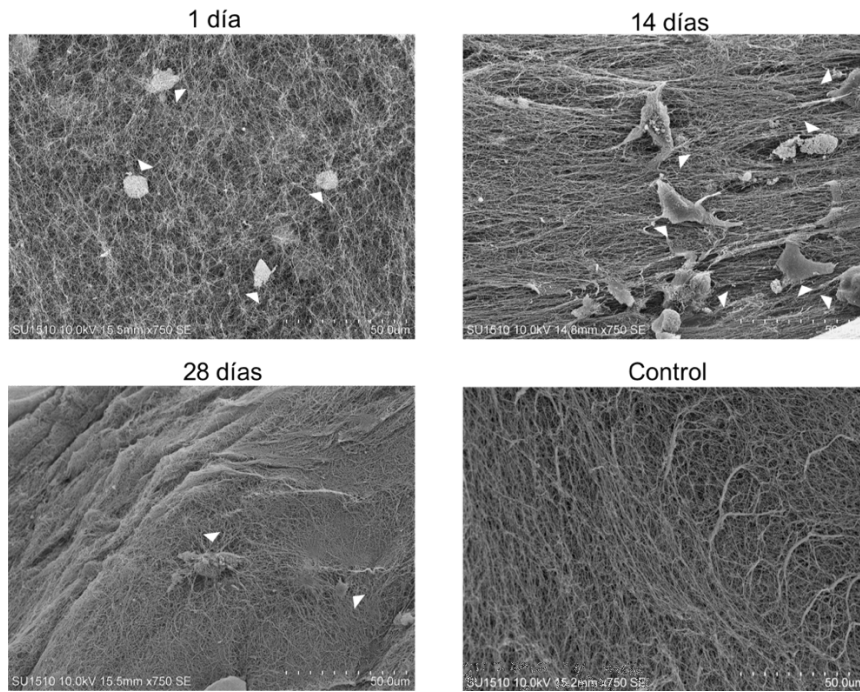


Figura 30. MEB de constructos colágena sin agarosa Col20Ag0 750x. En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material. A 1 día las células están redondeadas, sin embargo, a 14 y 28 días han aumentado su tamaño y alargado. En el control se destaca la formación de fibras.

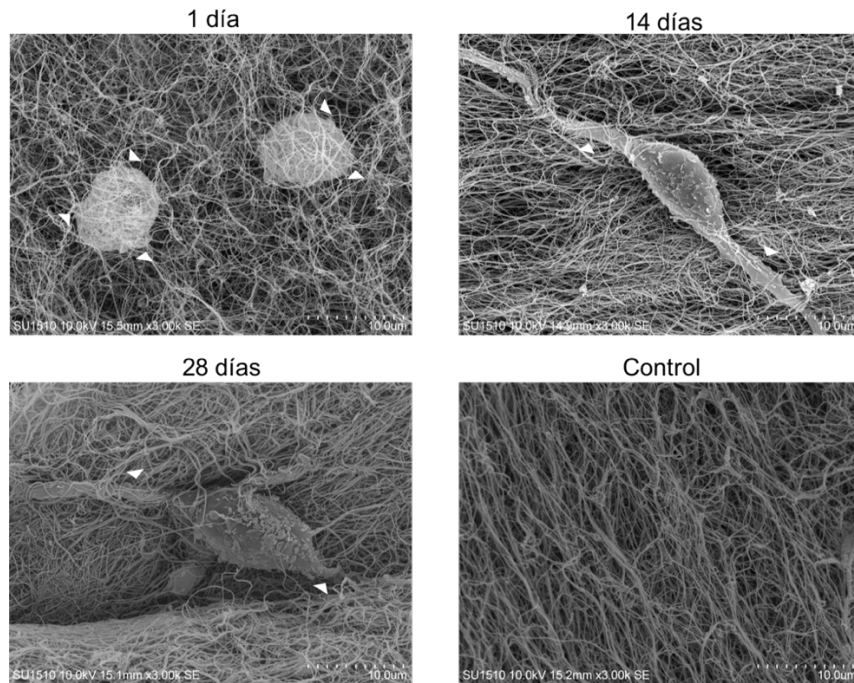


Figura 31. MEB de constructos de colágena sin agarosa Col20Ag0 3000x. En 1, 14 y 28 se observan prolongaciones desde la célula hasta el material (cabeza de flecha), a 14 y 28 días se nota la forma alargada de las células, no se destacan cavidades formadas por las células. En el control se observan las fibras de colágena.

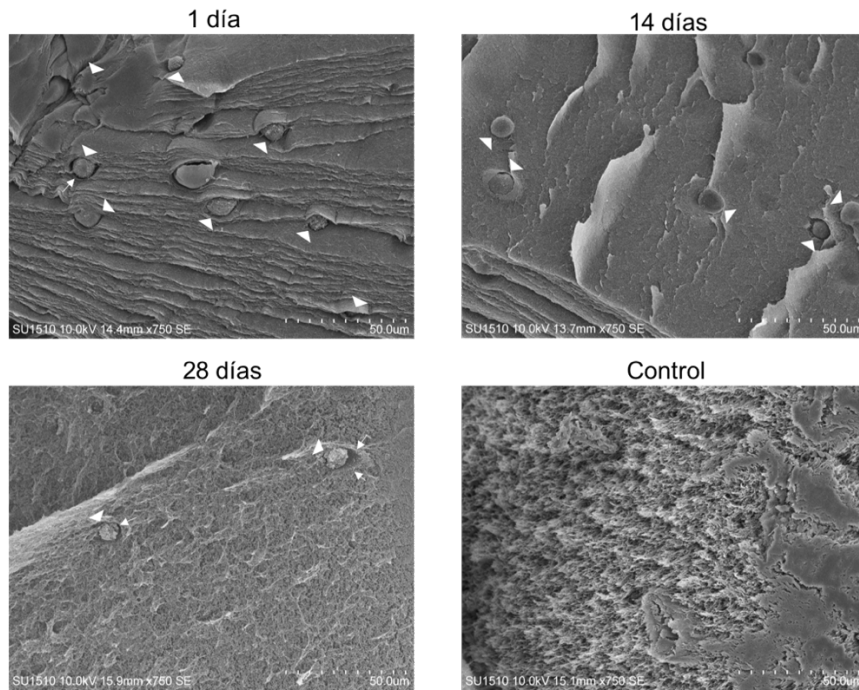


Figura 32. **MEB de constructos de agarosa sin colágena Col0Ag10 750x.** En 1, 14 y 28 se observan células (cabeza de flecha) distribuidas por el material. A 1 y 14 día están rodeadas por el material, a 28 días se nota un pequeño espacio delimitado (flechas) en el que se desarrolla la célula. En el control se destaca la estructura uniforme del material.

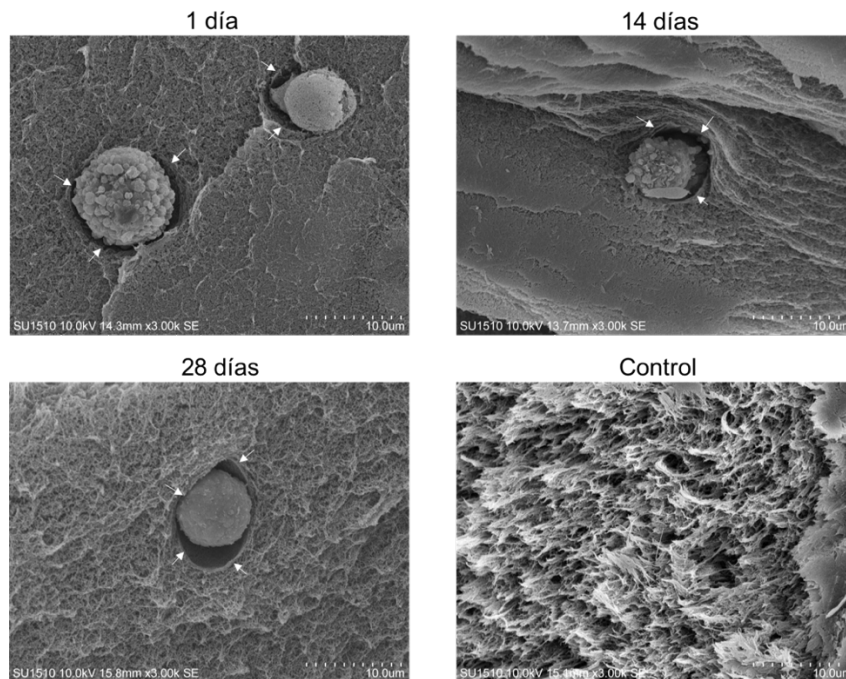


Figura 33. **MEB de constructos de agarosa sin colágena Col0Ag10 3000x.** En 1, 14 y 28 no se observan prolongaciones desde la célula hasta el material que indique adhesión de las células, a 28 días se nota la formación de un espacio delimitado (flechas) en el que se desarrollan las células. La textura del material en la cara interna difiere de la región externa. En el control no se observan fibras.

Análisis histológico

Con microscopía fotónica se observó que los condrocitos dirigían prolongaciones cortas de la célula hacia la red polimérica de Col-I/agarosa. Estas prolongaciones celulares estaban en contacto estrecho con el material. Es de notar que desde el día uno de cultivo se evidenciaron estas prolongaciones. Esta estrecha aposición de las prolongaciones de los condrocitos con el polímero sugiere que había adhesión de las células hacia las fibras de la matriz. La figura 34 muestra los resultados.

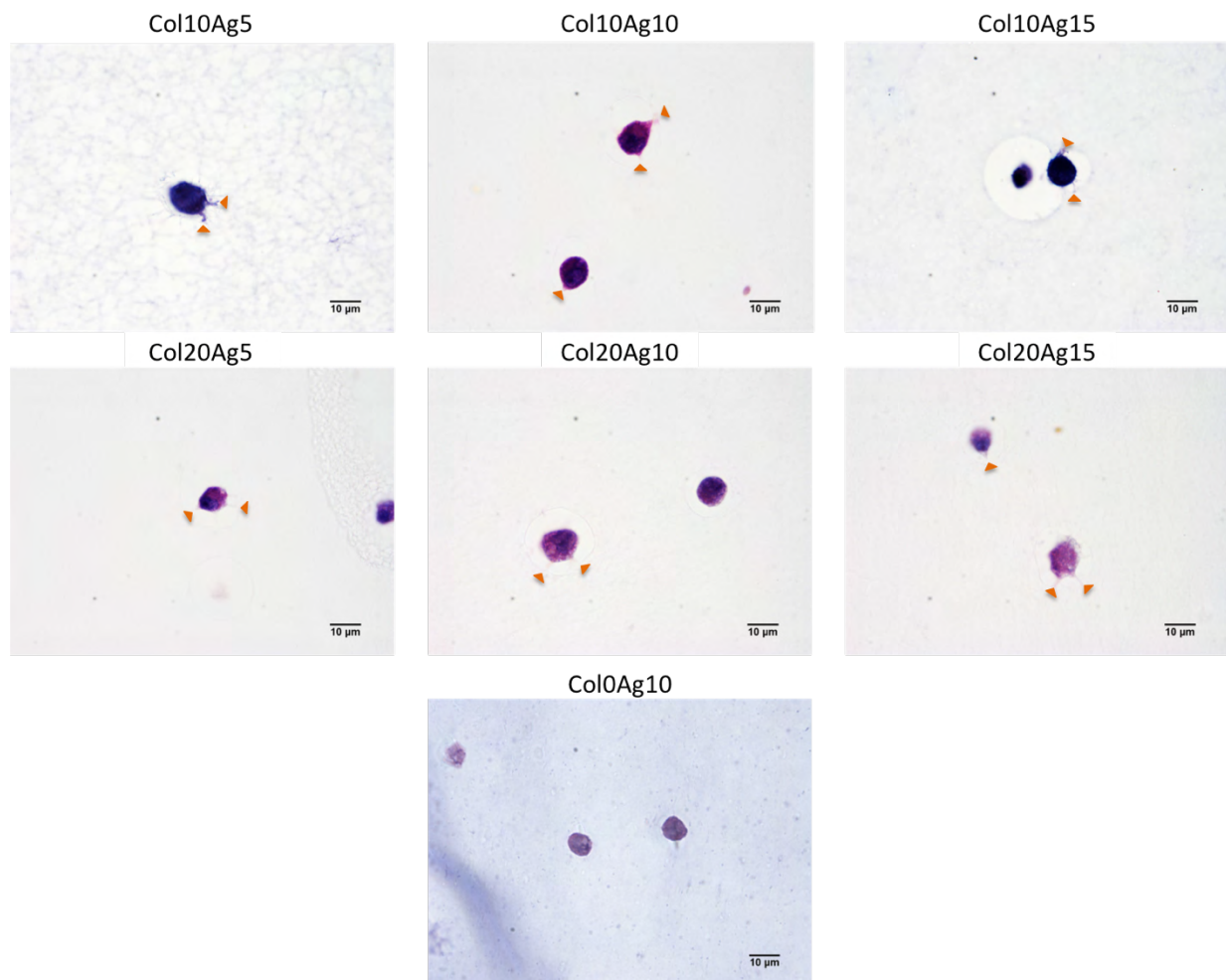


Figura 34. *Tinción H&E de constructos colágena/agarosa a 1 día de cultivo 100x. Se observan de color morado y redondeadas los condrocitos encapsulados. Las células tienen proyecciones hacia el material (cabeza de flecha) que indica la adhesión al material.*

Las figuras 35 y 36 muestran la tinción H&E de los constructos a diferentes tiempos de cultivo; a 1 día se observan las células distribuidas en el material, conforme el tiempo de cultivo aumentó la región alrededor de las células se coloreó con mayor intensidad.

