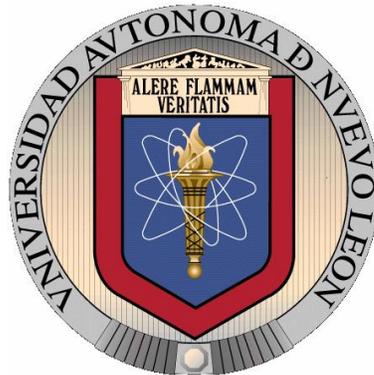


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Diseño y evaluación *in vitro* de un implante bifásico
bioactivo para la reparación de defectos osteocondrales**

Tesis presentada por:

M.C. NIDIA KARINA MONCADA SAUCEDO

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Julio de 2019



Diseño y evaluación *in vitro* de un implante bifásico bioactivo para la reparación de defectos osteocondrales

Aprobación de tesis:

Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Director de Tesis

Dr. Alberto Camacho Morales
Co-Director de Tesis

Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. Augusto Rojas Martínez
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. Med. Yanko Castro Govea
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Diagnóstico Molecular (UDM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección de la Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera.

Los cortes histológicos se realizaron en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina con la colaboración del Técnico Histopatólogo Martín García Guerrero. El M.C. Víktor J. Romero Díaz colaboró en la elaboración de los criocortes en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario, además, en el desarrollo de los ensayos de histoquímica e inmunohistoquímica que se realizaron en la Unidad de Terapias Experimentales del CIDICS. La citometría de flujo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Biología con la colaboración de la Dra. C. Erika Coronado, todas las dependencias anteriores pertenecen a la UANL.

La preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido se realizó en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina bajo la asesoría de la Q.C.B. Catalina Cortés Álvarez; las fotografías se tomaron en el Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica (CIIIA) con la colaboración de la Dra. C. María Lara Banda, ambos de la UANL. La preparación de las muestras y el análisis por micro-CT se realizó en el Departamento de Cirugía de Trauma Experimental del Klinikum rechts der Isar de la Universidad Técnica de Múnich, Alemania.

Este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina bajo el código PI17-00360. Cuenta además con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de proyecto 233365-Salud 2014



AGRADECIMIENTOS

Al que es.

A mi raíz de todo, **mi familia** (Ma', Pa', Betito, Erika); gracias por todo su esfuerzo al apoyar la realización de este proyecto de las mil formas posibles. A quien me alentaba y confortaba todos los días, me ayudaba con experimentos y me convidaba de la paciencia que me faltaba: **Vany**.

A la **Dra. Liz** por su invitación a participar en este proyecto, por todo su tiempo invertido en mi crecimiento académico y por su amistad en estos 5 años. Gracias a todos los miembros de la comisión de tesis: **Dr. Augusto, Dra. Herminia, Dr. Camacho y Dr. Yanko**, por dedicar sus conocimientos a este proyecto y por toda su amable disposición durante 4 años. Al **Dr. Martijn** y la **Dra. Elizabeth** por la oportunidad de complementar esta investigación en su laboratorio y por el agradable intercambio cultural.

A todos los colaboradores nacionales e internacionales que me asistieron con sus conocimientos y me acompañaron con una sonrisa: **M.C. Viktor, Dr. Jorge, Dr. Iván, Dra. Erika, Técnico Martín, Caty, Vladi y Mónica; al personal del CIDICS, al personal del Tecnológico de Monterrey; a Omnia, Carlos, Wen y Alejandra; y a los donadores de sangre y células madre.**

Al equipo de trabajo, por ser siempre un apoyo en los buenos y malos ratos: **Alex, Vanessa, Selem, Mayra y Susy**.

A todos mis **compañeros** de posgrado por coincidir en la misma manía y estrés.

A todo el personal administrativo del **Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, UDM y de Posgrado**, por guiarnos en cada proceso.

A **CONACYT**, sin su apoyo difícilmente lograríamos alcanzar los resultados obtenidos en esta investigación.

A todas las personas que directa o indirectamente fueron **cómplices** y **partícipes** de este proyecto. **GRACIAS**.



DEDICATORIA

Dicen que la mejor herencia que los padres pueden dejarnos a los hijos son los estudios, sin embargo, no es el único legado del cual me siento muy agradecida; **mis padres** me han permitido trazar mi camino y caminar con mis propios pies, ellos son mis pilas de la vida, por lo que el presente trabajo de investigación es dedicado a su amor, trabajo y sacrificio por mi y mis hermanos durante todos estos años.

A mis **hermanos** que a pesar de la distancia llenaban mis días de alegría.

A **Vanessa**, por ser un apoyo incondicional en mi superación académica. Por compartir mis desvelos, mi frustración y mis alegrías; su tiempo, su paciencia y su locura.

A todas las personas que apoyaron e influyeron a que el trabajo se realizara con éxito, en especial a aquellos que me abrieron las puertas, a los que me ayudaron con sus conocimientos y a los que económicamente compartieron conmigo el fruto de su trabajo para apoyar la ciencia a través de este proyecto.

A la niña que soñaba con ponerse una bata, estar en un laboratorio e investigar.

***“Un científico en su laboratorio no es solo un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas”***

-Marie Curie-



TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	3
2.1 TEJIDO OSTEOCONDRALE	3
2.1.1 ESTRUCTURA DEL TEJIDO OSTEOCONDRALE	3
2.1.2 OSTEOGÉNESIS Y CONDRÓGENESIS	9
2.1.3 DESARROLLO DE LA OSTEOARTRITIS EN LA UNIDAD OSTEOCONDRALE	12
2.1.4 EFICACIA DE LAS ESTRATEGIAS QUIRÚRGICAS ACTUALES PARA EL TRATAMIENTO DE DEFECTOS OSTEOCONDRALES	14
2.2 INGENIERÍA TISULAR EN LA REPARACIÓN DEL TEJIDO OSTEOCONDRALE	21
2.2.1 FUENTE CELULAR EN LA IT OSTEOCONDRALE	21
2.2.2 SISTEMAS DE ANDAMIAJE Y BIOMATERIALES PARA LA INGENIERÍA TISULAR OSTEOCONDRALE	23
2.2.3 FIBROÍNA DE SEDA COMO UN BIOMATERIAL PROMETEDOR PARA LA INGENIERÍA TISULAR OSTEOCONDRALE	25
2.2.4 FACTORES DE CRECIMIENTO Y BIOFUNCIONALIZACIÓN DE LOS BIOMATERIALES EN LA ITOC	38
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	41
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	42
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	43
CAPÍTULO VI. ESTRATEGIA GENERAL	44
CAPÍTULO VII. MATERIALES Y MÉTODOS	45



7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.	45
7.1.2 MATRIZ DE CARTÍLAGO Y HUESO BOVINO:	45
7.1.3 TEJIDO ADIPOSO:	45
7.1.4 ANDAMIOS:	45
7.1.5 SUERO HUMANO:	45
7.2 MATERIALES Y REACTIVOS.	45
7.2.1 MATRICES DE CARTÍLAGO Y HUESO BOVINO:	45
7.2.2 EXTRACCIÓN DE SUERO HUMANO:	45
7.2.3 AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES	46
7.2.4 CULTIVO CELULAR:	46
7.2.5 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE MSCs:	46
7.2.6 CONSTRUCCIÓN DE ANDAMIOS:	46
7.2.7 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.	47
7.2.8 AISLAMIENTO DE RNA Y ENSAYO DE EXPRESIÓN GÉNICA.	47
7.2.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).	47
7.2.10 MICROTOMOGRFIA COMPUTARIZADA (MICRO-CT):	47
7.2.11 HISTOLOGÍAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS:	47
7.3 EQUIPOS	49
7.4 METODOLOGÍA	49
7.4.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HADSCs:	49
7.4.2 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE HADSCs:	50
7.4.3 CAPACIDAD DE MULTIPOTENCIA DE LAS HADSCs:	51
7.4.4 PRODUCCIÓN DE MATRIZ DE CARTÍLAGO BOVINO (MCB).	52
7.4.5 PRODUCCIÓN DE MATRIZ DE HUESO BOVINO (MHB):	54
7.4.6 FIBROÍNA DE SEDA:	54
7.4.7 CONSTRUCCIÓN DE ANDAMIOS BIFÁSICOS:	54
7.4.8 EXTRACCIÓN DE SUERO HUMANO:	55
7.4.9 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MICROPOROSA DEL ANDAMIO POR MICRO-CT:	56
7.4.10 CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE LAS HADSCs EN LOS IMPLANTES EVALUADA POR MEB:	56
7.4.11 CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LAS HADSCs EN LOS IMPLANTES:	57
7.4.12 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MATRIZ NEOFORMADA EN LOS ANDAMIOS:	59
7.4.13 INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA:	59
7.4.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	60



CAPÍTULO VIII. RESULTADOS	61
8.1 AISLAMIENTO, CULTIVO, INMUNOFENOTIPO Y CAPACIDAD MULTILINAJE DE LAS hADSC EN MEDIO XENO-FREE.	61
8.2 PRODUCCIÓN Y DESCELULARIZACIÓN DE LA MCB	65
8.3 PRODUCCIÓN Y DESCELULARIZACIÓN DE LA MATRIZ DE HUESO BOVINO.	69
8.4 CONSTRUCCIÓN DE LOS IMPLANTES BIFÁSICOS Y ANÁLISIS DE SU MICROESTRUCTURA, CAPACIDAD PARA FAVORECER LA ADHESIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	71
8.5 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA MATRIZ NEOFORMADA EN LOS ANDAMIOS.....	81
8.6 INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES CONDRÓGENICOS Y OSTEOGÉNICOS.	87
CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN	89
9.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS hADSCs AISLADAS Y CULTIVADAS BAJO CONDICIONES XENO-FREE... ..	89
9.2 DESCELULARIZACIÓN DE LA MCB	90
9.3 MICROESTRUCTURA DE LOS ANDAMIOS BIFÁSICOS Y SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	92
9.4 INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES CONDRÓGENICOS Y OSTEOGÉNICOS.	96
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES	98
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	118
ANEXO 2. PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS	119
ANEXO 3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	125



LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Ensayos clínicos actuales basados en enfoques de la ingeniería de tejidos del cartílago para el tratamiento de enfermedades condrales y osteocondrales.
- Tabla 2.** Andamios 3D basados en FS para la ingeniería del tejido osteocondral
- Tabla 3.** Descripción de los anticuerpos empleados para citometría de flujo
- Tabla 4.** Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica
- Tabla 5.** Secuencia de los primers utilizados para qRT-PCR
- Tabla 6.** Análisis morfométrico de los andamios monofásicos por micro-CT