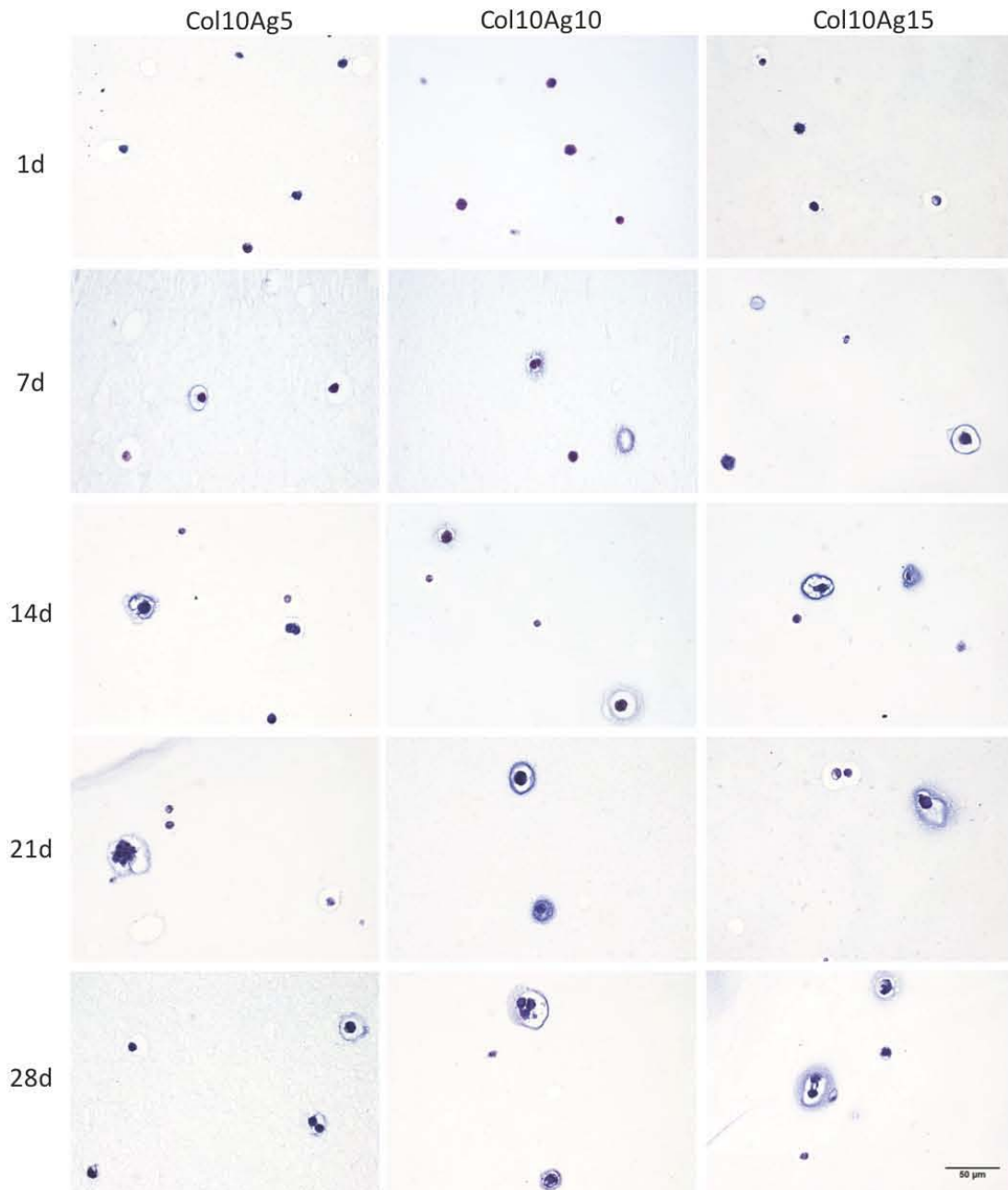


Figura 35. **Tinción H&E de constructos Col10Ag-5,10 y 15 40x.** Las células se observan redondeadas y teñidas de morado en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a partir de 7 días se observa que la matriz que rodea a las células se colorea con mayor intensidad con el colorante hematoxilina.

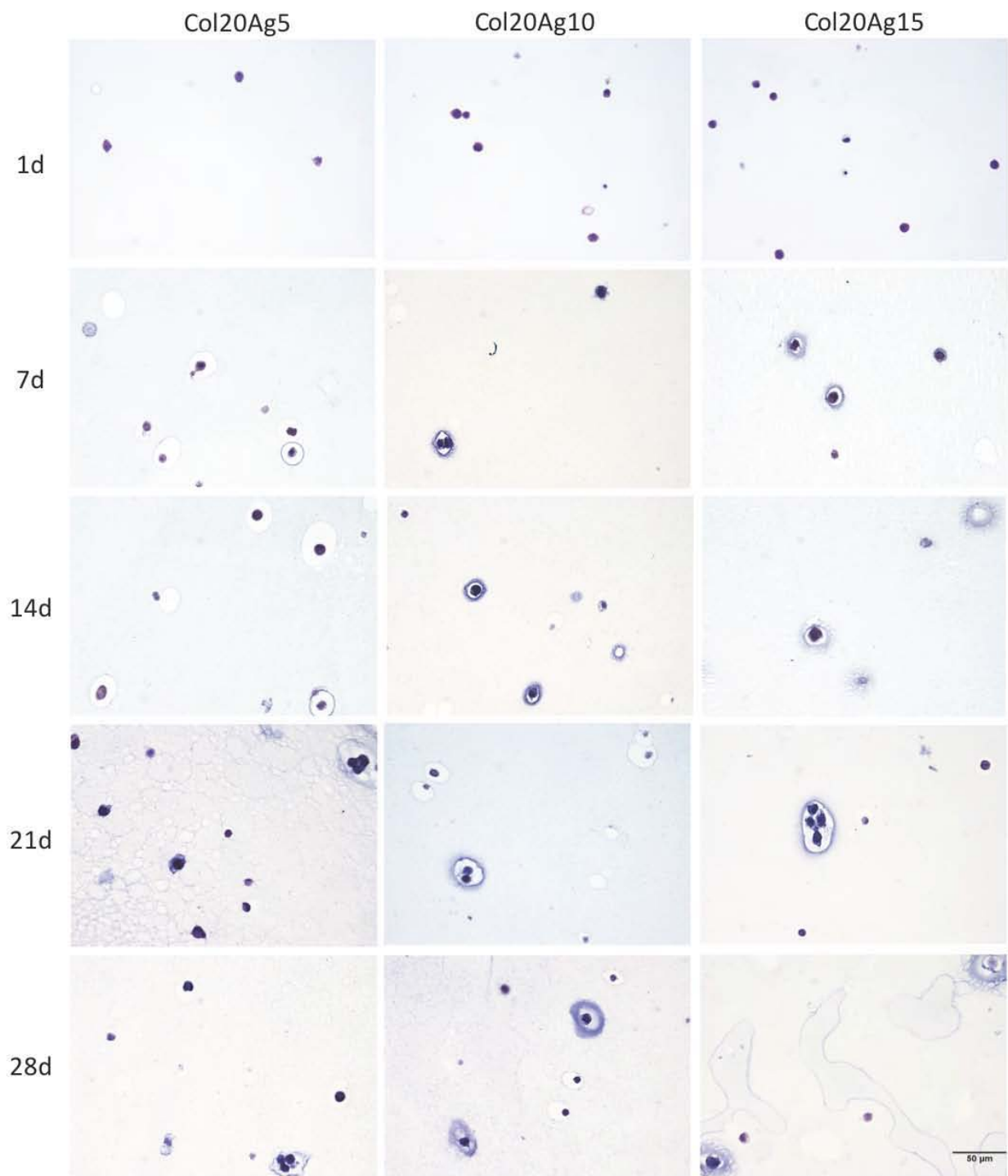


Figura 36. **Tinción H&E de constructos Col20Ag-5,10 y 15 40x.** Las células se observan redondeadas y teñidas de morado en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a partir de 7 días se observa en las regiones que rodean a las células una tinción basófila se debió a la tinción con hematoxilina.

Las figuras 37 y 40 muestran la tinción de los constructos con azul alcian en los diferentes tiempos de cultivo. Conforme el tiempo de cultivo aumentó el depósito de GAGs se incrementó, lo que se cuantificó por el número de células rodeadas por GAGs (figuras 38 y 41) y por el área coloreada con azul alcian (figuras 39 y 42). La figura 43a es un comparativo del área de la célula a 1 día de cultivo que no depende de la concentración de agarosa. La figura 43b compara el área de la célula y los anillos de GAGs a 28 días de cultivo.

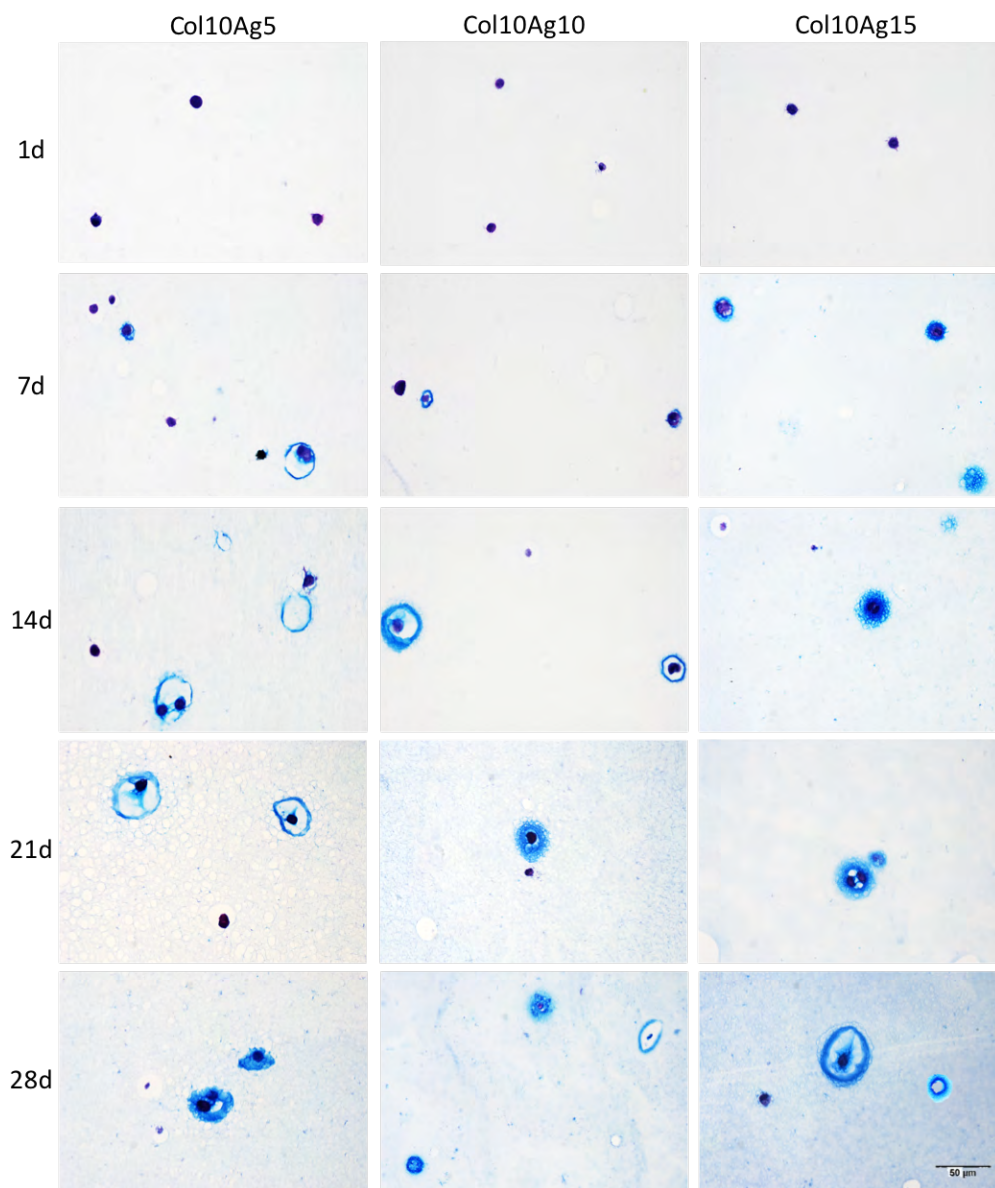


Figura 37. Tinción azul alcian de constructos Col10Ag-5,10 y 15 40x. Las células se observan redondeadas y teñidas de morado en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a partir de 7 días se forma un anillo de colorante que rodea las células, el cual se vuelve más intenso y grande conforme aumenta el tiempo de cultivo.

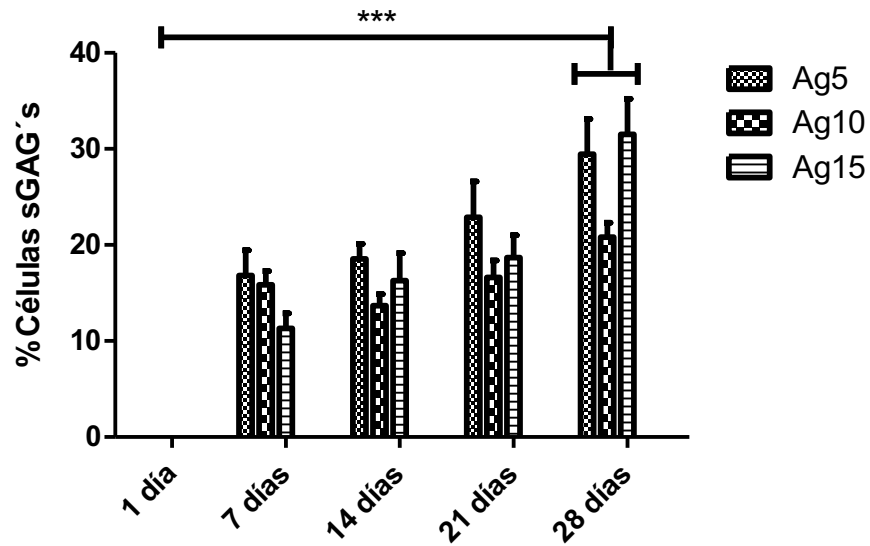


Figura 38. **Porcentaje de células secretoras de GAGs en tinción azul alcian en andamios Col10Ag-5, 10 y 15.** En fotomicrografías 10x (n=12) porcentaje de células rodeadas por depósito de GAGs, evidenciado por la coloración azul. A 1 día en ninguna condición se detectó coloración. La prueba ANOVA y el análisis Tukey arrojó que en todas las condiciones el porcentaje de células secretoras tiene una diferencia significativa contra otros días de cultivo ($p < 0.0001$).

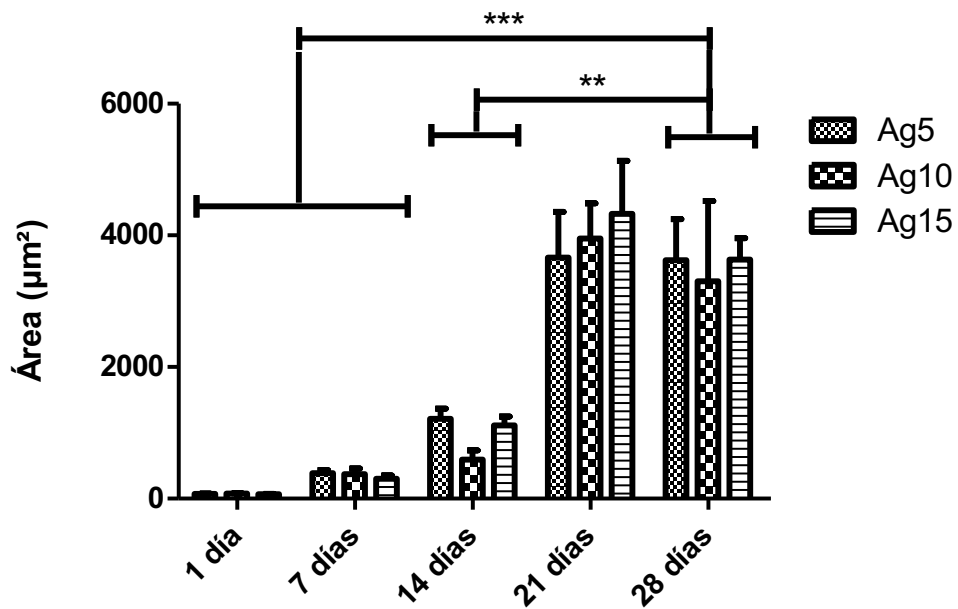


Figura 39. **Área teñida de azul en tinción azul alcian en andamios Col10Ag-5, 10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) área de la célula y el anillo de GAGs que la rodea evidenciado por la coloración azul. A 1 día el área corresponde a sólo la célula. La prueba ANOVA y el análisis Tukey arrojó que en todas las condiciones el área teñida a 21 y 28 días es significativamente mayor que en días previos (sólo mostrado para 28 días) ($p < 0.0001$).

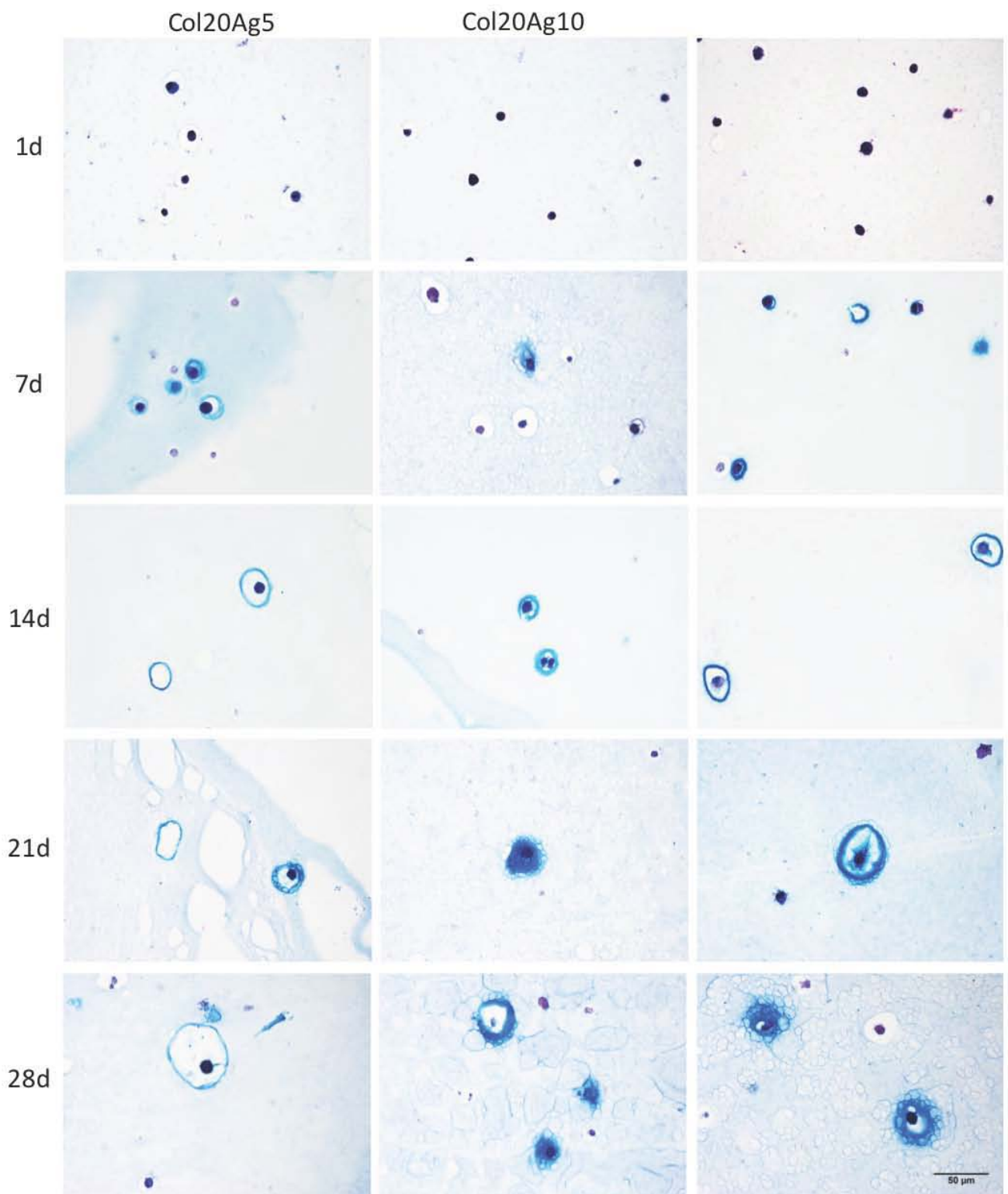


Figura 40. Tinción azul alcian de constructos Col20Ag-5,10 y 15 40x. Las células se observan redondeadas y teñidas de morado en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a partir de 7 días se forma un anillo de colorante que rodea las células, el cual se vuelve más intenso y grande conforme aumenta el tiempo de cultivo. A 14 días el anillo es más grueso en Ag15 respecto a Ag5.

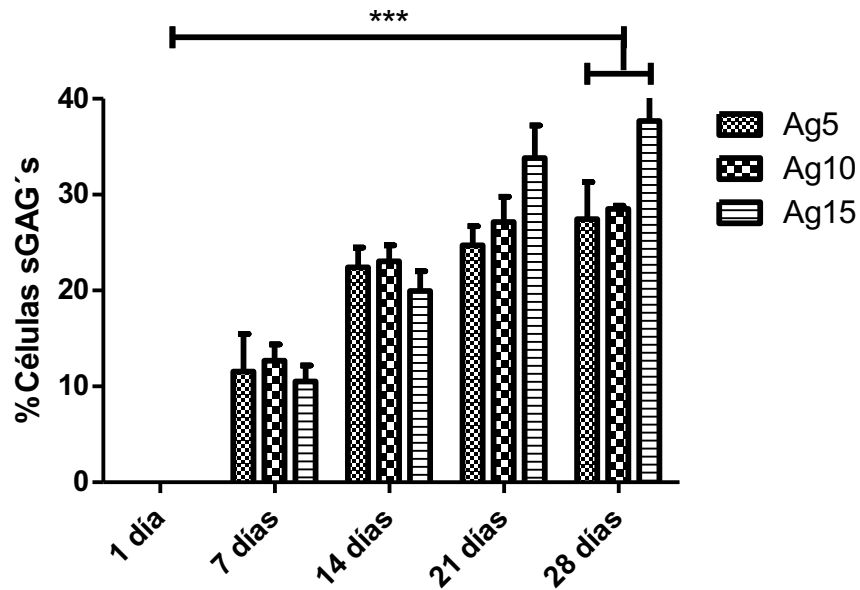


Figura 41. **Porcentaje de células secretoras de GAGs en tinción azul alcian en andamios Col20Ag-5, 10 y 15.** En fotomicrografías 10x (n=12) porcentaje de células rodeadas por depósito de GAGs, evidenciado por la coloración azul. A 1 día en ninguna condición se detectó coloración. La prueba ANOVA y el análisis Tukey arrojó que en todas las condiciones el porcentaje de células secretoras tiene una diferencia significativa contra otros días de cultivo ($p < 0.0001$).

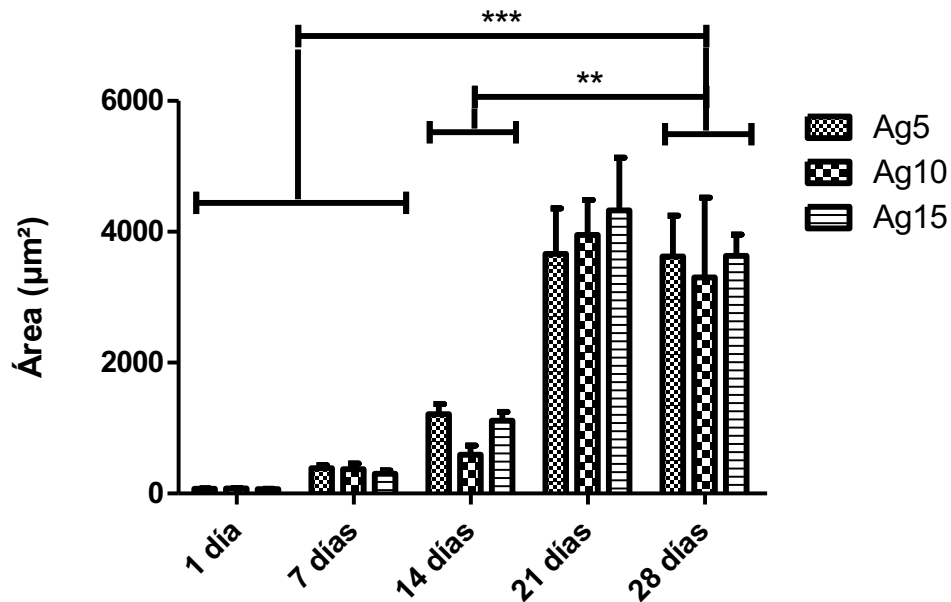


Figura 42. **Área teñida de azul en tinción azul alcian en andamios Col20Ag-5, 10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) área de la célula y el anillo de GAGs que la rodea evidenciado por la coloración azul. A 1 día el área corresponde a sólo la célula. La prueba ANOVA y el análisis Tukey arrojó que en todas las condiciones el área teñida a 28 días fue significativamente mayor que en 1, 7 y 14 días de cultivo ($p < 0.0001$).

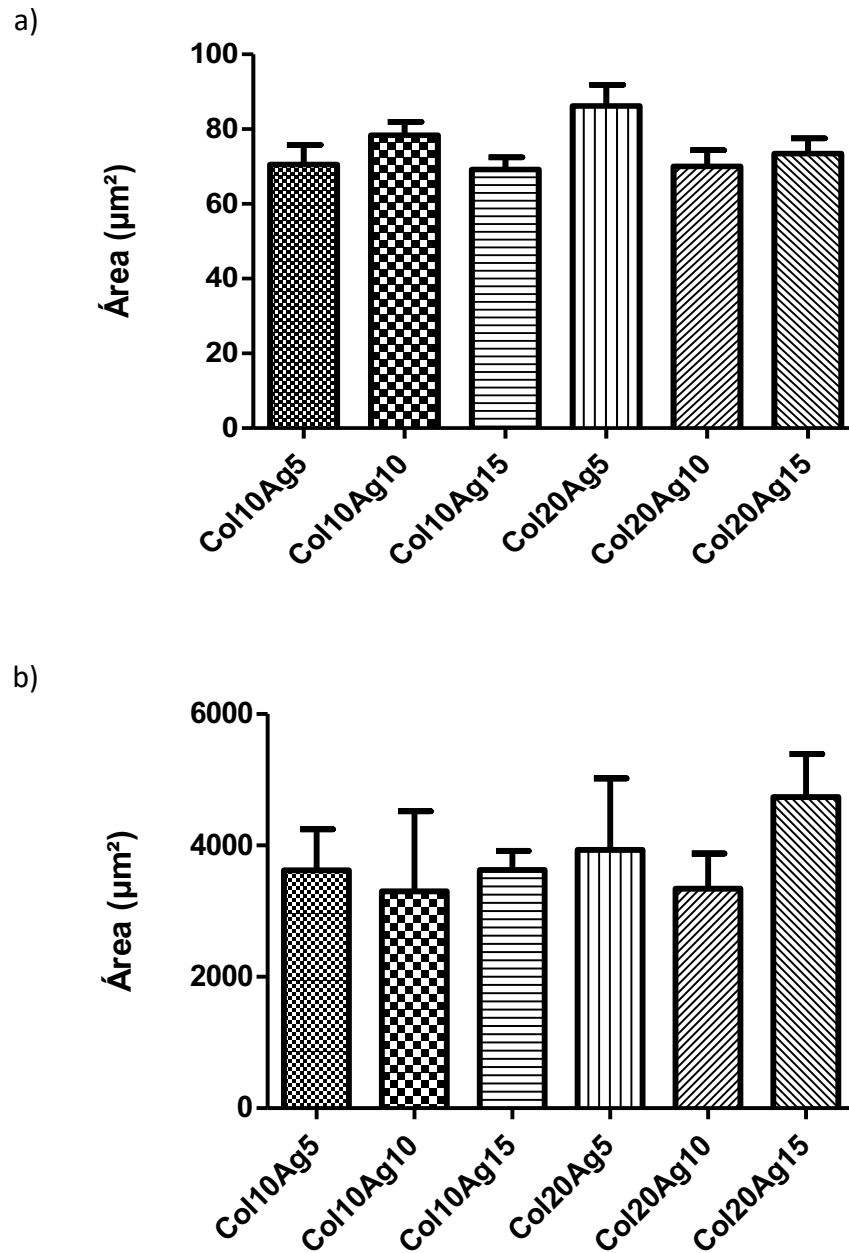


Figura 43. **Concentrado de área teñida de azul en tinción azul alción.** (a) constructos a 1 día de cultivo, la prueba ANOVA no arroja diferencia significativa del área de la célula en las diferentes condiciones de cultivo. (b) constructos a 28 días de cultivo, el área marcada por depósito de GAGs no es tiene diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo.

La figura 44 muestra la tinción de los andamios de colágena, agarosa, así como cartílago nativo con azul alción.

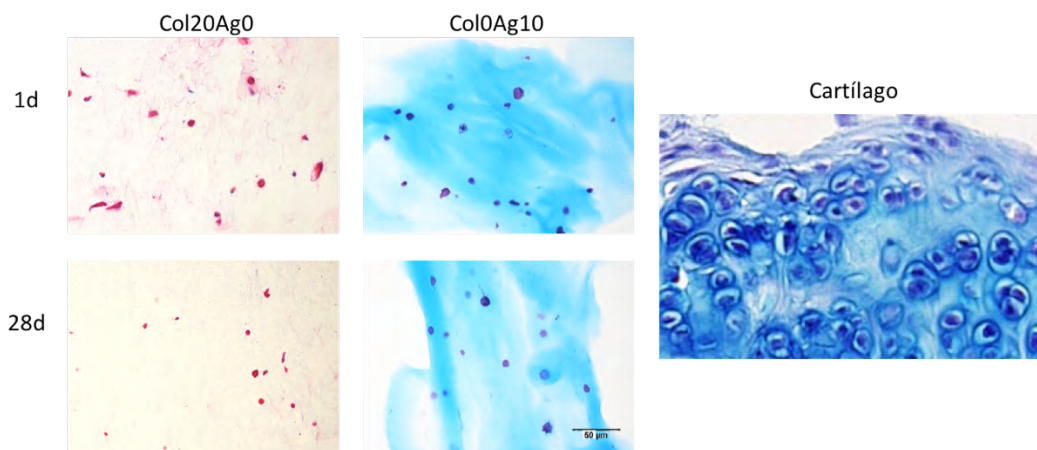


Figura 44. Tinción azul alción de constructos de colágena (Col20Ag0) y agarosa (Col0Ag10) control. En los constructos Col20Ag0 se observan las células de color rosado, sin depósito de GAGs a 28 días de cultivo. Es posible observar las fibras de colágena. En Col0Ag10 se observa coloración azul pálida generalizada. En el cartílago nativo la región pericelular es de azul intenso y la matriz intraterritorial azul pálido (Modificada de Megías et al.).

Las figuras 45 y 46 muestran la tinción de los constructos con tricrómico de Masson a 1 y 28 días de cultivo.