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación de la estructura y composición del cartílago articular.
- Figura 2.** La estructura del cartílago articular y el hueso subcondral en una articulación humana normal.
- Figura 3.** Células de la MEC ósea.
- Figura 4.** Secuencia de eventos en la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos.
- Figura 5.** Modelo hipotético de la patogenia de la osteoartritis (OA).
- Figura 6.** Esquema de la estructura de un hilo de seda en el capullo del gusano de seda.
- Figura 7.** Metodología para la construcción de andamios bifásicos.
- Figura 8.** Fenotipo de las hADSCs aisladas y cultivadas en medio xeno-free
- Figura 9.** Inmunofenotipificación de las hADSCs por citometría de flujo.
- Figura 10.** Capacidad de multipotencia de las hADSCs.
- Figura 11.** Matriz de cartílago bovino descelularizada
- Figura 12.** Análisis de la MCB descelularizada
- Figura 13.** Procesamiento de la MHB.
- Figura 14.** Partículas de NaCl y MCB observadas con estereomicroscopio.
- Figura 15.** Microestructura de los andamios bifásicos analizada por microscopía electrónica de barrido.
- Figura 16.** Análisis de la porosidad por micro-CT en cada fase del andamio.
- Figura 17.** Estructura del andamio bifásico 1:1 MCB/FS-MHB.
- Figura 18.** Reconstrucción 3D por micro-CT.
- Figura 19.** Imágenes de micro-CT, corte en 2D.
- Figura 20.** Microfotografía de los andamios celularizados con hADSCs mostrando la adhesión celular.
- Figura 21.** Proliferación celular en andamios monofásicos.
- Figura 22.** Evaluación de la matriz neoformada en el andamio.
- Figura 23.** Producción de matriz extracelular en los andamios.
- Figura 24.** Cultivo bifásico en DMEM y medio condrogénico.
- Figura 25.** Influencia del microambiente sobre la expresión génica de marcadores condrogénicos y osteogénicos.



ABREVIATURAS

AGC	Agrecano.
AH	Ácido hialurónico.
BGC	Biglicano.
BMSC	Células madre derivadas de médula ósea.
BSA	Albúmina de suero bovino.
COL I	Colágeno tipo I.
COL II	Colágeno tipo II.
DAB	Diaminobenzidina.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle médium.
DOCs	Defectos osteocondrales.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
FS	Fibroína de seda.
g	Gramos.
GAGs	Glicosaminoglicanos.
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.
h	Horas.
H₂O_d	Agua destilada.
HA	Hidroxiapatita.
hADSC	Células madre derivadas de tejido adiposo.
IAC	Implante autólogo de condrocitos.
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina-1.
ISCT	Sociedad Internacional para Terapia Celular.
ITOC	Ingeniería de tejidos osteocondral.
MCB	Matriz de cartílago bovino.
ME	Musculoesqueléticas.
MEB	Microscopía electrónica de barrido.
MEC	Matriz extracelular.
MHB	Matriz de hueso bovino.
min	Minutos.
ml	Mililitros.
MSCs	Células madre mesenquimales.
nm	Nanómetros.
OC	Osteocondral.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Buffer de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PRP	Plasma rico en plaquetas.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.



qRT-PCR	Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa.
rcf	Fuerza centrifuga relativa.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	Transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.
SFB	Suero fetal bovino.
TOC	Tejido osteocondral.
µm	Micrómetros.



RESUMEN

M.C. Nidia Karina Moncada Saucedo

Fecha de Graduación: julio de 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina
Candidato para el grado de Doctores en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Título del Estudio: Diseño y evaluación *in vitro* de un implante bifásico bioactivo para la reparación de defectos osteocondrales

Área de Estudio: Ingeniería Tisular

Número de páginas: 130

INTRODUCCIÓN: Las lesiones del tejido osteocondral frecuentemente conducen a una incapacidad, lo que genera un problema de alto costo para el sector salud. Un abordaje actual para solucionar este problema es la ingeniería tisular, mediante la construcción de implantes osteocondrales biomiméticos que permitan la síntesis de proteínas propias de la matriz y con propiedades biomecánicas similares al tejido nativo. En este trabajo se diseñó, construyó y caracterizó *in vitro* un nuevo implante bifásico, biomimético y bioactivo basado en tres biomateriales: matriz de cartílago bovino (MCB) y fibroína de seda (FS) para mimetizar el cartílago, y matriz de hueso bovino (MHB) para mimetizar el hueso subcondral. **OBJETIVO:** Diseñar y construir un nuevo andamio bifásico, biomimético y bioactivo a partir de MCB/FS-MHB para la reparación de defectos osteocondrales y evaluar *in vitro* sus propiedades biológicas. **MÉTODOS:** Se descelularizó la MCB con SDS y/o buffers hipotónicos y la MHB con peróxido de hidrógeno. Se generaron tres grupos experimentales de andamios bifásicos con diferentes proporciones de NaCl (como porógeno) y MCB, además de un grupo sin MCB. Se caracterizó su microestructura por microscopía electrónica de barrido (MEB) y microtomografía computarizada (micro-CT). Se aislaron células madre derivadas de tejido adiposo humanas (hADSCs) y se cultivaron en medio xeno-free, se caracterizó su inmunofenotipo por citometría de flujo y su capacidad multipotencia por histologías (rojo de alizarina, azul de Alcian y rojo oleoso). Se cultivaron en monocapa con o sin medio condrogénico y se sembraron en el andamio. Se evaluó su capacidad de adhesión celular (después de 7 días de cultivo) en el andamio por MEB y su proliferación celular (después de 15 días de cultivo) con azul alamar; además de su capacidad para producir matriz *de novo* por histologías (trícromico de Masson, H&E, safranina O, azul de toluidina, rojo de picrosirio) e inmunohistoquímicas (COL I, COL II y AGC). Se evaluó la influencia del microambiente en la expresión génica por qRT-PCR (al día 14 de cultivo) para COL I, COL II, COL X, AGC, PA, SOX-9, RUNX-2. **RESULTADOS:** La MCB mostró una descelularización del 91.6%, una conservación de fibras de colágeno del 86%, 58.23% de agregado y 49.4% de COL II. Se logró el ensamblaje del andamio bifásico con una metodología reproducible, donde la porosidad total fue de 75% para la fase de “cartílago” y 76% para la fase de “hueso”. Las hADSCs aisladas mostraron un inmunofenotipo característico (CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD14⁻, CD45⁻, HLA-ABC⁺ y HLA-DR⁻) y capacidad de diferenciación al linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. Las hADSCs mostraron capacidad de adhesión y proliferación celular en el andamio, además de producción de matriz *de novo* que expresaba COL II y AGC. A pesar de que no hubo diferencias significativas a nivel mensajero, la presencia de la MHB regula a la baja la expresión de marcadores osteogénicos para la fase de “hueso” y potencia la expresión de COL II. **CONCLUSIÓN:** Se generó un nuevo modelo de implante bifásico biomimético y bioactivo de tres componentes (MCB/FS-MHB) con una metodología altamente reproducible, el cual provee un entorno temporal que ayuda a la infiltración, adhesión, proliferación y diferenciación de hADSCs que son capaces de expresar marcadores condrogénicos, incluso sin estímulo químico; produciendo una MEC con presencia de COL II, para su aplicación en la regeneración de lesiones osteocondrales.

Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Director de tesis



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las afecciones musculoesqueléticas (ME) son el segundo mayor contribuyente de discapacidad en el mundo y se deben principalmente al desgaste natural, traumatismos o enfermedades autoinmunes.^{1,2} Se calcula que entre el 20-33% de las personas vive con una condición ME dolorosa e incapacitante, generando un problema médico de alto costo para el sector salud, afectado desde la adolescencia hasta la edad avanzada³. La Organización Mundial de la Salud (OMS) predice que la prevalencia y el impacto de las afecciones ME aumentarán a medida que la población mundial envejece.

El tejido osteocondral (TOC) comprende el cartílago articular, el cartílago calcificado y el hueso subcondral, formando un sistema denominado unidad osteocondral, que tiene la capacidad única de transferir cargas durante el movimiento de la articulación⁴. Los defectos osteocondrales (DOCs) son un problema común en las articulaciones, sin embargo, debido a la limitada capacidad de autorregeneración del cartílago, los primeros esfuerzos se centraban en tratamientos únicamente para este tejido, incluyendo el desbridamiento artroscópico, la microfractura, autoinjerto y la implantación de condrocitos autólogos⁵. Estos enfoques no son ideales, ya que son paliativos o inducen la morbilidad del sitio donante⁶. Investigaciones posteriores indicaron que es necesario el apoyo del hueso subcondral sano para mejorar la reparación del cartílago⁵.

La ingeniería de tejido (IT) osteocondral ha emergido como una alternativa prometedora para la reparación de DOCs, buscando proponer modelos que mimeticen la estructura estratificada del tejido osteocondral mediante el uso de células, andamios y factores de señalización, para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular del tejido.^{7,8} El uso de la fibroína de seda (FS) como biomaterial en la IT demuestra ser un biomaterial biocompatible y apto para el crecimiento y diferenciación celular, además de poseer propiedades adecuadas para regenerar cartílago articular dañado.

En esta sección se describe la estructura, composición y función del tejido osteocondral, presentando a la ingeniería tisular osteocondral basada en fibroína de seda como un método para potenciar su reparación.



CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2. 1 TEJIDO OSTEOCONDRALE

El tejido osteocondral (TOC) se encuentra al final de los huesos largos y permite la transición gradual entre dos tejidos, el hueso y el cartílago. Estos dos tejidos son diversos en cuanto a sus composiciones químicas, propiedades mecánicas, estructura, propiedades eléctricas, cantidad de nutrientes y consumo de oxígeno.⁹ A pesar de sus diferencias, ambos tejidos actúan de manera coordinada; mientras que el cartílago transfiere y distribuye fuerzas en el hueso subcondral, a su vez, el hueso subcondral proporciona soporte mecánico para el cartílago articular; por lo tanto, la transición de la superficie del cartílago articular al hueso subcondral debe enfrentar varios gradientes suaves y resulta importante considerarlos para una exitosa reparación del TOC (**Figura 1**).