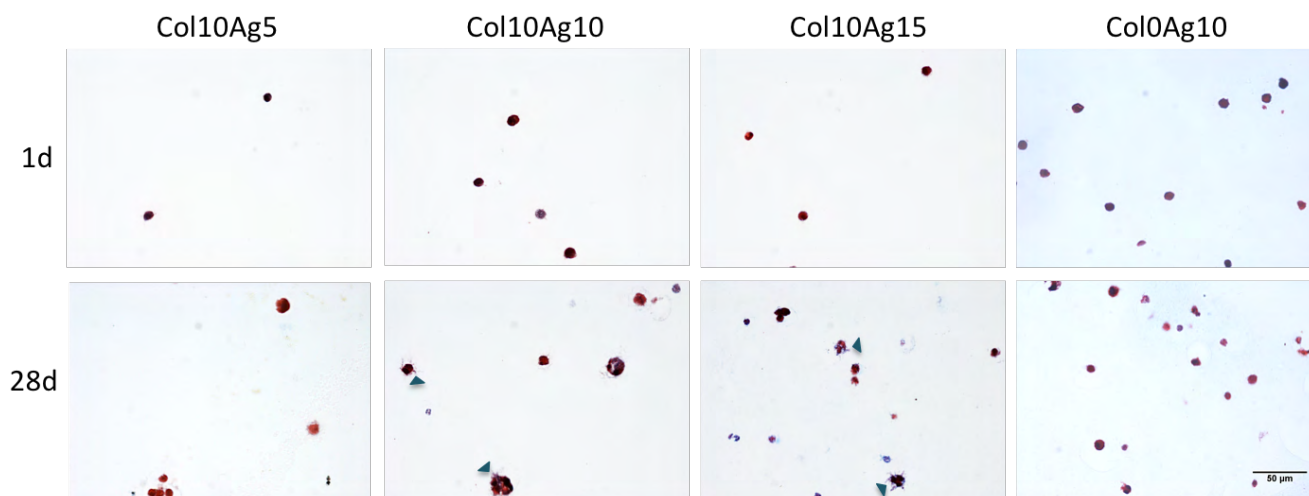


Figura 45. Tinción Masson de constructos Col10Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x. Las células se observan redondeadas y teñidas de rojo en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a los 28 días en algunas células se observa un depósito colorado que rodea a las células. En el control de sólo agarosa no se observa depósito alguno.

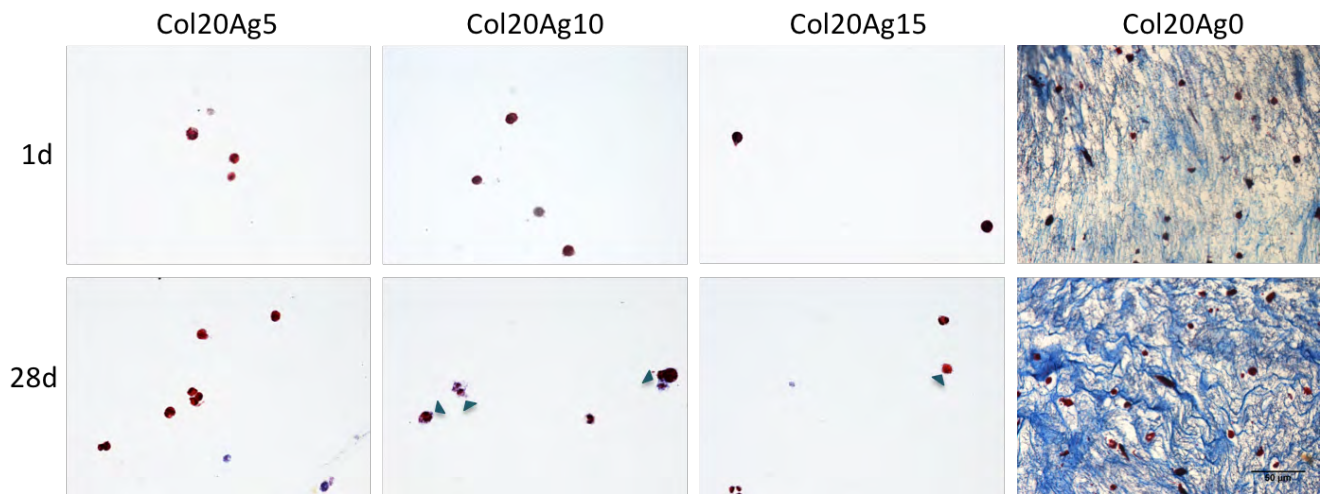


Figura 46. **Tinción Masson de constructos Col20Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x.** Las células se observan redondeadas y teñidas de rojo en todos los tiempos. A 1 día la matriz no se tiñe, sin embargo, a los 28 días en algunas células se observa un depósito colorado que rodea a las células. En Ag-10 y 15 es más predominante respecto a Ag5. En el control de colágena las fibras se tiñen de azul.

La figura 47 es cartílago nativo con la tinción tricrómica de Masson, se destacan los núcleos negros, el citoplasma rosado.

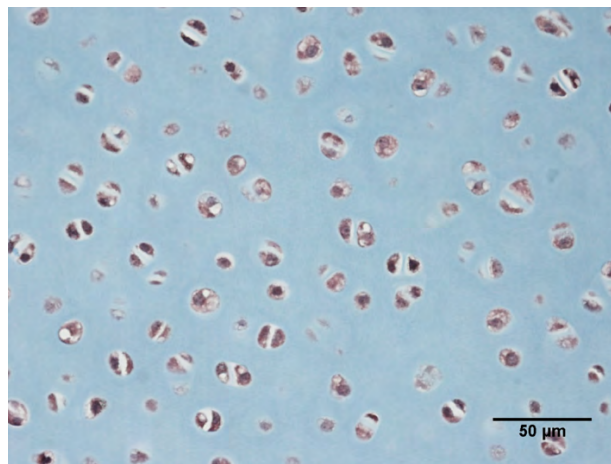


Figura 47. **Tricrómico de Masson de cartilago nativo.**

Para determinar que tipo de colágena están produciendo los condrocitos encapsulados en colágena/agarosa, se realizaron IHQ contra Col-X (fig. 48 y 49) y Pro-Col-II (53 y 54). Las figuras 50 y 51 muestran los resultados de la cuantificación de la intensidad óptica integrada (IOD) para Col-X, respectivamente las figuras 55 y 56 para pro-Col-II. Las figuras 52 y 57 son la comparación a 1 y 28 días de las diferentes condiciones de cultivo.

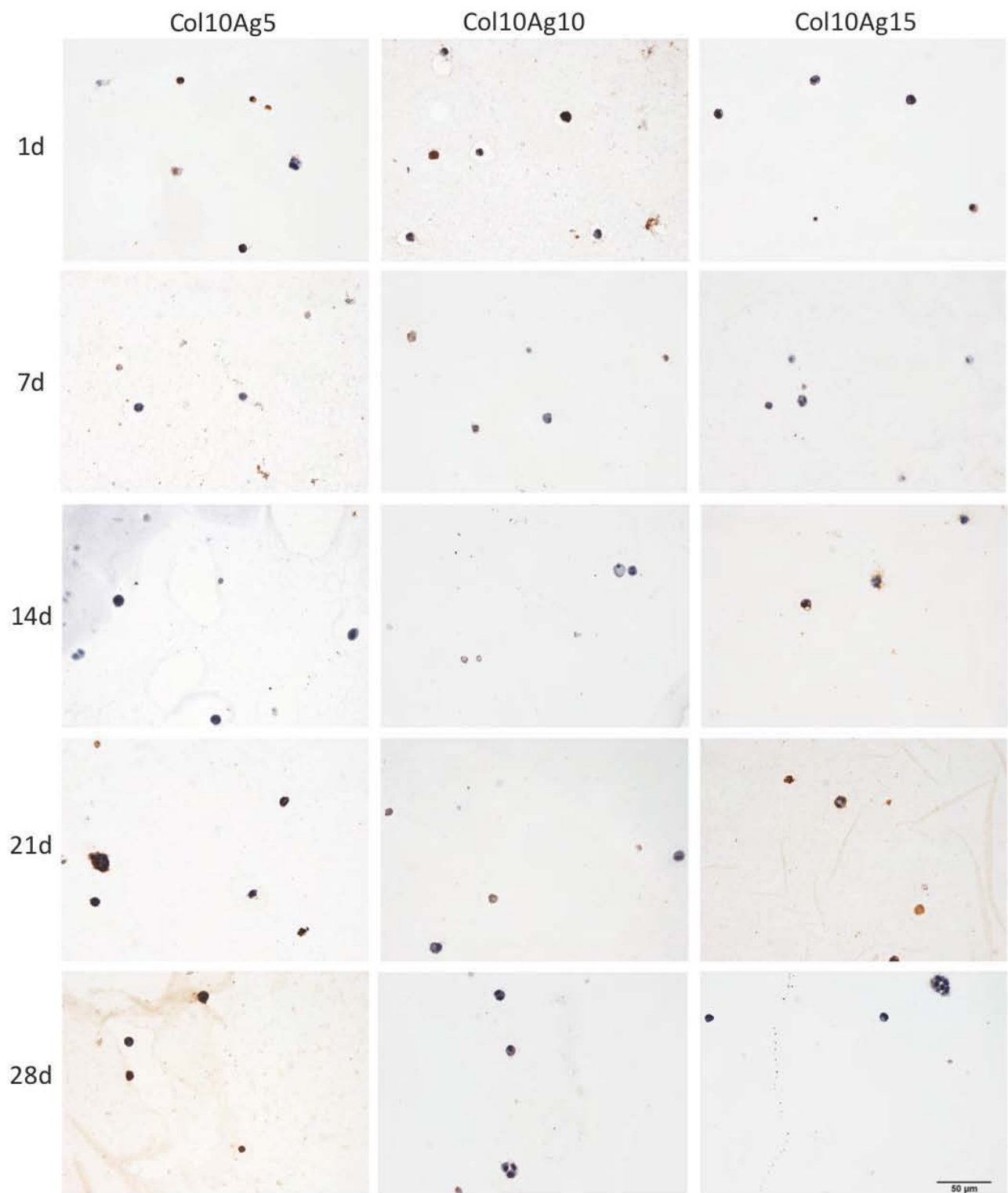


Figura 48. IHQ de constructos Col10Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x contra Col-X. La marca positiva para colágeno X se observa en color café, las células están teñidas de morado por hematoxilina. La marca no se observa en la matriz, y las células presentan marca positiva indistintamente entre las condiciones y tiempos de cultivo la marca positiva.

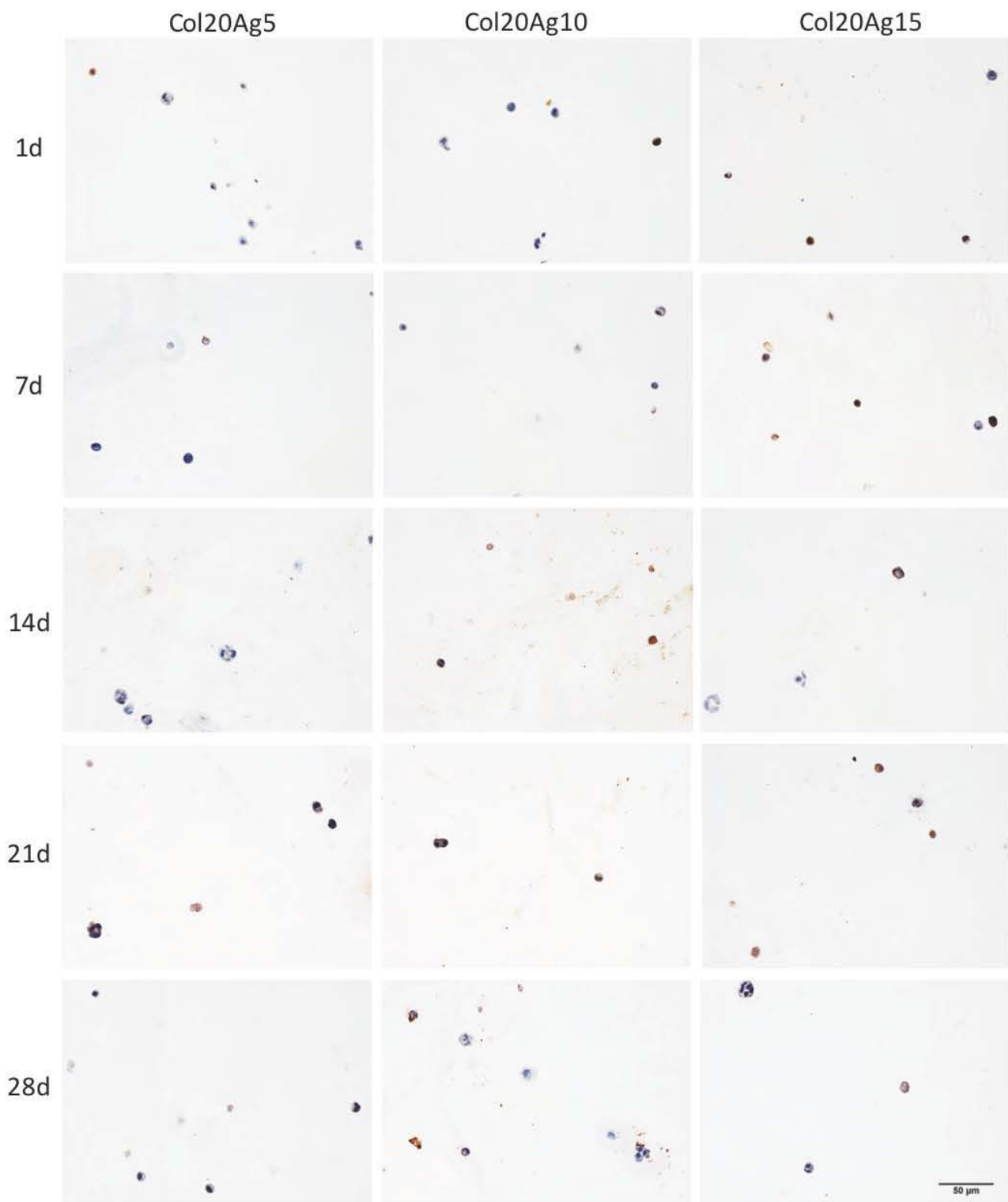


Figura 49. IHQ de constructos Col20Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x contra Col-X. La marca positiva para colágeno X se observa en color café, las células están teñidas de morado por hematoxilina. La marca no se observa en la matriz, y las células presentan indistintamente entre las condiciones y tiempos de cultivo la marca positiva.

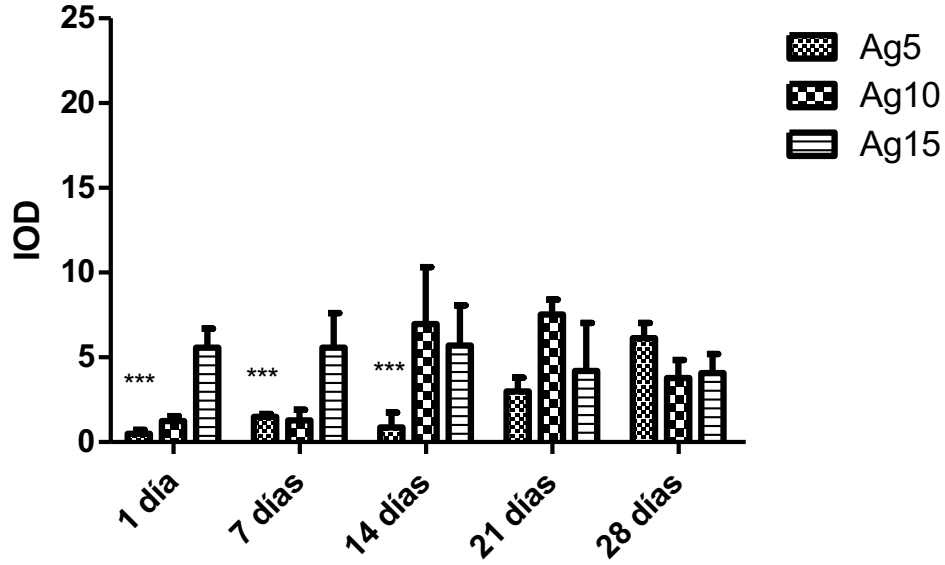


Figura 50. **Análisis de IHQ contra Col-X en constructos Col20Ag-5,10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) cuantificación de la Intensidad Óptica integrada (IOD) normalizando al dividir la IOD por el número de células en el campo. Para los constructos de Col20Ag5 la expresión es mayor a 28 días respecto a 1, 7 y 14 días de cultivo ($p < 0.0001$). Para Col20Ag10 y Col20Ag15 no hay variación significativa en la intensidad de la expresión en los días de cultivo.

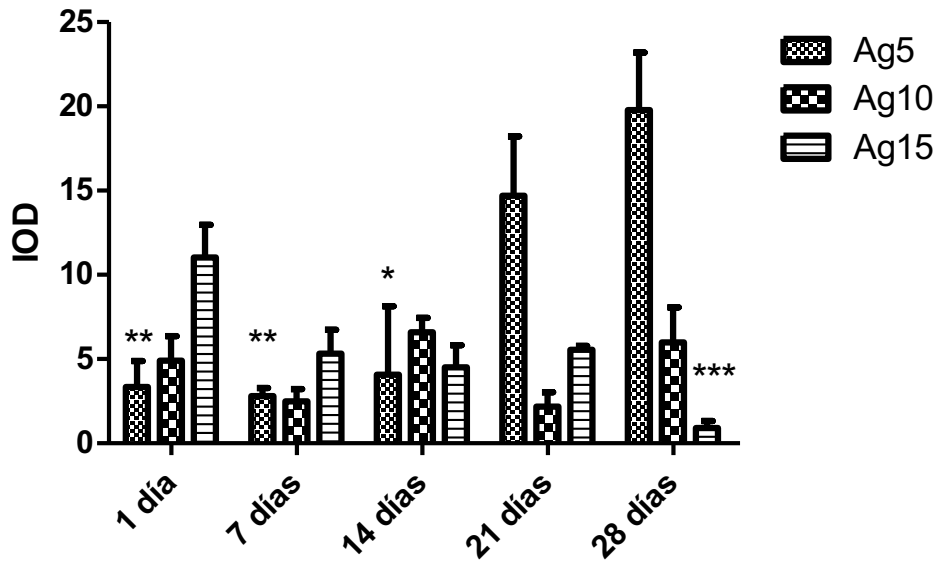


Figura 51. **Análisis de IHQ contra Col-X en constructos Col10Ag-5,10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) cuantificación de la Intensidad Óptica integrada (IOD) normalizando al dividir la IOD por el número de células en el campo. Para los constructos de Col10Ag5 la intensidad es significativamente mayor a 28 días respecto a 1 día de cultivo ($p = 0.0003$). Para Col10Ag10 no hay variación significativa y para Col10Ag15 la intensidad de la marca es menor a 28 días respecto a 1 día de cultivo ($p = 0.0002$).

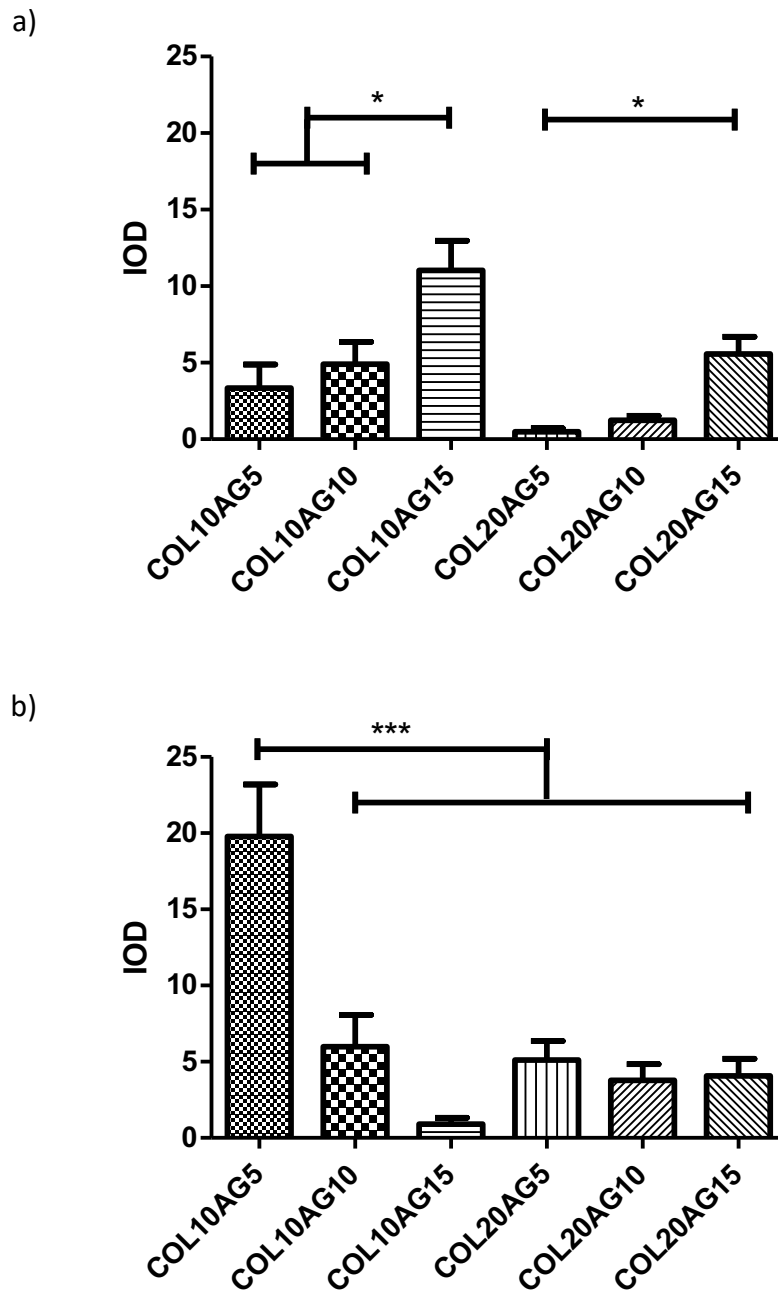


Figura 52. **Concentrado de IOD de IHQ contra Col-X.** (a) constructos a 1 día de cultivo, a través de la prueba ANOVA se identifica que la concentración mas elevada de agarosa se asocia a la mayor concentración de Col X ($p=0.01$). Después de 28 días de cultivo la mayor concentración es para el constructo con menor concentración de agarosa y colágena ($p<0.0001$).

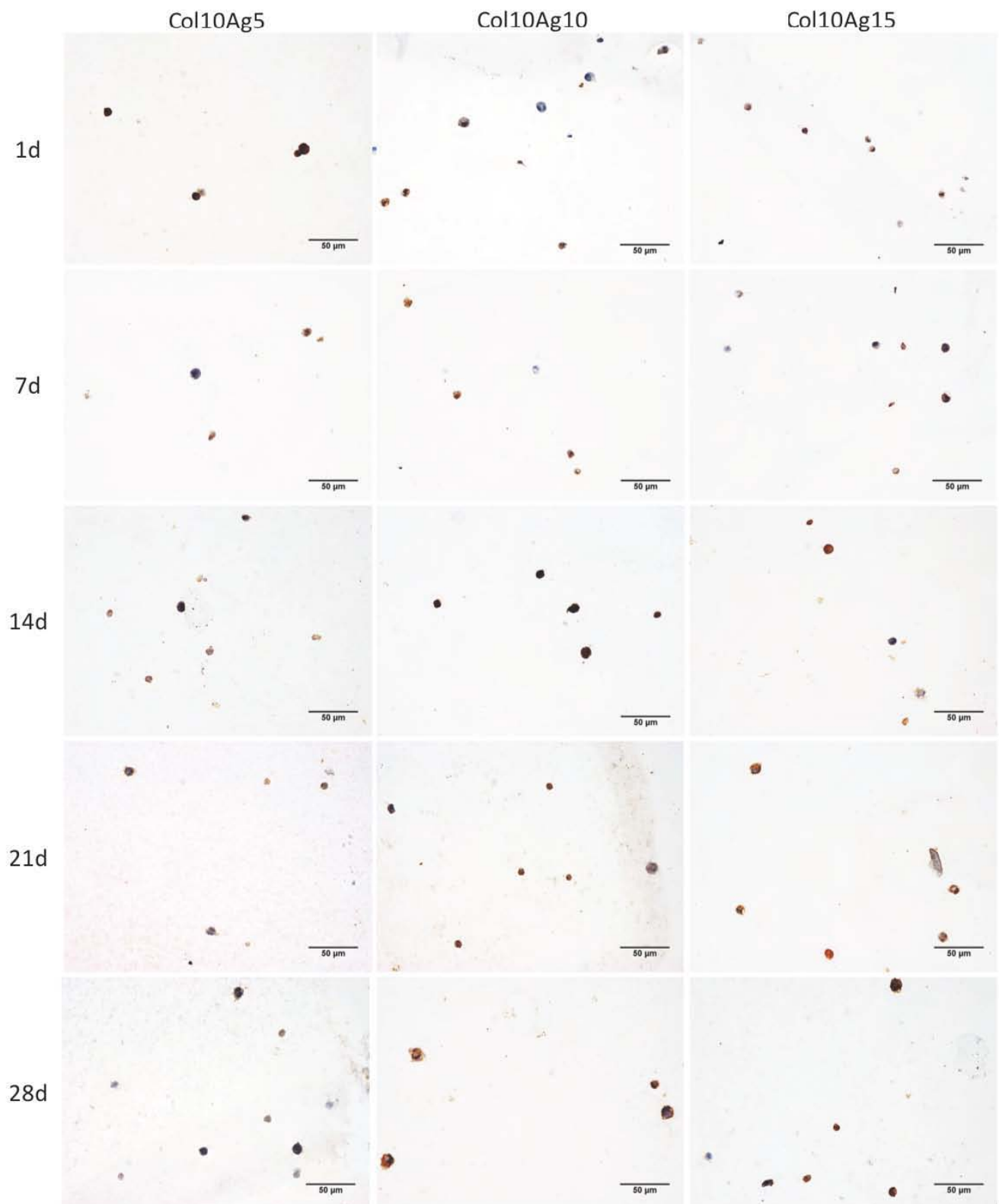


Figura 53. IHQ de constructos Col10Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x contra Pro-col-II. La marca positiva para pro-col II se observa en color café, las células están teñidas de morado por hematoxilina. La marca positiva aumentó con el tiempo en cultivo.

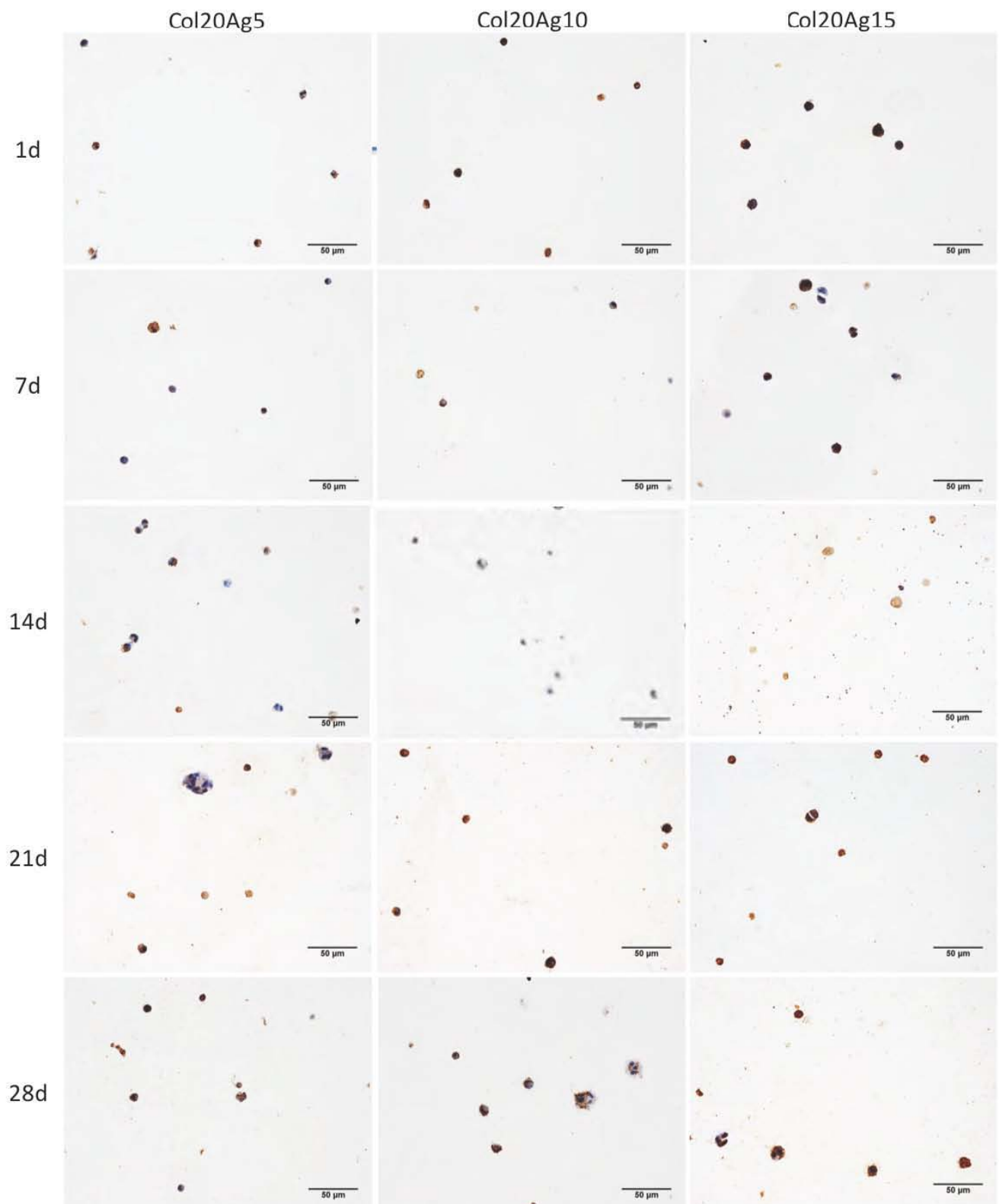


Figura 54. IHQ de constructos Col20Ag-5,10 y 15 a 1 y 28 días de cultivo 40x contra Pro-col-II. La marca positiva para pro-col II se observa en color café, las células están teñidas de morado por hematoxilina. La marca positiva aumentó con el tiempo en cultivo.