2.1.1 Estructura del tejido osteocondral

El TOC consiste en dos tejidos, el cartílago y el hueso subcondral, unidos por una capa de cartílago calcificada en una proporción de 90%, 5% y 5%, respectivamente (**Figura 1**).¹⁰

2.1.1.1 Hueso subcondral

Los huesos largos se dividen en diáfisis, siendo la parte central del hueso, y la epífisis, localizada en la proximidad de las articulaciones, diferenciándose estructuralmente en la compacidad del hueso.¹¹ En la diáfisis, se puede identificar una zona de hueso más compacto, llamada hueso cortical, en la parte externa, éste presenta una porosidad entre el 5 al 30% y una fracción de volumen óseo entre el 85 al 90%. Al desplazarse hacia el centro, se encuentra una estructura más porosa, llamada hueso cancelado o trabecular, su porosidad varía entre el 30 al 90% y su fracción de volumen óseo del 5 al 60% (**Figura 2**).^{10,12}

La fracción del volumen óseo disminuye al moverse hacia el canal de la médula ósea, en el cual el espacio entre la trabécula es más ancho y está lleno de médula ósea. El



hueso subcondral en la epífisis presenta características similares del hueso trabecular con una fracción de volumen óseo que varía entre el 6 al 36%, con un grosor trabecular de 100–190 mm, una concentración trabecular que varía de 0.61 a 2.06 trabéculas/mm, y el espacio entre ellos oscila entre 320 y 1670 mm.¹² El hueso subcondral actúa como el soporte mecánico de la articulación que se une al hueso diafisario. La longitud del hueso diafisario permite un aumento en el brazo de la palanca de los músculos para mejorar el poder de acción de la articulación.¹³

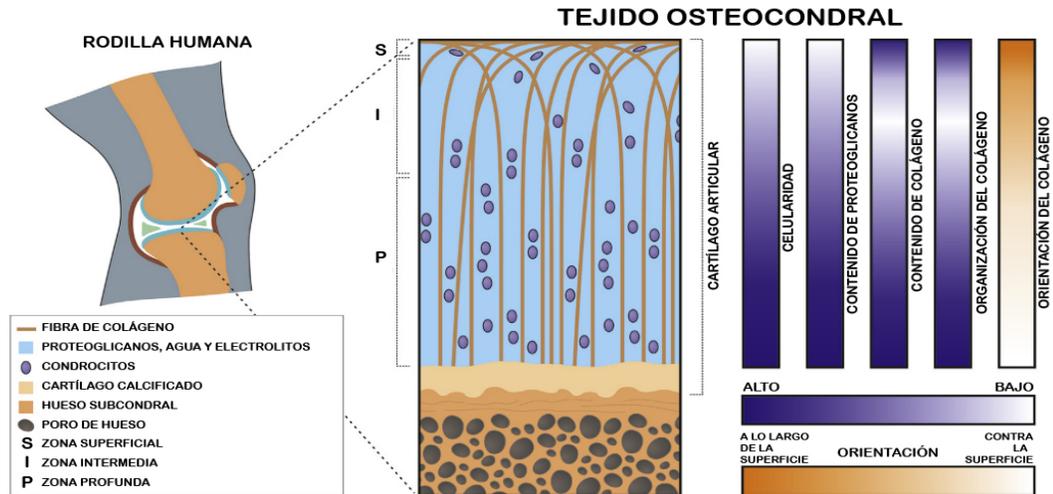


Figura 1. Representación de la estructura y composición del cartílago articular. El cartílago articular es un tejido conjuntivo avascular que cubre los extremos de las articulaciones sinoviales. El cartílago se compone de gradientes complejos en densidad celular, proteoglicanos y contenido de colágeno. La organización y orientación del colágeno varía con la profundidad del tejido. La falta de vasculatura y el alto contenido de proteoglicanos limita la eficacia de la administración sistémica de fármacos.³⁶

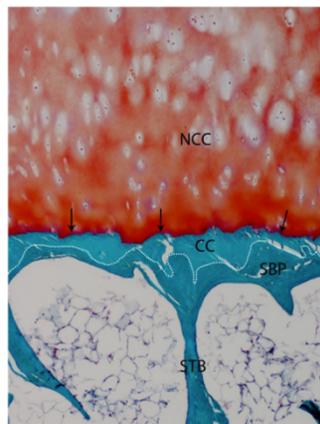


Figura 2. La estructura del cartílago articular y el hueso subcondral en una articulación humana normal. CC, cartílago calcificado; NCC, cartílago no calcificado; SBP, placa de hueso subcondral; STB, hueso subcondral trabecular. Las flechas señalan la “tidemark”; la línea punteada indica la línea cemento que divide al cartílago calcificado del hueso subcondral.¹²

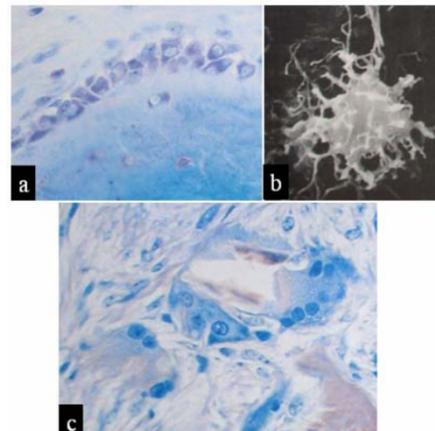


Figura 3. Células de la MEC ósea. a: osteoblastos vistos a través de microscopía óptica. b: Forma estrellada de los osteocitos vista a través de MEB. c: Osteoclastos vistos a través de microscopía óptica.¹¹



2.1.1.1.1 Componentes de la matriz extracelular ósea

La MEC ósea consiste en una fase orgánica y una inorgánica. La fase orgánica (25%), está formada principalmente por colágeno tipo I (95%) y tipo V (<5%), el colágeno I le confiere flexibilidad al tejido; mientras que la fase inorgánica (65%), consiste principalmente en fosfato de calcio, específicamente hidroxapatita (HA), responsable de la resistencia ósea¹⁴, adicionalmente, el agua representa un 10% de el tejido. Además del colágeno, otras proteínas estructurales importantes son la osteopontina, la trombospondina y la sialoproteína ósea, involucradas en la unión celular con la HA. Adicionalmente, la osteocalcina y la osteonectina participan en la unión de HA y calcio.¹⁰

El porcentaje restante de la fase orgánica está compuesta por proteoglicanos (10%), predominando el ácido hialurónico y condroitín sulfato, los cuales intervienen en etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Otros proteoglicanos son el biglicano y la decorina que están presentes en la fase siguiente de la formación ósea. Otro componente clave está representado por las proteínas con ácido γ -carboxiglutámico, como la osteocalcina y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico; este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. Entre las glicoproteínas se encuentran la osteonectina, fosfatasa alcalina, y las proteínas con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp). También existe la presencia de proteínas provenientes del plasma y factores de crecimiento.¹¹

Los materiales orgánicos en el hueso le confieren tenacidad, mientras que los inorgánicos rigidez. La disposición de los componentes en el hueso determina las propiedades mecánicas de la capa ósea en el tejido osteocondral. El colágeno confiere alta resistencia a la tracción (módulo de Young 1-2 GPa) y flexibilidad al hueso (resistencia a la tracción 50-100 MPa). Por otro lado, el hueso subcondral tiene un alto módulo elástico debido a su estructura densa y al efecto de los cristales inorgánicos y de HA.⁹

El tejido óseo es muy heterogéneo en relación con su composición celular; esta característica se debe a su vascularización y a la presencia de la médula ósea. Como parte de la médula ósea, una pequeña fracción (0.002%) se compone de MSCs, que son precursoras de los osteoblastos, osteoclastos, condrocitos y otros tipos celulares (**Figura 3**). Los osteoblastos son células grandes (20-30 μ m), de morfología poliédrica, que están



involucrados en procesos citoplasmáticos hacia la matriz, también se encargan de la síntesis y deposición de HA por medio de la fosfatasa alcalina. La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes, bordeantes o de revestimiento, o en osteocitos. Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración.^{10,11}

Por otra parte, los osteoclastos (100 μm) son responsables de la reabsorción ósea. Estos son células multinucleadas con abundantes vacuolas que expresan fosfatasa ácida resistente que permite la desfosforilación de las proteínas. Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz.^{10,11}

Las células más abundantes en el hueso son los osteocitos, que además de controlar la interacción entre los osteoblastos y los osteoclastos, participan activamente en el mantenimiento de la matriz ósea, los osteocitos también son mecanotransductores.¹⁰ Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de ella, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se encuentran en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso, su morfología es estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplastos. Los calcóforos o canaliculos son conductos a través de los cuales se da la comunicación para los procesos citoplasmáticos. Cuando se produce un trauma en el hueso el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto.¹¹

Atravesando los huesos se encuentran los vasos sanguíneos formados por células endoteliales, pasando desde la epífisis hacia la articulación, encontrándose con la zona calcificada del cartílago, la cual se abordará más adelante.

2.1.1.2 Región de unión osteocondral

La región de unión osteocondral es la región donde el cartílago calcificado converge con el hueso subcondral. Sin embargo, es útil considerar los tejidos entre las capas



superficiales del cartílago articular y la médula ósea subcondral como una unidad completa ya que participan en la disipación del estrés entre una región de tejidos rígidos y semirrígidos. De esta manera, en un sentido más amplio, la región de unión osteocondral abarca los tejidos entre las capas profundas de cartílago no calcificadas y los espacios medulares del hueso trabecular, incluyendo el cartílago no calcificado radial profundo, el “tidemark”, el cartílago calcificado y la placa ósea subcondral.^{15,13}

La pérdida de la integridad de la “tidemark” se ha relacionado con promover la comunicación que existe entre las señales anormales de una célula a otras a medida que progresa la OA. Cuando se presentan microfracturas en la unión osteocondral además de fisuras y daños en el cartílago articular, se facilita que el líquido sinovial penetre en el hueso subcondral y con ello las citocinas y otras moléculas que reaccionan con las células óseas, aumentando los efectos patológicos. Diversas vías moleculares participan en la degeneración del cartílago articular, incluyendo metaloproteinasas de matriz (MMP-1, MMP-13), componentes complementarios, factor inducible por hipoxia 2 α (HIF-2 α) e inhibición de la señalización de TGF- β .¹³

2.1.1.3 Cartílago articular

El cartílago hialino o articular es un tipo de tejido conectivo cuya función es proteger los huesos de las articulaciones diartrodiales de las fuerzas de fricción asociadas con el soporte de carga e impacto.^{16,17} El cartílago es predominantemente avascular, aneural y alinfático¹⁸, por lo que su principal fuente para nutrirse es líquido sinovial, sin embargo, algunos piensan que la nutrición del cartílago articular profundo proviene del hueso subcondral. Debido a que es avascular, la ausencia de terminaciones nerviosas sensoriales eliminan la experiencia de dolor cuando hay cargas en la articulación.¹³

El espesor del cartílago varía en humanos desde 1 a 4 mm dependiendo de su localización en el cuerpo.¹⁷ Su capacidad viscoelástica y la organización de las macromoléculas en el cartílago, particularmente la disposición y orientación de las fibras de colágeno, influyen en reducir el estrés y aumentar la resistencia a los daños causados por las cargas aplicadas.¹⁹ Su coeficiente de fricción que es 0.002-0.02 apoya el soporte de cargas, sin embargo, diversos factores pueden modificar este coeficiente, como la calidad del líquido sinovial, la deformación elástica del cartílago, efusión del líquido sinovial y fibrilación del tejido.²⁰



2.1.1.3.1 Componentes de la matriz extracelular del cartílago articular

La MEC del cartílago representa el 95% del volumen y es aquí donde los condrocitos se encuentran embebidos. Los condrocitos, son las células especializadas del cartílago, representando del 5 al 10% del tejido,^{20,21} estos se presentan de manera aislada o en grupos isógenos, dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren. Por ejemplo, los que se encuentran en una misma laguna indican que acaban de dividirse, por lo que su actividad metabólica es mayor, poseyendo un aparato de Golgi más grande y un citoplasma basófilo, revelando una síntesis proteica; por otra parte, a medida que secretan nueva matriz intercelular, los condrocitos se van separando y baja su actividad metabólica, mostrando un aparato de Golgi más pequeño y la tinción de su citoplasma es más clara ante los colorantes básicos con carga neta positiva como la hematoxilina.^{17,20}

Los principales componentes de la MEC cartilaginosa son el agua, gases, metabolitos, cationes, macromoléculas como colágeno II y proteoglicanos; estos componentes en conjunto son los responsables de las propiedades mecánicas del cartílago. El componente mayoritario del tejido es agua, presentándose entre un 60-80% en la MEC, teniendo como función reaccionar al estrés permitiendo su deformación. El agua juega un papel importante en la nutrición del tejido y su lubricación, sin embargo, cuando no hay un equilibrio y aumenta hasta un 90%, como en el caso de la OA, ocasiona mayor permeabilidad y esta a su vez causa un descenso de la resistencia comprometiendo sus propiedades elásticas.²⁰ El segundo componente mayoritario es el colágeno, abarcando entre un 10 y 20% de la MEC y predominando en un 90-95% el colágeno tipo II, el cual dota al cartílago de gran resistencia a la tensión. Otros colágenos presentes en menor proporción en la MEC es el colágeno tipo I, V, VI, IX, X y XI.²⁰

Los proteoglicanos son las principales proteínas no colágenas del cartílago y representan entre 10 y 15% de la MEC, siendo responsables de la compresión del cartílago. Los proteoglicanos están compuestos de subunidades denominadas glicosaminoglicanos (GAGs), estos se unen a un núcleo proteico, formando agreganos o proteoglicanos, los cuales son unidos mediante proteínas de enlace al ácido hialurónico para formar agregados de proteoglicanos. El ácido hialurónico es un GAG no sulfatado y carente de proteína central, por lo tanto no forma PGs. Los proteoglicanos le confieren la estructura porosa al cartílago por su capacidad de retener agua.²⁰



Otras moléculas presentes en la MEC son las glicoproteínas extracelulares, como la ancorina CII, fibronectina, laminina e integrina. Su función es unir a los condrocitos con la MEC, siendo la integrina la más importante debido a que interacciona con receptores celulares y participa en la regulación de la migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos.²⁰ Normalmente el cartílago presenta inhibidores de proteasas que ayudan en la renovación continua de los componentes de la MEC. La composición de la MEC varía en función de la capa de cartílago y de la proximidad respecto a los condrocitos (**Figura 1**); de esta manera, los PGs ricos en queratán-sulfato se acumulan en la MEC interna que se encuentra entre los condrocitos y en la MEC territorial se encuentra de manera más abundante los PGs ricos en condroitín-sulfato.²⁰

El cartílago es heterólogo, con una densidad y organización que varía según la profundidad de sus zonas.²² El cartílago se puede dividir en cuatro zonas (**Figura 1**), zona superficial o de deslizamiento la cual se encarga de resistir la compresión y es la que está en contacto directo con el líquido articular, su actividad metabólica es escasa, presenta pocos proteoglicanos pero altas concentraciones de colágeno tipo II; le sigue la zona intermedia o de transición, esta presenta una aumentada actividad metabólica al igual que un mayor contenido de proteoglicanos pero con una menor cantidad de colágeno y la morfología condrocítica se muestra más redondeada; La siguiente zona es la profunda o radial, es una zona rica en proteoglicanos y la morfología del condrocito es esférica. Por último, la zona calcificada, en donde no hay presencia de proteoglicanos, los condrocitos son hipertróficos, pequeños y escasos, al estar adyacente al hueso subcondral también presenta cristales de HA y colágeno X, es la zona de anclaje del cartílago al hueso, presentando a la tidemark como división de la zona anterior, donde penetran las fibras de colágeno para brindar soporte.^{10,17,20,23,24} Respecto a la resistencia mecánica, el módulo de compresión del cartílago aumenta de manera dependiente a la profundidad. Al pasar de la región superficial a la radial, el módulo de compresión aumenta de 0.27-1.16 MPa a 0.71-7.75 MPa. Como se mencionó anteriormente, el contenido de proteoglicanos que aumenta dependiente de la profundidad, da lugar al aumento del módulo de compresión.⁹

2.1.2 Osteogénesis y condrogénesis

Aunque la condrogénesis y la osteogénesis se consideran dos procesos separados durante la formación de hueso endocondral después del nacimiento (**Figura 4**), estudios



recientes han demostrado la transformación directa de las células de los condrocitos a las células óseas en el crecimiento óseo posnatal.

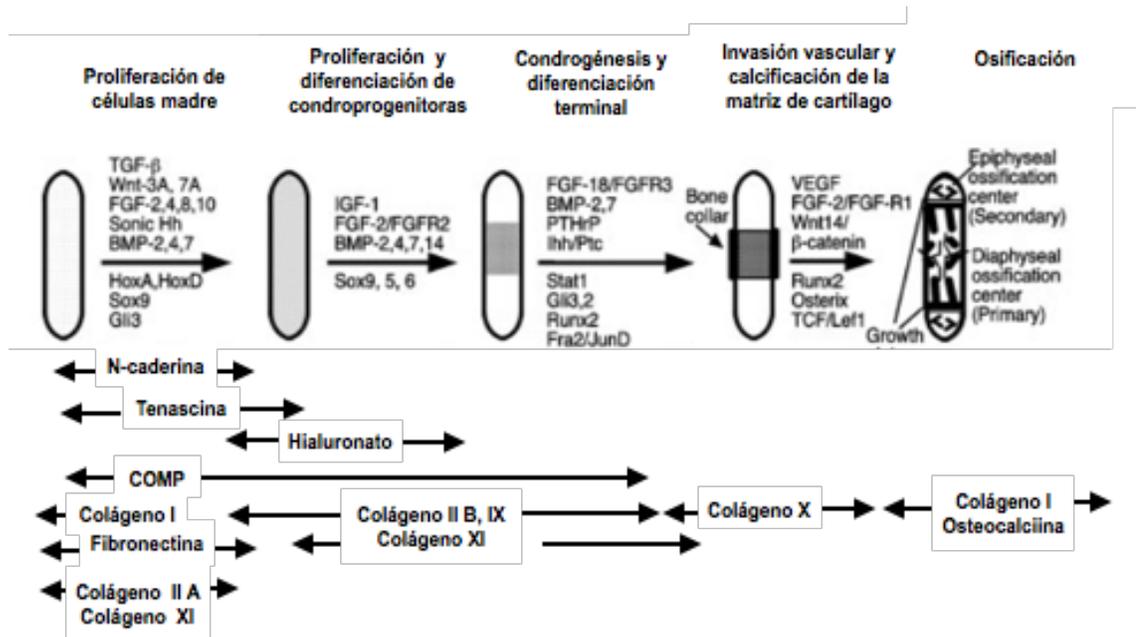


Figura 4. Secuencia de eventos en la condrogénesis durante el desarrollo de huesos largos. En la parte superior se observan las diferentes etapas que muestran los patrones temporales de los factores de crecimiento y diferenciación (por encima de las flechas) y los factores de transcripción implicados (debajo de las flechas). En la parte inferior se muestran las proteínas de matriz extracelular.²⁴⁴

Durante el desarrollo fetal, la formación de hueso endocondral comienza en un centro de osificación primario en el cartílago calcificado. La formación de centros de osificación secundarios a partir de la epífisis comienza después del nacimiento. El crecimiento óseo longitudinal posnatal depende de la placa de crecimiento y del cartílago articular. Un concepto anterior era que la condrogénesis proporcionaba una plantilla para dar paso a la osteogénesis, es decir, se observaba como un proceso biológico estrechamente vinculado pero separado de la osteogénesis durante la formación de hueso endocondral. Sin embargo, está bien documentado que los defectos en el cartílago cambiarán dramáticamente la forma y el tamaño del esqueleto.²⁵

Se sabe que las citocinas, hormonas y factores de crecimiento influyen en los procesos anabólicos y catabólicos por los condrocitos. Por lo tanto, un número de factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento transformante alpha (TGF- α), factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), y en menor medida los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de



crecimiento epidérmico (EGF), se han utilizado en los estudios de ingeniería de tejidos de cartílago *in vitro* para promover el fenotipo condrogénico, estimular la producción de MEC y para promover la condrogénesis de MSCs.²⁶ Además, una variedad de sustratos y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) se han utilizado para prevenir o retrasar la desdiferenciación de condrocitos en cultivos en monocapa.²¹

El papel de IGF-I en el metabolismo del cartílago articular ha sido ampliamente estudiado, se ha observado que cuando se añade de manera exógena a los cultivos en monocapa o en explantes de cartílago articular en diversas especies, IGF-I induce una serie de efectos anabólicos y disminuye los procesos catabólicos,^{27,28,29} funcionando como una molécula inductora endocrina, parácrina y autócrina.³⁰ En la **figura 4** se puede observar que la importancia de IGF-I es en etapas tempranas de la diferenciación condrogénica de MSCs, se tienen reportes de que posee un efecto aditivo cuando se utiliza en combinación con TGF- β 1.³¹

Hay cuatro tipos de células en el tejido óseo que contribuyen a la osteogénesis: células osteoprogenitoras no diferenciadas, osteoblastos que depositan la matriz, osteocitos maduros que ya no depositan la matriz y osteoclastos que reabsorben el tejido óseo. Cuando se presenta una lesión o en el mantenimiento natural del tejido, las células anteriores trabajan sinérgicamente para construir o descomponer la matriz. El tejido óseo es uno de los pocos tejidos que puede regenerarse con poca o ninguna formación de cicatriz. Sin embargo, hay un límite de tamaño crítico de regeneración (2,5 cm), por encima del cual no se producirá la regeneración. En estos casos, es necesario inducir y apoyar la osteogénesis para curar el defecto.¹⁴

Se sabe que la diferenciación osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales, los más conocidos son: Ihh (Indian hedgehog) y Shh (Sonic hedgehog), factor de transcripción Cbfa1 (también llamado Runx2) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). A medida que las células precursoras se van diferenciando, expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Runx2 es la evidencia temprana de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. El colágeno I y la osteopontina, se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. De igual manera, la fosfatasa alcalina es una proteína de superficie que podría participar en la



regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea y la osteocalcina, son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y se expresan al inicio de la mineralización.¹¹ La expresión de todas las proteínas anteriores o sus mensajeros, son especialmente útiles como marcadores del estadio de diferenciación en el que se encuentran las células.