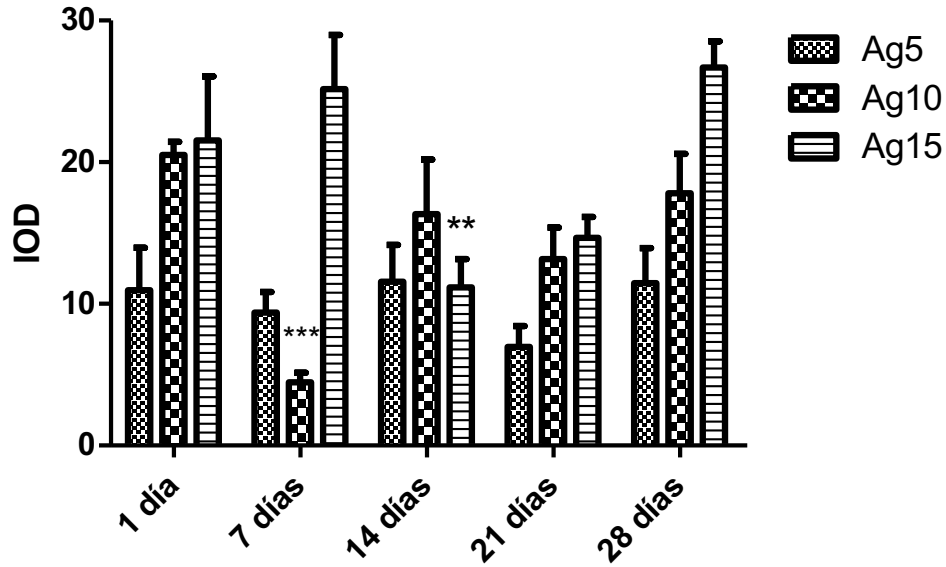


Figura 55. **Análisis de IHQ contra Pro-col-II en constructos Col20Ag-5,10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) cuantificación de la Intensidad Óptica integrada (IOD) normalizando al dividir la IOD por el número de células en el campo. Para los constructos de Col20Ag5 no hay variación significativa en la intensidad de la expresión en los diferentes tiempos de cultivo. Para Col20Ag10 y Col20Ag15 la expresión fue mayor a 28 días respecto a otros días de cultivo ($p < 0.0001$).

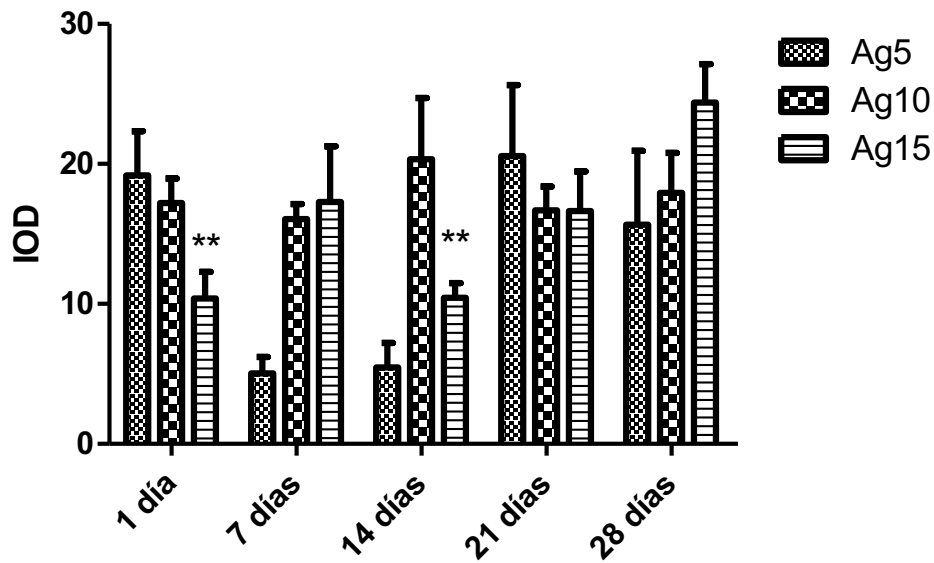


Figura 56. **Análisis de IHQ contra Pro-col II en constructos Col10Ag-5,10 y 15.** En fotomicrografías 40x (n=20) cuantificación de la Intensidad Óptica integrada (IOD) normalizando al dividir la IOD por el número de células en el campo. Para los constructos de Col10Ag5 y Col10Ag10 no hay variación significativa en la intensidad de la expresión en los diferentes tiempos de cultivo. Para Col10Ag15 la expresión es mayor a 28 días respecto a 1 día de cultivo y 14 días de cultivo ($p = 0.0059$).

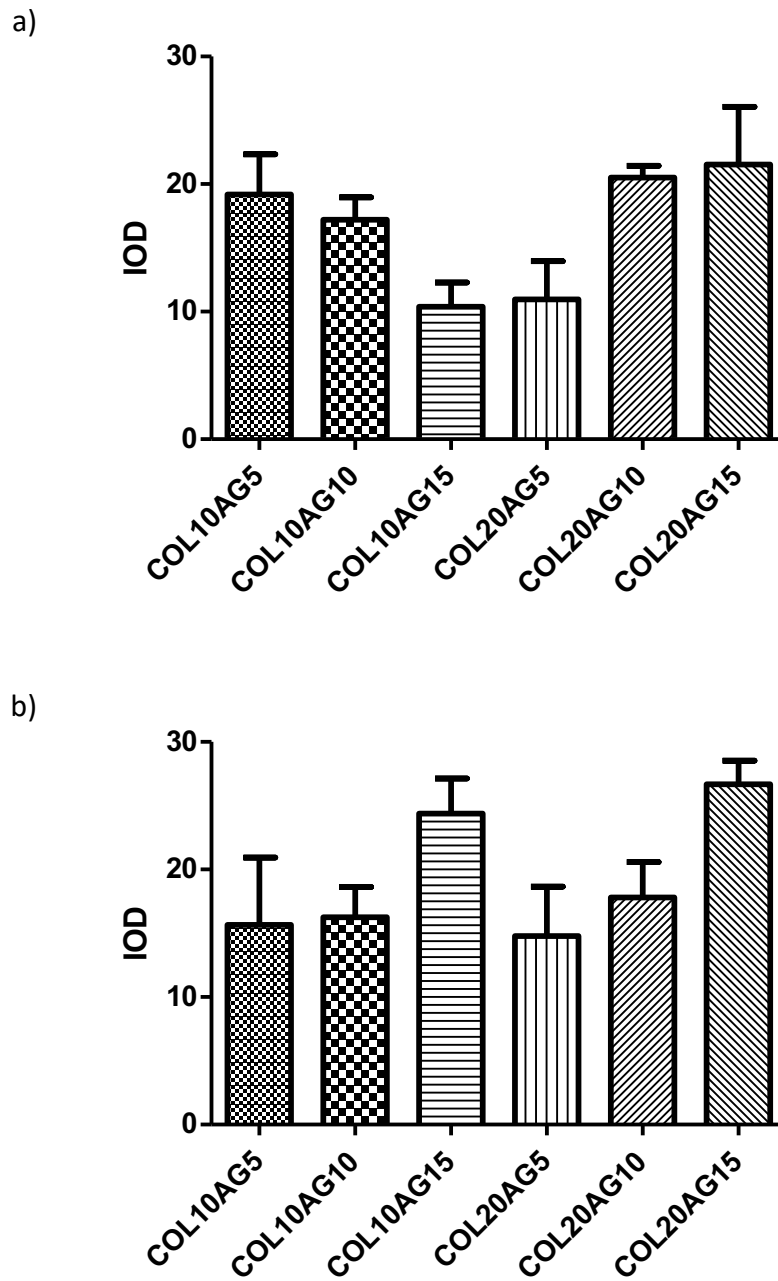


Figura 57. **Concentrado de IOD de IHQ contra Pro-col-II.** (a) constructos a 1 día de cultivo, la prueba ANOVA no arroja diferencia significativa de la IOD de Pro-col II de la célula en las diferentes condiciones de cultivo. (b) constructos a 28 días de cultivo, marcada positiva por expresión de Pro-col II no tiene diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo.

No se realizó una prueba específica para evaluar la proliferación celular, sin embargo, la figura 58 muestra una colección de imágenes de microscopía de barrido y corte histológico en las que las células se distribuyen en racimos que se asemejan a los grupos isógenos del cartílago nativo.

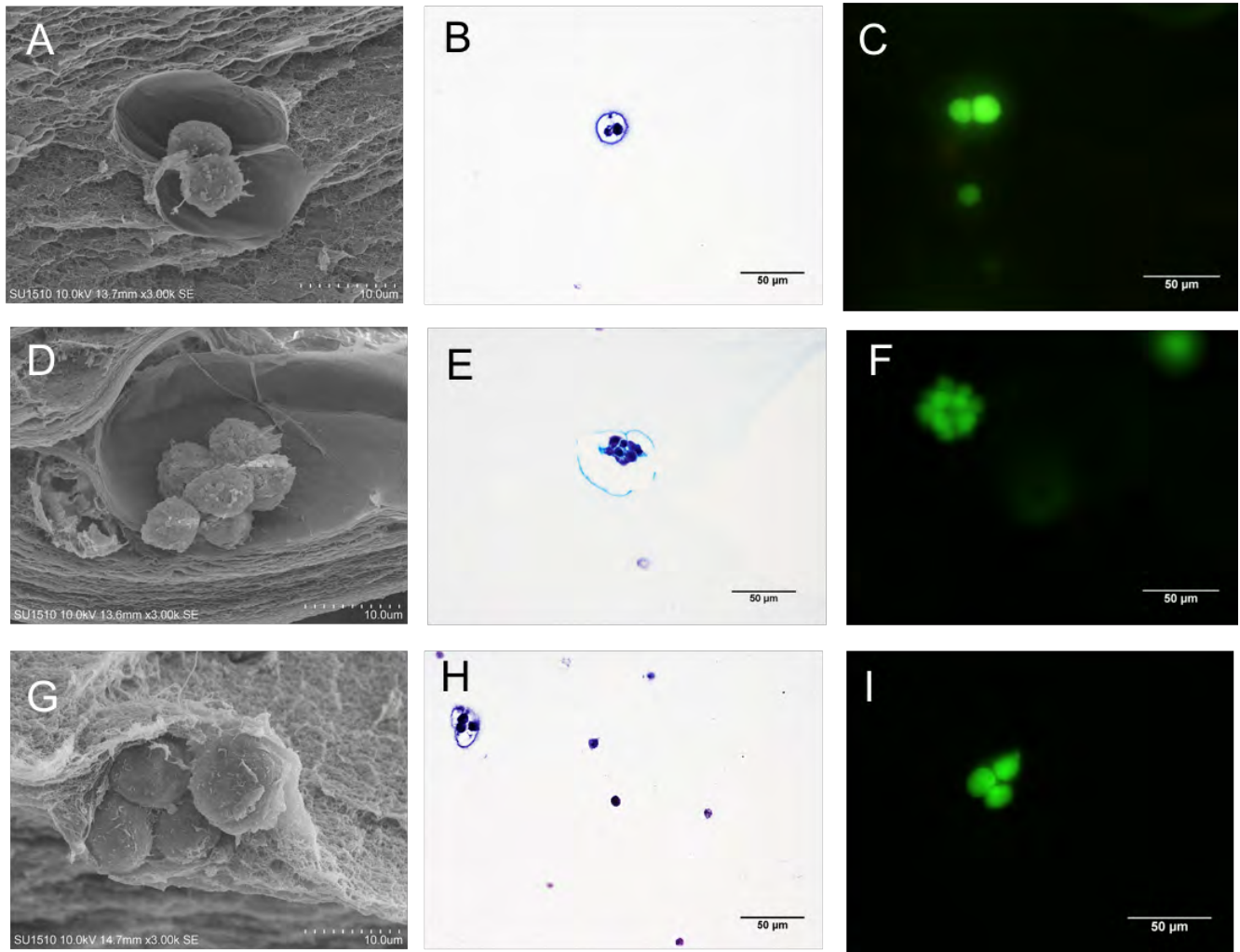


Figura 58. Colección de células en racimos. (A) MEB de Col10Ag15 28 días, (B) Tinción H&E de Col 10Ag15 14 días de cultivo y (C) células fluorescentes por calceína, se observan dos células adyacentes que remodelan la matriz hacia la zona de no contacto. (D) MEB de Col10Ag15 28 días, (E) Tinción azul alcian de Col20Ag5 14 días y (F) células fluorescentes por calceína Col20Ag5 21 días de cultivo, se observa una aglomeración de células unidas al material por una cara y con gran espacio circundante. (G) MEB de Col20Ag10 28 días, (H) Tinción H&E de Col10Ag10 28 días e (I) Col10Ag10 21 días de cultivo fluorescentes por calceína, se observa un cúmulo de células estrechamente rodeadas por la matriz.

Discusión

La ingeniería del cartílago articular se orienta al desarrollo de materiales con propiedades parecidas al cartílago nativo, como son el contenido de agua, la permeabilidad, las propiedades mecánicas, que sea biocompatible y de bajo costo. Los hidrogeles son uno de los materiales más utilizados en la construcción de sustitutos de tejido en la medicina regenerativa, su composición y arquitectura permite la difusión de factores solubles, nutrientes, gases y desechos, además de proveer un nicho inicial para las células, permitir las interacciones célula-célula y célula-matriz (Xia et al, 2017).

Los hidrogeles de agarosa han sido ampliamente utilizados en la ingeniería del cartílago articular (Benya y Shaffer, 1982), debido a que los hidrogeles incrementan la rigidez en proporción con la concentración del polímero, por lo que este tipo de matrices exploran el efecto de las propiedades mecánicas en el destino celular (Caccavo et al., 2017). Jutila et al. demostraron que los condrocitos encapsulados en geles con diferentes concentraciones de agarosa tenían un comportamiento diferencial; en los constructos de menor concentración el perfil metabólico se asemeja al expresado por condrocitos con osteoartritis, mientras que en los de mayor rigidez el perfil asemejaba al cartílago sano (Jutila et al., 2015). En 2017 se describió que el proceso de diferenciación de células mesenquimales se modificaba de acuerdo a la rigidez del sustrato en que se cultivaban; resultó de particular interés que el bloqueo de la subunidad beta 1 de integrina inhibía el proceso de diferenciación celular independientemente de la rigidez del sustrato, concluyendo que la rigidez mecánica de los constructos regula el comportamiento celular a través de las uniones celulares con la matriz (Olivares-Navarrete et al., 2017).