2.1.3 Desarrollo de la osteoartritis en la unidad osteocondral

El daño o desregulación de la unidad osteocondral es a menudo de naturaleza traumática, que produce lesiones de cartílago y/o lesiones del hueso subcondral, las cuales, si no logran sanar, conllevan, con mayor frecuencia, al desarrollo de la osteoartritis.³² La OA es una enfermedad crónica, debilitante y dolorosa, es la enfermedad articular más común en el mundo y se caracteriza por ser una enfermedad múltiple con inflamación, donde el sistema inmune y el sistema nervioso central desempeñan un papel relevante en la lesión articular completa, la progresión de la lesión, el dolor y la discapacidad. La OA afecta a toda la articulación sinovial, incluido el cartílago articular, el sinovio y hueso subcondral.^{13,33,12}

En niños, adultos y jóvenes con actividad física, los DOCs pueden formarse como resultado de la osteocondritis disecante, una condición dolorosa caracterizada por la esclerosis ósea que puede conducir a la fragmentación del cartílago.

Es más probable que se desarrolle una osteocondritis disecante por un desarrollo inadecuado, traumas repetitivos, inflamación y/o una disminución en el suministro de sangre, en vez de una fractura osteocondral aguda. Cualquiera sea la causa, el daño focal que se genera en la unidad osteocondral inicia una cascada de intentos de reparación y remodelación que a menudo tienen efectos perjudiciales sobre la salud a largo plazo y la función de la articulación, lo que puede desembocar en una OA.³²

Generalmente se ha relacionado como causa de la osteoartritis (OA) al desgaste del cartílago articular, pero investigaciones recientes demuestran que la alteración ósea subcondral y la inflamación sinovial pueden iniciarse y conducir a una progresión de la OA.¹³ Si bien el cartílago es avascular en la articulación normal, en la OA, los osteoclastos se activan y forman canales a través de la placa ósea subcondral, lo que



permite que los vasos sanguíneos y los nervios se extiendan desde la médula hacia el cartílago profundo. Esto se asocia con una cascada de anomalías, incluida la inflamación local y la regulación positiva de la actividad de metaloproteinasas, la degradación de la matriz extracelular, la reducción de la capacidad de carga del cartílago y el cambio degenerativo.¹⁵

Los signos más tempranos de la OA en el hueso subcondral son las lesiones de la médula ósea, las cuales son señales de un exceso de agua en el hueso, se piensa que estas surgen por remodelación del hueso subcondral debido a una sobrecarga mecánica persistente.¹³ Por ejemplo, el inicio de la degeneración del cartílago articular comienza con la fibrilación en la superficie articular y la ruptura del marco macromolecular de la matriz. Debajo de la superficie del cartílago, las fibrillas de colágeno comienzan a desorientarse y el contenido de proteoglicanos disminuye, tanto en la zona superficial como en la zona media del cartílago. A medida que progresa el daño, la fibrilación se extiende hacia las capas más profundas, alcanzando el hueso subcondral, provocando un rasgamiento paulatino del cartílago fibrilado en la punta superficial. Por otra parte, el agregano sufre una rápida y extensa degradación al truncarse su proteína central, dividiéndose en fragmentos, algunos de los cuales permanecen unidos al ácido hialurónico reteniéndose en el tejido, mientras que otros se difunden en el líquido sinovial. Esta difusión conlleva a una reducción de la carga aniónica neta presente en el agregano y, por lo tanto, a la pérdida de su capacidad para resistir el estrés de compresión, predisponiendo el tejido a la erosión.^{15,33} Aunado a la reducción del contenido de agregano, la composición del colágeno cambia del tipo II al tipo I, afectando en gran medida a la estabilidad mecánica del tejido, ya que el colágeno tipo II contiene un mayor contenido de hidroxilisina, así como residuos de glucosilo y galactósilo, lo que facilita su interacción con los proteoglicanos. Consecuentemente, los condrocitos responden a la inflamación realizando actividades catabólicas, lo que finalmente causa la degradación de la MEC. La ruptura de la matriz por la pérdida de sus proteínas conduce a un aumento de la porosidad y permeabilidad de la superficie, provocando un aumento del flujo de líquido intersticial fuera del tejido (**Figura 5**). Esto a su vez conduce a la degradación del tejido y la pérdida completa de sus propiedades funcionales.^{33,12}

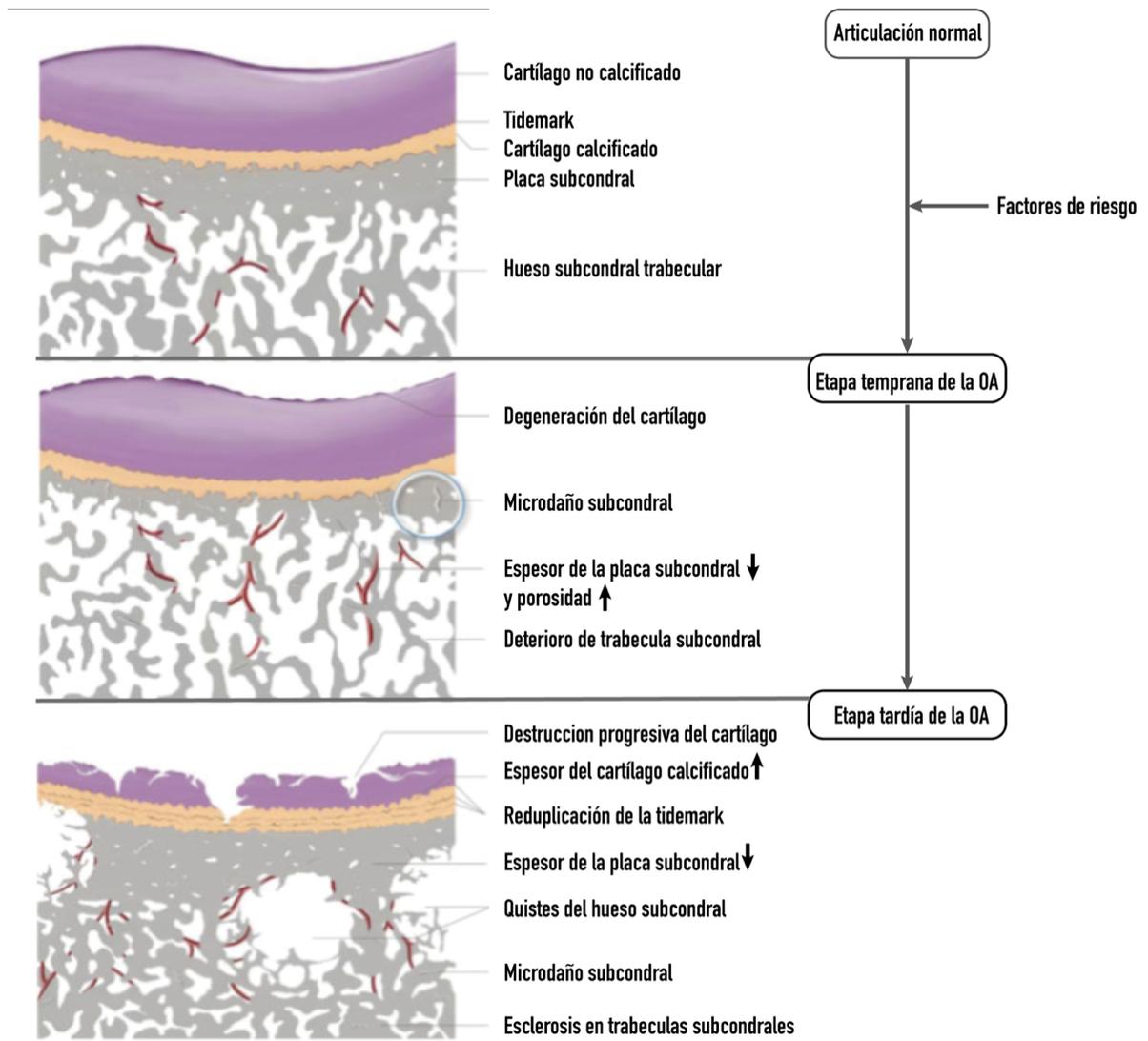


Figura 5. Modelo hipotético de la patogenia de la osteoartritis (OA). El hueso subcondral normal que sufre una tensión no fisiológica (inducida por factores de riesgo) inicia una reacción patológica en cascada, lo que lleva a cambios osteoarthríticos en diferentes tejidos. En la etapa inicial de la OA, la placa subcondral se vuelve más delgada y más porosa, junto con la degeneración inicial del cartílago. El hueso trabecular subcondral también se deteriora, con una mayor separación y trabéculas más delgadas. Al mismo tiempo, el microdaño comienza a aparecer tanto en el cartílago calcificado como en el hueso subcondral, que persistirá durante todo el proceso patológico. En la fase avanzada de la OA, el cartílago calcificado y la placa subcondral se vuelven más gruesa, se reduplica la "tidemark" y se genera un daño progresivo del cartílago no calcificado. El hueso trabecular subcondral se vuelve esclerótico. La esclerosis de los tejidos mineralizados periarticulares puede ser una adaptación compensatoria biomecánica a los quistes y microdaños generalizados en el hueso subcondral, lo que hace que la estructura ósea subcondral sea más frágil.¹²



2.1.4 Eficacia de las estrategias quirúrgicas actuales para el tratamiento de defectos osteocondrales

Los tratamientos quirúrgicos actuales para las lesiones de cartílago sintomáticos incluyen tratamientos reparativos y reconstructivos. Los primeros emplean técnicas que estimulan las células tisulares para formar cartílago hialino, como la técnica de microfractura, perforación, artroplastia de abrasión y procedimientos biológicos que involucran cultivos celulares, como el implante autólogo de condrocitos (IAC), a partir del desarrollo de implantes tridimensionales biocompatibles, donde se pueden cultivar condrocitos, células troncales o células similares a condrocitos. El último involucra la mosaicoplastia, como el trasplante de autoinjertos o aloinjertos, que se componen de cartílago hialino maduro que se encuentra en el hueso subcondral.³⁴ El tratamiento de las lesiones del cartílago depende de la clasificación de la lesión a tratar, edad del paciente y actividad del mismo, buscando en todas ellas reducir el dolor y recuperar la funcionalidad. Se debe realizar una evaluación a largo plazo para definir si el tratamiento es exitoso, valorando el rendimiento, similitud con el tejido normal con base a su composición y propiedades mecánicas.^{16,17,35}

Debido a las amplias implicaciones de la OA, existe un interés persistente en desarrollar nuevos enfoques para prevenir, retrasar, detener o revertir potencialmente su progresión. El tratamiento de la OA es un reto ya que debido a su naturaleza avascular y alto contenido de proteoglicanos, el cartílago impide la administración local y sistémica de compuestos terapéuticos. Un enfoque terapéutico menos invasivo es el ultrasonido de alta intensidad como una técnica sin contacto para modificar el cartílago articular y el hueso subcondral, facilitando la administración y liberación de fármacos específicos en el interior del cartílago, reparando el daño de los tejidos blandos y alterando físicamente las estructuras de los tejidos, incluidos el cartílago y el hueso. A pesar de que el tamaño promedio de los poros dentro del cartílago que está disponible para el flujo de fluidos es de 6 nm, se ha demostrado el suministro de moléculas de hasta 7-10 nm, facilitando la entrada de moléculas con cargas positivas a comparación de las moléculas neutras.³⁶ Además, se conoce que la solución quirúrgica en etapa terminal para la OA de rodilla es la artroplastia total de rodilla. Este tratamiento implica el reemplazo de la articulación de la rodilla con prótesis hechas de aleaciones metálicas y polímeros. Sin embargo, es frecuente que sea necesario el reemplazo de las prótesis por tratamiento fallido.³³ Por



esta y más razones es importante desarrollar una intervención terapéutica menos invasiva y más rentable para la enfermedad.

El IAC ha sido el tratamiento más utilizado para tratar las lesiones de cartílago de rodilla grande. Estudios anteriores han comparado IAC con mosaicoplastia, microfractura y microfractura guiada por matriz; donde el IAC obtiene mejores resultados (88%) que la mosaicoplastia (69%), presentando cartílago hialino en la mitad de las biopsias, sin embargo, los resultados estadísticamente significativos se limitan a la zona condilar medial.³⁷ El IAC se ha comparado con la microfractura y la mosaicoplastia, pero no con el simple desbridamiento artroscópico y la rehabilitación por sí sola. En la actualidad, se está llevando a cabo el primer estudio que detallará, con un alto nivel de evidencia, los resultados de la comparación de IAC con el simple desbridamiento y la fisioterapia en lesiones sintomáticas de todo el grosor de la rodilla. El objetivo de ese estudio es aumentar el conocimiento clínico y económico entre estas técnicas a corto y largo plazo.³⁸

Recientemente, los tratamientos quirúrgicos se han complementado con el uso de materiales biológicos autólogos como PRP (plasma rico en plaquetas) y células troncales mesenquimales. El uso de PRP autólogo junto con la técnica de microfractura se ha asociado con mejores resultados clínicos y funcionales a corto plazo, especialmente en el dolor^{39,40,41}; Además, la implantación artroscópica de hADSCs combinada con la técnica de microfractura también se ha asociado con una disminución del dolor.⁴² De manera similar, el uso de hADSCs^{43,44} o BMSCs^{45,46} se ha descrito como una alternativa terapéutica segura mediante inyección intra-articular en pacientes con OA, que reportan una mejora significativa en los niveles de dolor. Otra terapia complementaria es el uso de ácido hialurónico, que mejora la reparación del cartílago articular en combinación con células troncales autólogas de sangre periférica mediante inyección intra-articular postoperatoria, esto complementa la técnica de perforación subcondral artroscópica.⁴⁷

Las técnicas de terapia génica representan una estrategia alternativa para la transferencia de genes con fines terapéuticos. A través de la terapia génica, las proteínas se sintetizan en el sitio del defecto o lesión, donde directamente inciden en el microambiente natural. Los factores de crecimiento más frecuentemente sintetizados por células de cartílago diseñados para regenerar el cartílago dañado incluyen BMP, IGF-1



y TGF- β s 1, 2 y 3. La aplicación de cartílago genéticamente modificado en ensayos clínicos comienza a generar resultados. Mont y col. han informado sobre una serie de ensayos clínicos en los que se ha evaluado el efecto de inyectar condrocitos genéticamente modificados transducidos viralmente con TGF- β 1 en las rodillas de 54 pacientes con OA. Después de 12 o 24 semanas de tratamiento, los pacientes informaron un proceso degenerativo retrasado en comparación con el placebo. Cabe señalar que faltan los estudios que demuestran la regeneración del cartílago.⁴⁸ Además, también evalúan la eficacia para regenerar de forma segura el cartílago mediante un ensayo clínico en fase II en 102 pacientes (ClinicalTrials.gov NCT01221441)⁴⁹ (ClinicalTrials.gov NCT02341378)⁵⁰, respectivamente. Los pacientes expresaron disminución del dolor y mejoría en la función y capacidad física; por lo tanto, la inyección de tratamiento de TGF- β 1 parece mejorar los síntomas y el dolor debido a la OA de rodilla.

Aunque la terapia génica es muy prometedora para la reparación del cartílago, aún queda mucho por entender acerca de los resultados clínicos obtenidos. Es crucial controlar varios aspectos, como la duración de la expresión transgénica, así como la identificación y selección de un factor terapéutico que sea clínicamente útil para la regeneración del cartílago.

La ingeniería de tejido osteocondral es un campo en evolución que tiene potencial para proporcionar soluciones al daño OC, mediante el uso de células, andamios y factores de señalización.²¹ Con el auge de la ingeniería de tejidos en los últimos años y la innovación en el área de biomateriales, los médicos tienen nuevas opciones para tratar las lesiones osteocondrales. Hasta la fecha, el uso clínico de estos materiales es limitado pues muy pocos polímeros se han utilizado para ensayos clínicos en ingeniería de tejido OC. La lista incluye al colágeno, polímeros a base de hialuronato, fibrina, HA, etc., destinados a usarse en el TOC adoptando estructuras biomiméticas.

El colágeno es un biomaterial que destaca en la lista, ya que es el componente principal de MEC. Zheng y col. han analizado la eficacia de un implante construido con condrocitos cultivados en colágeno tipo I / III en 56 pacientes con OA. Los resultados evidenciaron principalmente el mantenimiento de un fenotipo condrocítico, así como una buena integración del implante en el área lesionada y la producción de colágeno tipo II,



y agregano. Estos datos demostraron la regeneración del tejido del cartílago hialino seis meses después del tratamiento.⁵¹ Además, según la información contenida en el sitio web clinicaltrials.gov, los ensayos clínicos que utilizan células madre cultivadas principalmente sobre andamios de colágeno se encuentran en curso.

Assor y col. realizaron un ensayo clínico para demostrar la eficacia y seguridad de las células troncales derivadas de médula ósea (BMSC) cultivadas en un andamio de colágeno de tipo I tratado con HA para regenerar los defectos del cartílago articular de la rodilla (**Tabla 1**, NCT01159899). Por otra parte, Giannini y col. estudiaron los puntos críticos del tratamiento regenerativo con BMSCs sembradas en un andamiaje de colágeno I de equino (**Tabla 1** NCT02005861). Ambos ensayos todavía están en proceso y no han mostrado resultados finales.

El uso de hialuronato también se reporta en los ensayos clínicos; Gobbi y col. dirige un estudio para evaluar la eficacia de Hyalofast®, junto con el aspirado de médula ósea que contiene las MSCs sin la necesidad de procesos para el aislamiento celular y la expansión *ex vivo*. Esta metodología tiene la desventaja de que el número de BMSCs destinadas a la reparación del tejido condral no está controlada ni la celularidad del aspirado (**Tabla 1**, NCT02659215).

Nuevos estudios evalúan el rendimiento, la estabilidad, la seguridad y la viabilidad del procedimiento quirúrgico con implantes osteocondrales biomiméticos. Uno de los procedimientos más estudiados y relevantes que actualmente se comercializa es MaioRegen® (**Tabla 1**, NCT01282034).^{52,53,54,55,56} Este es un implante trifásico que considera la biomecánica de la fase condral, la tidemark y el hueso subcondral. Su composición se basa en un gradiente de colágeno I-HA. MaioRegen® ha demostrado a lo largo de sus estudios clínicos que su técnica es segura y que los resultados clínicos en el seguimiento a corto y mediano plazo son efectivos en una gran población de pacientes, incluso mejores resultados que otros andamios comerciales propuestos, como ChondroMimetic™⁵⁷ y TruFit CB™^{58,59,60,61}. A pesar de los resultados alentadores *in vitro* de una amplia variedad de andamios osteocondrales, la mayoría se encuentran en las primeras etapas de desarrollo.



En general, los ensayos clínicos muestran seguridad en el uso de las técnicas actuales para tratar las lesiones osteocondrales. Sin embargo, para determinar la mejor opción quirúrgica en el tratamiento de los defectos sintomáticos, se debe desarrollar un ensayo clínico riguroso, donde exista un control prospectivo, un control de aleatorización, incluso control de alimentación y control de rehabilitación, para que, con base a los resultados comparativos, el cirujano proporcione un tratamiento eficaz. Estas limitantes brindan la oportunidad de desarrollar alternativas de control terapéutico como lo es la ingeniería tisular para la reparación del tejido osteocondral.