La concentración de agarosa que emula la rigidez del cartílago afecta otras propiedades del material, con el aumento de la concentración disminuye el tamaño de poro y el coeficiente de difusión de solutos que afecta los procesos de intercambio de sustancias esenciales para el desarrollo celular (Shoga et al., 2017), además de que la agarosa no contiene motivos de adhesión para las células. La incorporación de péptidos de adhesión celular (p. ej. RGD) en polímeros es una estrategia que retoma las propiedades mecánicas de los geles de agarosa y las asocia con las uniones celulares a la matriz, el propósito es controlar la mecánica y la densidad de ligandos de la MEC, sin sacrificar la riqueza bioquímica y la

información topológica codificada en las redes de proteínas naturales (Ulrich et al., 2010). En este proyecto exploramos una matriz de la proteína natural como la Col-I hidrolizada en combinación con el polímero agarosa en diferentes concentraciones para determinar si existe un efecto en el fenotipo de condrocitos encapsulados que se pueda asociar a las propiedades de la matriz.

En la práctica clínica la fracción de tejido que puede tomarse de un paciente es reducido, la expansión *in vitro* permite aumentar la población celular, sin embargo, se ha demostrado que desde el primer pase disminuye la expresión de los genes condrogénicos como colágena II y agregano, y aumenta la expresión de genes característicos del fibrocartílago como Col-I (Darling y Athanasiou, 2005; Lefebvre et al., 1994). Para explorar el efecto de la matriz colágena/agarosa en células con un proceso de cambio de fenotipo iniciado pero reversible (Huang, Hu, y Athanasiou, 2016), se expandieron y encapsularon en pase 3. El cultivo de condrocitos se caracterizó por el cambio de morfología de redondeadas a alargadas tipo fibroblasto, como se describe en la fig. 8-10. Estas observaciones coinciden con reportes previos en los que el cambio en la morfología se asocia con cambios en el perfil bioquímico de secreción (Demoor et al., 2014).

Para la construcción del andamio colágena/agarosa se desarrolló una estrategia de fabricación que modula las propiedades de los geles de colágena de manera gradual respecto a la incorporación de agarosa, partiendo del principio de que la concentración de agarosa determina su rigidez. A través de imágenes de MEB (fig. 11) se demostró que la colágena forma una red densa desorganizada de fibras. Al añadir agarosa se observa una red intercalada entre las fibras, con empaquetamiento de estas conforme el aumento de la concentración de agarosa. La agarosa en los geles de colágena/agarosa tenía una morfología similar a los geles de sólo agarosa, sugiriendo que la polimerización de la agarosa no se afectaba por el ensamble de las fibras de colágena. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Ulrich et al. que con imágenes de MEB, DIC (high magnification differential interference contrast) e imagenología SHG (Second Harmonic Generation) confirmaron que el diámetro de las fibras de colágena es independiente de la concentración de agarosa (Ulrich et al., 2010). El rango de concentración de agarosa (0.5-1.5%) para la construcción de los andamios se seleccionó con base en estas imágenes, optando por aquella concentración en la que las fibras de colágena resultaran evidentes.

El proceso de construcción del andamio de colágena/agarosa implicó acoplar dos procesos de polimerización contrarios, el de agarosa que debe solubilizarse y esterilizarse a 120°C y dejarse enfriar a 16°C para que adapte su forma final, y por otro lado, colágena que debe neutralizarse (pH=7) e incubar 30 minutos a 37°C para formar fibras, en ambos casos una vez concluido el proceso de polimerización la forma se mantiene por lo que encapsular células en estos materiales implica exponerlas al proceso completo de polimerización de ambos materiales. A las condiciones adversas de la fabricación asociamos el elevado porcentaje de células muertas en el día 1 de cultivo aproximadamente 50%, esto coincide con otros grupos han reportado fenómenos similares de daño celular debido al proceso de encapsulación (Batorsky et al., 2005). Sin embargo, a partir del día 7 de cultivo el porcentaje de células vivas es aproximadamente de 85% en todas las condiciones de cultivo, lo que sugiere que después del proceso de encapsulación las células se mantienen viables en el andamio.

A través de imágenes de microscopía de barrido se demostró que las células en el día 1 de cultivo se distribuyen por todo el constructo no generan cúmulos y el material rodea estrechamente las células. En todos los casos es posible observar fibras de colágena y la red de agarosa, concluyendo que en todas las condiciones de concentración de colágena/agarosa el proceso de fabricación distribuye uniformemente los materiales y las células en el constructo.

En los constructos control de sólo agarosa, los condrocitos en todas etapas de cultivo son esféricas y están estrechamente rodeadas de la matriz de agarosa, no se observan proyecciones citoplasmáticas hacia la matriz. En cambio, en los constructos de colágena/agarosa las células remodelan la matriz, se observan huecos en donde la célula se desarrolla, en la región interna hueco que está en contacto con la matriz tiene una textura lisa que contrasta con la región externa donde se nota la red de agarosa y las fibras de colágena. El hueco conforme el tiempo de cultivo avanza incrementa su tamaño, sin embargo, es importante resaltar que las células conservan su tamaño y la morfología redondeada, como en el día 1 de cultivo. La morfología de los condrocitos es una característica que se puede asociar con el estado de diferenciación de las células, en el desarrollo de la osteoartritis las alteraciones en el volumen celular y la morfología son un proceso clave en el desarrollo de la enfermedad. En cartílagos femorales de humano, con microscopía confocal *in vivo*, se describió que la morfología de los

condrocitos en tejido con osteoartritis es de bordes irregulares, con proyecciones citoplasmáticas mayores a 2 μm , células agrandadas y formando racimos de células (Karim, Amin, y Hall, 2018).

El mantenimiento de la morfología redondeada, sin proyecciones citoplasmáticas extensas, no voluminosas y sin formar racimos de células, es crucial en las estrategias que buscan desarrollar sustitutos del cartílago articular (Hall, 2019). Al respecto, Karim y Hall describieron como la rigidez de la matriz en que se cultivan condrocitos es determinante de la morfología, al comparar geles de 0.2 y 2% de agarosa describieron que en los geles de mayor rigidez la morfología se mantuvo esférica/elíptica sin proyecciones citoplasmáticas, mientras que en los geles de menor concentración la morfología era más alargada y con proyecciones citoplasmáticas en mayor cantidad y de mayor longitud. Además de aumentar con el tiempo de cultivo el volumen celular y el número de células en racimos (Karim y Hall, 2017). Dicha morfología se asocia a cambios metabólicos, Parreno et al. describieron que, al inducir la despolimerización de las fibras de actina de condrocitos en cultivo, se provocaba un cambio morfológico al inducir la redondez de la célula, lo que, incrementaba la expresión de agregano y reducía la expresión de Col-I. El subsecuente bloqueo del factor de despolimerización inducía la polimerización de actina, la célula se alargaba y se incrementaba la expresión de Col-I. Concluyendo que la polimerización de actina regula el estado de diferenciación del condrocito (Parreno et al., 2017). El modelo de colágena/agarosa en todas las condiciones preservó la forma redondeada de las células, en contraste con el control de sólo colágena en el que las células tenían una forma alargada, con proyecciones citoplasmáticas largas y volumen aumentado.

La morfología redondeada de los condrocitos se asoció a un perfil metabólico de cartílago hialino sano, las preparaciones histológicas de los constructos permiten visualizar el depósito de moléculas en el constructo. En la tinción con hematoxilina del cartílago las fibras de colágena son enmascaradas por la sustancia fundamental en la cual están incluidas, por lo tanto, las fibras no son visibles. En los constructos de colágena/agarosa a 1 día de cultivo las células se observan redondeadas y teñidas por hematoxilina y la matriz no se tiñe con hematoxilina (fig. 35 y 36), a partir de 7 días el material cercano a la célula, presenta la tendencia a teñirse con hematoxilina, lo que coincide con la tinción del cartílago donde la matriz pericelular, que contiene GAGs sulfatados, exhibe basofilia con la hematoxilina. El aspecto del citoplasma de los condrocitos varía según la actividad de la célula. Los condrocitos que

están activos en la producción de la matriz exhiben regiones de basofilia citoplasmática (Ross y Pawlina, 2015).

La tinción azul alcian se une a los polianiones de los mucopolisacáridos ácidos por medio de puentes salinos y es indicador de la presencia de GAGs sulfatados. A un día de cultivo se observan las células teñidas de morado por el contraste con hematoxilina de la técnica, a partir de 7 días algunas células muestran depósitos de moléculas teñidas con azul alcian. La cuantificación de células demuestra que conforme el tiempo de cultivo avanza la cantidad de células con marca de azul alcian aumenta. Para cuantificar el depósito de las moléculas se midió el área coloreada por el azul alcian, en la fig. 43a es un comparativo del área de las células en las diferentes condiciones de cultivo a 1 día, no existe diferencia significativa entre las condiciones lo que se interpreta como que las diferentes concentraciones de agarosa no tienen efecto en el volumen celular. En todos los casos el área marcada por azul alcian aumentó conforme el tiempo de cultivo se incrementó, en promedio es 600 veces mayor. Sin embargo, no existe diferencia significativa conforme la condición de cultivo de acuerdo con la fig. 43b. Al comparar el aspecto del cartílago nativo teñido con azul alcian (fig. 44) con los constructos de colágena/agarosa, destacó la tinción intensa de la región pericelular. Los constructos de sólo colágena no tuvieron depósito de GAGs sulfatados y los de sólo agarosa no fue tan intensa la tinción en la región pericelular.

La tinción tricrómica de Masson evidencia las fibras de colágena, sin embargo, en muestras de cartílago el compartimiento fibroso de Col-II no se observa por presentar la misma afinidad que la sustancia fundamental en la que quedan enmascaradas. En los constructos de colágena/agarosa la matriz no exhibe afinidad por colorante alguno en ninguna condición a ninguna edad, sin embargo, en el control de sólo colágena si son teñidas las fibras. Por las imágenes de microscopía de barrido sabemos que las fibras de colágena se formaron en la matriz, por lo que, la adición de agarosa no permitió la tinción del colorante. Otra posibilidad es que la cantidad de colágena sea tan pequeña que no puede ser detectada con la tinción.

La tinción de Masson no reveló depósitos de colágena, sin embargo, para caracterizar la actividad sintética de las células se realizaron ensayos de inmunohistoquímica que identifican con precisión

moléculas de pro-colágena tipo II y Col-X, marcador de condrocitos hipertróficos. Por lo que la expresión activa de esta molécula es reflejo de un estado de diferenciación que difiere del perfil de cartílago hialino articular. Los condrocitos tomaron una ruta de diferenciación similar a la ocurrida en las placas de crecimiento de los huesos, produciendo Col-X, marcador de condrocitos hipertróficos. Por lo que la expresión activa de esta molécula es reflejo de un estado de diferenciación que difiere del perfil de cartílago hialino articular. Como estrategia para establecer si existen diferencias en la expresión de los marcadores en función de las propiedades del constructo, se analizó la intensidad de la marca positiva encontrando que, en los constructos de menor concentración de agarosa (0.5%) la intensidad de la marca fue mayor conforme el tiempo de cultivo aumentó. En los constructos de concentración media de agarosa (1%) no hay una tendencia del valor, sino que se mantiene estable en los días de cultivo. En los constructos de mayor concentración de agarosa (1.5%) la intensidad de la marca disminuyó con el tiempo de cultivo (fig. 49 y 51). El valor de la IOD en los constructos de concentración baja y media de agarosa fue mayor en los que contenían la menor proporción de colágena; en los constructos de mayor concentración de agarosa, la concentración de colágena no tuvo efecto en el valor de la IOD.

La expresión de colágena II es un indicador del estado de diferenciación de los condrocitos, en los constructos de menor concentración de agarosa la expresión no tuvo diferencias significativas después de 28 días de cultivo. En la concentración media de agarosa hubo un aumento significativo en la intensidad de la marca de 7 a 28 días sólo en los constructos con la mayor proporción de colágena. Para los hidrogeles con la mayor concentración de agarosa en ambas proporciones de colágena la intensidad de la marca fue mayor a 28 días de cultivo. A pesar de estos aumentos, en la fig. 57b se muestra que no hubo diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo en la intensidad de la expresión de la pro-col II.

Con frecuencia en el cartílago nativo dos o más condrocitos se localizan muy cerca uno de otro, separados sólo por un delgado tabique de matriz. Estos cúmulos se denominan grupos isógenos y sus integrantes se originan de una sola célula precursora. Las células en el grupo secretan matriz y se separan (Ross y Pawlina, 2015). En los constructos de colágena/agarosa no se realizó una prueba para demostrar la división celular, sin embargo, con imágenes de microscopía de barrido se demostró que la técnica de fabricación conllevó la distribución homogénea de las células y la no formación de

agregados, por lo que imágenes como las presentadas en la fig. 58 pueden ser resultado de procesos de división celular. Las imágenes histológicas demuestran además que son células activas en la secreción de moléculas como GAGs.

Conclusiones

Para la generación de constructos de colágena/agarosa se estableció un cultivo primario de condrocitos articulares de cerdo, el proceso de expansión celular se caracterizó por cambios en la morfología, de células redondeadas a alargadas y estrechas, que se asocian con alteraciones en el perfil secretor de las células.

A través de imágenes de microscopía de barrido se caracterizó el efecto de añadir concentraciones crecientes de agarosa a soluciones de colágena con la metodología propuesta, las concentraciones seleccionadas 0.5, 1 y 1.5% de agarosa no alteraron la polimerización de la colágena al notarse fibras en los constructos, la agarosa se intercalaba entre las fibras.

El proceso de encapsulación expuso a las células a condiciones no favorables que resulta en una sobrevida promedio del 50% que coincidió con datos previamente reportados. Sin embargo, a partir del día 7 de cultivo la sobrevida fue mayor al 90%. El constructo de colágena/agarosa no fue un ambiente adverso para las células, incluso fueron capaces de producir componentes de la matriz extracelular demostrado con inmunohistoquímica y con anilinas.

El constructo de colágena/agarosa permitió la interacción de las células con la matriz, demostrado por la formación de proyecciones citoplasmáticas cortas. Además, las células fueron capaces de remodelar la matriz demostrado por la formación de excavaciones dentro de los que se desarrollaron las células, situación que recuerda a las lagunas del cartílago nativo. Cabe destacar que la matriz inhibió la formación de fibras de estrés y el alargamiento de las células conservando una morfología redondeada a pesar de no estar confinada por la matriz sino en el hueco formado. En contraste, las células en andamios de sólo colágena las células aumentaron su volumen, emitieron proyecciones citoplasmáticas largas y su morfología fue alargada, todas ellas características de condrocitos en proceso de desdiferenciación. En los andamios de sólo agarosa las células se mantenían redondeadas, no emitían proyecciones citoplasmáticas hacia la matriz ni formaron excavaciones.

Con las tinciones de hematoxilina y eosina y de azul alcian se verificó que los condrocitos encapsulados se mantuvieron activos ya que depositaron de componentes matriciales, en particular de GAGs sulfatados. Conforme el tiempo de cultivo avanzó el número de células y la cantidad de matriz depositada aumentó. La tinción tricrómica de Masson no reveló depósito importante de colágena, sin embargo, a través de inmunohistoquímica se demostró que las células produjeron Col-II, la intensidad de la marca se asoció a la cantidad de Col-II y en el transcurso del cultivo no disminuyó, sino que se mantuvo, por lo que el proceso de desdiferenciación de las células por el proceso de expansión celular no continuó.

Se determinó que las propiedades del constructo asociadas a la concentración de los componentes, tuvo un efecto en el perfil metabólico de las células. En los constructos con la mayor concentración de agarosa se inhibió la expresión de Col-X, en tanto que en los de menor concentración se estimuló la expresión.

En lo individual constructos de colágena y agarosa preservan sólo algunas de las características deseadas en constructos para la reparación del cartílago articular, sin embargo, la combinación de los materiales potenció las características deseables de cada uno de ellos. Los condrocitos encapsulados tuvieron una forma redondeada, con proyecciones citoplasmáticas cortas, remodelando la matriz y depositando moléculas características del cartílago hialino articular como GAGs sulfatados y Col-II.

Si bien en tinciones no hay una diferencia significativa de la acumulación de glucosaminoglucanos sulfatados entre los andamios de diferentes composiciones, si existe una diferencia en Col-X cuyo depósito es mayor en los geles de menor concentración de agarosa colágena, mientras que Pro-col-II tiene la tendencia de aumentar en la mayor concentración de agarosa. Tomando en consideración dichos resultados el andamio que funcionaría como sustituto de cartílago articular es Col20Ag15, sin embargo, es necesario agregar otras pruebas que describan y definan las propiedades del constructo.

Perspectivas

Este proyecto fue la presentación de un constructo novedoso para la ingeniería del tejido articular, si bien colágena y agarosa son biomateriales que han sido ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos, por primera vez se propone la construcción de un sustituto de cartílago hialino combinado colágena y agarosa, y encapsulando condrocitos de cerdo.

Las pruebas aquí descritas pretendían describir el desempeño general de las células en el constructo, los resultados de acumulación de GAGs, demostrado por la tinción de azul alcian y H&E; producción de Pro-col-II, marcador característico de cartílago hialino; y la inhibición de Col-X, marcador de condrocitos hipertróficos, el conjunto de pruebas nos lleva concluir que el andamio de colágena/agarosa es un modelo competente para la construcción de un sustituto de cartílago articular. Sin embargo, es necesario complementar con otras pruebas que permitan definir con mayor precisión el desempeño celular, al respecto se sugiere:

- Definir si las células expresan el factor de transcripción Sox-9, característico de cartílago hialino.
- Caracterizar el perfil secretor de los condrocitos, ya sea analizando las moléculas secretadas a la matriz o los genes activos para la producción de MEC

Los resultados demuestran diferencias respecto a la concentración de agarosa y a la concentración de colágena por lo que la caracterización de las propiedades mecánicas de los andamios podría asociarse al desempeño de los condrocitos.

El proyecto aquí presentado evaluó sólo la influencia del material en los condrocitos, sin embargo, es reconocido que la adición de factores al medio de cultivo como ITS, ácido ascórbico, dexametasona, entre otros, aumenta la producción de las moléculas características de cartílago hialino.

Las condrocitos empleados son células diferenciadas que, si bien por el proceso de cultivo en monocapa dejan de sintetizar sus moléculas características, no dejan de ser condrocitos. Otra posible alternativa para la matriz de colágena/agarosa es el uso de células mesenquimales, en las que se evalúe si el andamio induce la diferenciación celular a cartílago.

Literatura citada

- Álvarez, V., Monjil, F., & Soto, V. (2002). Bioquímica y biología del cartílago articular, 391–400.
- Antoine, E. E., Vlachos, P. P., & Rylander, M. N. (2014). Review of collagen i hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: Characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 20(6), 683–696. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0086>
- Appelman, T. P., Mizrahi, J., Elisseeff, J. H., & Seliktar, D. (2011). The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes. *Biomaterials*, 32(6), 1508–1516. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.017>
- Awad, H. A., Wickham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M., & Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 25(16), 3211–3222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>
- Balakrishnan, B., & Banerjee, R. (2011). Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chemical Reviews*, 111(8), 4453–4474. <https://doi.org/10.1021/cr100123h>
- Batorsky, A., Liao, J., Lund, A. W., Plopper, G. E., & Stegemann, J. P. (2005). Encapsulation of Adult Human Mesenchymal Stem Cells Within Collagen-Agarose Microenviroments. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(4), 492–500. <https://doi.org/10.1002/bit.20614>
- Benya, P. D., & Shaffer, J. D. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30(1), 215–224. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90027-7)
- Bernhard, J. C., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0314-3>
- Bougault, C., Aubert-Foucher, E., Paumier, A., Perrier-Groult, E., Huot, L., Hot, D., ... Mallein-Gerin, F.

- (2012). Dynamic compression of chondrocyte-agarose constructs reveals new candidate mechanosensitive genes. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036964>
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 331(14), 889–895. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>
- Buckley, C. T., Thorpe, S. D., Brien, F. J. O., Robinson, A. J., & Kelly, D. J. (2009). The effect of concentration , thermal history and cell seeding density on the initial mechanical properties of agarose hydrogels, 2, 512–521. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.12.007>
- Caccavo, D., Cascone, S., Poto, S., Lamberti, G., & Barba, A. A. (2017). Mechanics and transport phenomena in agarose-based hydrogels studied by compression-relaxation tests. *Carbohydrate Polymers*, 167, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.027>
- Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J., & Weder, C. (2016). Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater. Sci.*, 4(5), 734–767. <https://doi.org/10.1039/C6BM00068A>
- Chen, C., Tambe, D. T., Deng, L., & Yang, L. (2013). Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *AJP: Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00242.2013>
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Research*, 5(August 2016). <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
- Chevalier, X., & Richette, P. (2016). Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimiento. *EMC - Aparato Locomotor*, 49(2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(16\)78239-6](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(16)78239-6)
- Darling, E. M., & Athanasiou, K. A. (2005). Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(2), 425–432.

<https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.008>

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., ... Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(8), 2414–2440. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>

Djian, P., & Versier, G. (2008). Técnica de reconstrucción cartilaginosa, 1–18.

Friess, W. (1998). Collagen biomaterial for drug delivery 1. *European Journal of Pharmaceutics*, 45, 113–136.

García-Carvajal, Z., Garcíadiago-Cázares, D., Parra- Cid, C., Aguilar-Gaytn, R., Velasquillo, C., Ibarra, C., & Castro Carmo, J. S. (2013). Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering* (pp. 365–398). InTech. <https://doi.org/10.5772/55917>

Hall, A. C. (2019, August 1). The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype—Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering. *Current Rheumatology Reports*. Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0837-6>

Huang, B. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2016). Effects of passage number and post-expansion aggregate culture on tissue engineered, self-assembled neocartilage. *Acta Biomaterialia*, 43, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.044>

Inkinen, S., Liukkonen, J., Ylärinne, J. H., Puhakka, P. H., Lammi, M. J., Virén, T., ... Töyräs, J. (2014). Collagen and chondrocyte concentrations control ultrasound scattering in agarose scaffolds. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 40(9), 2162–2171. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2014.03.016>

Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of

proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11–55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>

Jutila, A. A., Zignego, D. L., Schell, W. J., & June, R. K. (2015a). Encapsulation of Chondrocytes in High-Stiffness Agarose Microenvironments for In Vitro Modeling of Osteoarthritis Mechanotransduction. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(5), 1132–1144. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1183-5>

Jutila, A. A., Zignego, D. L., Schell, W. J., & June, R. K. (2015b). Encapsulation of Chondrocytes in High-Stiffness Agarose Microenvironments for In Vitro Modeling of Osteoarthritis Mechanotransduction. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(5), 1132–1144. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1183-5>

Karim, A., Amin, A. K., & Hall, A. C. (2018). The clustering and morphology of chondrocytes in normal and mildly degenerate human femoral head cartilage studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Anatomy*, 232(4), 686–698. <https://doi.org/10.1111/joa.12768>

Karim, A., & Hall, A. C. (2017). Chondrocyte Morphology in Stiff and Soft Agarose Gels and the Influence of Fetal Calf Serum. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 1041–1052. <https://doi.org/10.1002/jcp.25507>

Keeney, M., Lai, J. H., & Yang, F. (2011). Recent progress in cartilage tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5), 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.003>

Kish, G., & Hangody, L. (2004, May). A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*. England.

Kreger, S. T., Bell, B. J., Bailey, J., Stites, E., Kuske, J., Waisner, B., & Voytik-Harbin, S. L. (2010). Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers*, 93(8), 690–707. <https://doi.org/10.1002/bip.21431>

Kuiper, N. J., & Sharma, A. (2015). A detailed quantitative outcome measure of glycosaminoglycans in

human articular cartilage for cell therapy and tissue engineering strategies. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(12), 2233–2241. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.07.011>

Lake, S. P., & Barocas, V. H. (2011). Mechanical and structural contribution of non-fibrillar matrix in uniaxial tension: A collagen-agarose co-gel model. *Annals of Biomedical Engineering*, 39(7), 1891–1903. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0298-1>

Leddy, H. A., Awad, H. A., & Guilak, F. (2004). Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: Effects of scaffold material, time, and culture conditions. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 70(2), 397–406. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30053>

Lefebvre, V., Garofalo, S., Zhou, G., Metsäranta, M., Vuorio, E., & De Crombrughe, B. (1994). Characterization of primary cultures of chondrocytes from type II collagen/ β -galactosidase transgenic mice. *Matrix Biology*, 14(4), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0945-053X\(94\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0945-053X(94)90199-6)

Li, X., Chen, S., Li, J., Wang, X., Zhang, J., Kawazoe, N., & Chen, G. (2016). 3D culture of chondrocytes in gelatin hydrogels with different stiffness. *Polymers*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/polym8080269>

Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., ... He, N. (2017). Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research*, 5(November 2016), 17014. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>

Loeser, R. F. (2014). Integrins and chondrocyte – matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology*, 39, 11–16.

Mansour, J. M. (2009). Biomechanics of Cartilage. *Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, 66–79. <https://doi.org/10.1002/art.23548>

Martin, J. A., & Buckwalter, J. A. (2003). The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 85-A Suppl, 106–110. <https://doi.org/10.2106/00004623-200300002-00014>

- Miao, Z., Lu, Z., Wu, H., Liu, H., Li, M., Lei, D., ... Zhao, J. (2017). Collagen, agarose, alginate and Matrigel hydrogels as cell substrates for culture of chondrocytes *in vitro* : A comparative study. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.26411>
- Mouw, J. K., Case, N. D., Gulberg, R. E., Plaas, A. H. K., & Levenston, M. E. (2005). Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage*, *13*(9), 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.020>
- Mow, V. C., Ratcliffe, A., & Robin Poole, A. (1992). Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*, *13*(2), 67–97. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90001-5)
- Ng, K. W., Ateshian, G. A., & Hung, C. T. (2009). Zonal chondrocytes seeded in a layered agarose hydrogel create engineered cartilage with depth-dependent cellular and mechanical inhomogeneity. *Tissue Engineering. Part A*, *15*(9), 2315–2324. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0391>
- Nomura, Y., Ishii, Y., & Takahashi, K. (2009). Control of Collagen Molecular Assembly with Anionic Polysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(4), 926–929. <https://doi.org/10.1271/bbb.80576>
- Olivares-Navarrete, R., Lee, E. M., Smith, K., Hyzy, S. L., Doroudi, M., Williams, J. K., ... Schwartz, Z. (2017). Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PloS One*, *12*(1), e0170312–e0170312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170312>
- Ortega-Orozco, R., Olague-Franco, J., & Miranda-Ramírez, E. (2018). Implantación de condrocitos autólogos versus microfracturas para el tratamiento de lesiones del cartílago en la rodilla. *Acta Ortopédica Mexicana.*, *32*(6), 322,328.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, *3*(3), 1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>

- Parreno, J., Nabavi Niaki, M., Andrejevic, K., Jiang, A., Wu, P. H., & Kandel, R. A. (2017). Interplay between cytoskeletal polymerization and the chondrogenic phenotype in chondrocytes passaged in monolayer culture. *Journal of Anatomy*, 230(2), 234–248. <https://doi.org/10.1111/joa.12554>
- Rahmati, M., Nalesso, G., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2017). Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Research Reviews*, 40, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.07.004>
- Ross, M., & Pawlina, W. (2015). *Histología: Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular* (7th ed.). Wolters Kluwer.
- Sánchez Naranjo, J. C., & López Zapata, D. F. (2011). Fisiopatología celular de la osteoartritis: El condrocito articular como protagonista. *Iatreia*.
- Secretaria de Salud. (2009). *Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Osteoartrosis de rodilla*. Retrieved from <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
- Selmi, T. A. S., Verdonk, P., Chambat, P., Dubrana, F., Potel, J.-F., Barnouin, L., & Neyret, P. (2008). Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: OUTCOME AT TWO YEARS. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 90-B(5), 597–604. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.90B5.20360>
- Shoga, J. S., Graham, B. T., Wang, L., & Price, C. (2017). Direct Quantification of Solute Diffusivity in Agarose and Articular Cartilage Using Correlation Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1869-6>
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Soltz, M. A. (2000). Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels. *Journal of Biomechanical Engineering*, 122(3), 252. <https://doi.org/10.1115/1.429656>

- Spiller, K. L., Maher, S. A., & Lowman, A. M. (2011). Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(4), 281–299. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0077>
- Toh, W. S., Brittberg, M., Farr, J., Foldager, C. B., Gomoll, A. H., Hui, J. H. P., ... Spector, M. (2016). Cellular senescence in aging and osteoarthritis: Implications for cartilage repair. *Acta Orthopaedica*, 87(June 2017), 6–14. <https://doi.org/10.1080/17453674.2016.1235087>
- Ulrich, T. A., Jain, A., Tanner, K., Mackay, J. L., & Kumar, S. (2010). Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen – agarose matrices. *Biomaterials*, 31, 1875–1884. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.047>
- Vanden Berg-Foels, W. S., Scipioni, L., Huynh, C., & Wen, X. (2012). Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network. *Journal of Microscopy*, 246(2), 168–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03606.x>
- Versier, G., & Barbier, O. (2014). Técnicas de reconstrucción cartilaginosa, 6(15), 1–17.
- Williams, R., Gelman, A., & Poppke, C. (1978). Collagen Fibril Formation Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(September 25), 6578–6585.
- Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J., & Guilak, F. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*, 39, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.08.009>
- Wolff, K., Goldsmith, L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., & Leffell, L. (2008). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (7th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Xia, T., Liu, W., & Yang, L. (2017). A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(6), 1799–1812. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36034>
- Yamada, Y., Hozumi, K., Aso, A., Hotta, A., Toma, K., Katagiri, F., ... Nomizu, M. (2012). Laminin active

peptide/agarose matrices as multifunctional biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(16), 4118–4125. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.044>

Yuan, T., Zhang, L., Li, K., Fan, H., Fan, Y., Liang, J., & Zhang, X. (2014). Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 102(2), 337–344. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33011>

Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., & Fu, J. (2013). Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(3), 327–339. <https://doi.org/10.1002/jctb.3970>