**Tabla 1. Ensayos clínicos actuales basados en enfoques de la ingeniería de tejidos del cartílago para el tratamiento de enfermedades condrales y osteocondrales.⁶²**

Título	Fase	Estado	Núm. pacientes	Descripción	Identificador clinicaltrials.gov
Trasplante autólogo de MSCs y andamio en CA de espesor completo	Fase 1	Completado	6	Trasplante autólogo de MSCs cultivadas en un andamio de colágeno I en lesiones de cartílago articular de espesor completo	NCT00850187
Trasplante de BMSCs estimuladas por andamio de proteínas para curar defectos del CA de la rodilla	Fase 1 temprana	Desconocido	50 (estimado)	BMSCs autólogas, estimuladas con una matriz proteica cultivada en una colza de HA.	NCT01159899
Ensayo HyaloFAST para la reparación del CA en la rodilla (FastTRACK)	No aplica	Reclutamiento	200 (estimado)	Concentrado de aspirado de médula ósea mezclado con un andamio a base de hialuronato (Hyalofast®)	NCT02659215
"Un paso" trasplante de células mononucleares de médula ósea en lesiones OC talar	No aplica	Reclutamiento	140 (estimado)	Concentrado de aspirado de médula ósea cultivado en un andamio de colágeno I de equino (IOR-G1, Novagenit, Mezzolombardo, TN, Italia)	NCT02005861
Estudio para el tratamiento de las lesiones condrales y OC de rodilla	Fase 4	Completado	145	Andamio multicapa de cerámica : colágeno I de equino e HA enriquecida con magnesio (MaioRegenv®)	NCT01282034
Evaluación del implante bifásico Agili-C en la articulación de la rodilla	No aplica	Reclutamiento	65	Un sistema libre de células basado en un andamio bifásico, poroso reabsorbible. La fase de cartílago consiste en una aragonita modificada e HA, mientras que la fase ósea en aragonita (implante Agili-C).	NCT01471236

CA: cartílago articular, OC: osteocondral, BMSCs: células troncales derivadas de médula ósea, MSCs: células troncales mesenquimales, HA: hidroxipatita



2.2 INGENIERÍA TISULAR EN LA REPARACIÓN DEL TEJIDO OSTEOCONDRALE

La IT es una rama de la bioingeniería que en términos generales combina el uso de biomateriales, células y moléculas bioactivas para uso biomédico. Los biomateriales representan un componente fundamental de la ingeniería tisular, que son usados para sustituir tejido dañado o reemplazar tejido perdido con tejido funcionalmente reconstruido.⁶³ Aunque en los primeros intentos de la reconstrucción del cartílago se centró en la regeneración de la capa superior,^{64,65} sin tener en cuenta el tejido subcondral, estudios recientes profundizan en las estructuras y propiedades biomecánicas de los tejidos osteocondrales para desarrollar andamios biomiméticos capaces de imitar los patrones de las estructuras naturales del tejido y mejorar la integración y la regeneración.^{66,67,68}

En la IT OC, el constante desarrollo de nuevas variantes combinando biomateriales, ensayando con diversas fuentes celulares y modificando la metodología del cultivo celular dentro de los sistemas de andamiaje, se ve impulsado por la necesidad de identificar el estándar de oro en la reparación funcional y a largo plazo de los DOCs.

2.2.1 Fuente celular en la IT osteocondral

El objetivo para seleccionar una fuente celular ideal es que pueda aislarse mediante métodos simples, que puedan expandirse y puedan cultivarse para sintetizar moléculas de cartílago específicas. Entre las fuentes celulares exploradas para la reparación condral se encuentran los condrocitos⁶⁹, los fibroblastos⁷⁰, las MSCs⁷¹ y las células modificadas genéticamente⁷².

A pesar de que los condrocitos parecieran ser la mejor opción para la regeneración del cartílago, por ser las células nativas del tejido; una de las limitantes para su uso en la IT es su baja celularidad en el cartílago, siendo del 5 al 10% del tejido^{20,21}, por lo tanto, deben expandirse antes de su uso para obtener el número necesario de células para su aplicación. El inconveniente que presentan estas células es que su expansión en monocapa provoca su desdiferenciación, disminuyendo la síntesis de proteoglicanos, la expresión del colágeno tipo II y el aumento de la expresión del colágeno tipo I, incluso en cultivos 3D de diversos materiales.^{73,74,75,76,69} Además, si consideramos la aplicación



clínica autóloga, la obtención de estas células pone de manifiesto la limitante del tejido y la morbilidad del sitio donante ya que sería necesario realizar una lesión para obtener la biopsia en regiones cercanas al tejido que se desea reparar.⁷⁷

La fuente celular más ampliamente estudiada son las MSCs. Entre sus ventajas están su fácil recolección de varios tejidos, como el tejido adiposo, la membrana sinovial y la médula ósea, todas conservan su potencial multilineaje, incluso después de varios pasajes en monocapa, lo que permite obtener rápidamente el número de células necesarias para su aplicación.

Las MSCs diferenciadas hacia la condrogénesis tienen la capacidad de producir diversas macromoléculas de la MEC cartilaginosa que incluyen fibronectina, colágenos, PG y glicosaminoglicanos (GAG), así como una amplia gama de citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas y factores estimulantes.⁶²

Para la fase que simula al hueso, los trabajos más recientes en modelos de andamios bifásicos osteocondrales, incluyen el uso de BMSCs^{5,78, 79, 80, 81}, ADSCs⁶⁷ y osteoblastos⁸². De igual manera, las MSCs diferenciadas hacia la osteogénesis son capaces de producir componentes de la MEC ósea como colágeno I, fosfatasa alcalina y calcio. Además, todas estas células pueden modificarse genéticamente para inducir o mejorar la condrogénesis.^{5,78, 79, 80, 81,82} Por este motivo las hADSC son las células a utilizar en el presente trabajo.

Teniendo en cuenta la presencia de células osteoprogenitoras en el hueso subcondral, además de una eficacia generalmente alta de la regeneración ósea en las regiones subcondrales, diversos diseños optan por celularizar únicamente la región cartilaginosa con un solo tipo de células. Desde un punto de vista quirúrgico y comercial, un andamio ideal para la reparación de DOCs sería sin el componente celular, por ello, los enfoques en el diseño se basan en proporcionar las señales correctas para conducir la regeneración del tejido biofuncionalizando el biomaterial.⁷⁷



2.2.2 Sistemas de andamiaje y biomateriales para la ingeniería tisular osteocondral

Las estrategias para construir andamios osteocondrales han mejorado a lo largo de los años, Li y col.⁸³ clasifican estas estrategias en las siguientes categorías: andamios monofásicos, andamios para la fase ósea pero con células de la fase condral, ensamble de andamios con fases individuales (ósea y condral) regularmente pre-cultivados por separado, andamios homogéneos en su composición pero con diferentes poblaciones celulares para cada fase, andamios homogéneos con gradiente continuo de moléculas bioactivas para una o ambas fases y andamios individuales con fase condral y ósea integradas durante su fabricación.

Los modelos bifásicos se diferencian del monofásico por mimetizar en mayor medida al tejido osteocondral, debido a que contienen una fase que brinda soporte al tejido óseo adyacente, algunas ventajas incluyen: estructura porosa que promueve las interacciones célula-biomaterial, adhesión celular, crecimiento y migración; poros interconectados para facilitar el transporte de masa, nutrientes y factores reguladores para permitir la supervivencia, proliferación y diferenciación celular; propiedades mecánicas adecuadas como resistencia a la tracción y elasticidad; degradación controlada; síntesis de moléculas características de la MEC, grado mínimo de inflamación o toxicidad *in vivo*. Además, los andamios minimizan la pérdida de células al momento de la transferencia al sitio de la lesión comparado con la simple inyección de células en los defectos.⁸⁴ Por estos motivos, el modelo propuesto para el presente trabajo se basa en un andamio bifásico con las consideraciones estructurales anteriores.

Originalmente, los andamios fueron diseñados para proporcionar a las células un medio ambiente que promoviera su supervivencia, sin embargo, ahora se entiende que la imitación del microentorno nativo y las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del tejido nativo son esenciales para el mantenimiento y la regulación del comportamiento celular y la función del tejido.⁸⁵ Por lo tanto, en aplicaciones de regeneración de tejidos, un andamio derivado de biomateriales debe ser biocompatible y no provocar una respuesta inflamatoria o tóxica sostenida *in vivo*; tener propiedades fisicoquímicas y mecánicas similares al tejido nativo; permitir la fabricación de construcciones 3D que puedan incorporar células; ser capaces de incorporar factores de crecimiento y grupos



funcionales para la adhesión celular; ser biodegradables, y que los productos de degradación sean metabolizados y eliminados del cuerpo sin ser tóxicos.⁸⁶

La definición de biomaterial según la Conferencia de Desarrollo de Consensos de los Institutos Nacionales de Salud establecida en 1982 es: cualquier sustancia (que no sea un medicamento), o combinaciones de sustancias, de origen sintético o natural, que se pueda usar por cualquier período de tiempo, en su totalidad o como parte de un sistema, para tratar, mejorar o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Hasta la fecha, se han utilizado una amplia variedad de biomateriales, incluidos biomateriales naturales y sintéticos para los modelos propuestos en la ITOC, para suministrar células y otras señales con el fin de regenerar el tejido del osteocondral de manera eficiente.

Los andamios derivados de polímeros sintéticos son más fáciles de fabricar, permiten alteraciones químicas, tienen una mayor uniformidad entre lotes y poseen propiedades mecánicas y estabilidad térmica compatible con los ambientes biológicos. Sin embargo, estos andamios a menudo generan toxicidad celular, inmunogenicidad y pueden tener una biocompatibilidad deficiente en general.^{85,30}

Los materiales naturales utilizados para producir un andamio bioactivo para regenerar cartílago incluyen agarosa^{87,88}, alginato^{89,64}, ácido hialurónico^{90,91}, gelatina^{87,92,93}, pegamento de fibrina⁹⁴, derivados de colágeno^{95,96} y matriz de cartílago acelular^{97,98}. Sin embargo, los problemas potenciales se encuentran en sus mecánica inferior.⁹⁹ Los polímeros naturales ofrecen mejoras en la biocompatibilidad y las características diversas que imitan la MEC nativa. Generalmente poseen receptores de unión celular, y son susceptibles a la degradación y remodelación proteolítica.⁸⁵

Entre los biomateriales utilizados para la regeneración del hueso se encuentran el quitosan^{100,101}, poli(3-hidroxibutirato)/nano-hydroxyapatita, poly(ϵ -caprolactona) (PCL)⁶⁸, ácido poli-L-láctico (PLLA)⁷⁴, ácido poli (láctico-co-glicólico)¹⁰², fibroína de seda¹⁰², entre otros.¹⁰³ En este sentido, se ha optado por diseños de biomateriales híbridos, con la finalidad de aprovechar las ventajas intrínsecas del biomaterial como una mayor resistencia mecánica y sus componentes bioactivos, minimizando desventajas como la rápida degradación^{81,96,104}. Los biomateriales derivados de FS se han convertido en una opción atractiva para desarrollar andamios osteocondrales debido a sus propiedades



biológicas, mecánicas y de procesamiento, los cuales se abordarán en la siguiente sección por la importancia que tiene en el diseño propuesto del presente trabajo.

2.2.3 Fibroína de seda como un biomaterial prometedor para la ingeniería tisular osteocondral

Las sedas son polipéptidos producidos por miembros de la clase Arachnida y varios gusanos de seda de la orden Lepidoptera,¹⁰⁵ las cuales han sido utilizadas en la industria textil,¹⁰⁶ en el área médica como suturas;¹⁰⁷ en cosméticos,¹⁰⁸ en inmovilización enzimática,¹⁰⁹ para cubrir lesiones¹¹⁰, como sustrato para el crecimiento celular,^{111,112} en sistemas de administración de fármacos,^{113,114,115} para andamios en la IT,¹¹⁶ y en aplicaciones biomédicas utilizando gusanos de seda transgénicos.^{117,118} Además, han sido consideradas para su aplicación como adhesivo y sellante biodegradable.¹¹⁹

El uso de la fibroína de seda (FS) como biomaterial en la IT ha sido investigado, el cual demuestra ser un biomaterial biocompatible y apto para el crecimiento celular y diferenciación celular además de poseer propiedades adecuadas para regenerar cartílago articular dañado.

2.2.3.1 Estructura y composición de la FS

La FS de los capullos del gusano de seda *Bombix mori* es la mayormente empleada y estudiada en la IT; en Corea del Sur existen más de 300 variedades de este gusano.¹²⁰ Los capullos de los gusanos de seda se componen principalmente por dos biomacromoléculas: fibroína (proteína fibrosa) y sericina (proteína globular). La seda de *B. mori* es sintetizada por un grupo de glándulas salivales especializadas; la fibroína que comprende entre el 60 al 80% de la seda se sintetiza exclusivamente en la región posterior de la glándula, las fibras de fibroína son recubiertas por sericina que comprende del 15 al 35%, la cual es sintetizada en las paredes de la región media de la glándula. Entre un 1 y 5% son componentes no-sericínicos como pigmentos, seda, azúcares y otras impurezas (**Figura 6**).^{105,121,122}

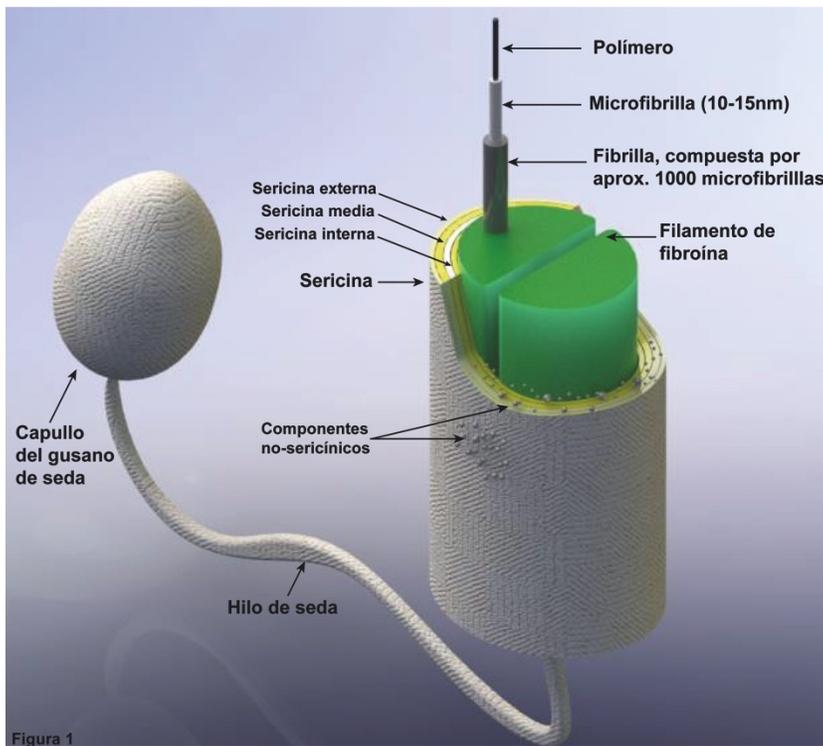


Figura 6. Esquema de la estructura de un hilo de seda en el capullo del gusano de seda.²⁰³

La mayoría de los lepidópteros producen fibroína que consta de tres componentes proteicos ensamblados en una unidad de seda elemental: cadena pesada (~ 391 kDa) y fibroína de cadena ligera (~ 25 kDa), que están unidas por un puente disulfuro, y por último la proteína P25 (~ 25 kDa), también conocida como fibrohexamerina (Fhx), estos componentes están presentes en una proporción de 6: 6: 1 respectivamente.^{123,124,125}

En el gusano *Bombix mori*, la estructura de la fibroína de cadena pesada (H-fibroína) es hidrofóbica, rica en glicina y exhibe una disposición jerárquica de repeticiones GAGAGS,^{125,126,127,128,129} las cuales se ensamblan de manera anti-paralela siendo responsables de la formación de estructuras de láminas- β ; estas estructuras son altamente cristalinas y entrecruzan la proteína a través de fuertes puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals entre las láminas- β , confiriéndole propiedades mecánicas robustas¹³⁰; la fibroína de cadena ligera (L-fibroína) es predominantemente hidrofóbica y elástica, mientras que P25 consiste en una sucesión alternada de áreas hidrofobas e hidrofílicas.^{124,126,131}

La FS es una proteína polimórfica, tres tipos de arreglos estructurales se han descrito a la fecha: seda I,^{132,133,134} seda II (lamina- β)^{127,135} y seda III^{136,137}. Estas estructuras



dependen de las condiciones del entorno, como la temperatura, pH, solventes¹³⁸ y concentración de las soluciones.

La secuencia de los aminoácidos influye en las propiedades estructurales de la fibroína.^{128,139,121} En seda II, la alanina y la serina afectan la rigidez de las estructuras de las láminas- β , mientras que la alanina provee estabilidad a las láminas- β , la serina es responsable de la hidrofobicidad.¹⁴⁰ Un estudio reciente de las diferencias en las características estructurales y propiedades del capullo de seda producida por variedades de *B. mori* concluyó que el peso molecular de la FS regenerada, la viscosidad en solución y las propiedades mecánicas, dependen de la variedades de gusano de seda;¹⁴¹ sin embargo, meses más tarde, Jang y col. reportaron que la seda producida por diferentes variedades del gusano de seda *B. mori* no difieren en las propiedades mecánicas, atribuyendo el resultado a la técnica de procesamiento empleada, en este caso por la hiladura en húmedo.¹⁴²

Ciertamente, las características estructurales y propiedades de los polímeros de seda dependen del tipo de gusano de seda. Sin embargo, la variedad del gusano de seda, pocas veces es considerada en las aplicaciones biomédicas. A pesar de la diversidad en la composición de las sedas, estos biomateriales tienden a conservar su funcionalidad.

2.2.3.2 FS como biomaterial para aplicaciones biomédicas

El uso de biomateriales con fines de andamiaje es un componente fundamental de los esfuerzos de la IT para reemplazar el tejido lesionado con tejido funcional reconstruido. Un biomaterial de andamiaje ideal debe soportar la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, promover interacciones célula-célula, ser biocompatible, exhibir controlada biodegradación que coincida con la tasa de crecimiento del neot Tejido y que su procesamiento permita modificaciones estructurales y morfológicas para adecuarlas a las necesidades del tejido nativo.¹⁴³

Numerosos estudios han demostrado que la FS cumple estos requisitos en el campo de la ciencia de los biomateriales y la ingeniería biomédica, además de poseer dos características importantes para el tejido OC: elasticidad mecánica y resistencia.



2.2.3.3 Biocompatibilidad

En 1993 la Food and Drug Administration (FDA) reconoció a la FS como un biomaterial debido a su amplio uso en suturas. Dos años más tarde, la FS fue estudiada por primera vez para analizar su capacidad de adhesión y crecimiento celular cultivando fibroblastos en matrices de FS del gusano *B. mori*.¹⁴⁴

La FS utilizada para la fabricación de andamios generalmente carecen de sericina, la sericina tiende a ser descartada en usos biomédicos porque algunas investigaciones le atribuían una reacción alérgica.^{145,146} Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado la seguridad de la sericina para su uso biomédico,^{122,147} atribuyéndole incluso mejores cualidades que la fibroína para promover la adhesión celular¹⁴⁸. Adicionalmente Liu y col.¹⁴⁹ refieren que no hay diferencias inmunogénicas significativas entre la fibroína de seda y la sericina.

La FS se ha utilizado tanto en su forma pura como en combinación con otros biomateriales para optimizar las características de cada uno y crear andamios más eficientes para su uso biomédico. Una de sus combinaciones consiste en FS y quitosán, esta combinación es biocompatible y permite el crecimiento y migración de células madres mesenquimales (MSCs) en un andamio tridimensional^{111,150}. En estudio posterior por Vishwanath y col.¹⁵¹ se probaron diferentes proporciones de FS y quitosán, concluyendo que la proporción 80:20 proveía mejores condiciones para la regeneración del cartílago utilizando MSCs derivadas de la sangre de cordón umbilical. Samal y col.¹⁵² también probaron esta combinación de biomateriales empleando ultrasonido para eliminar el uso de disolventes orgánicos o el entrecruzamiento químico durante la preparación de hidrogeles 3D de FS. Esta combinación de biomateriales también demostró que soporta el fenotipo condrogénico en andamios 3D.¹⁵³ Por otra parte, Tamada y col.¹⁵⁴ utilizaron andamios tridimensionales de FS que también fueron biocompatibles para el crecimiento de células MC3T3.

Una característica única de la molécula de FS es la presencia de dos secuencias activas diferentes, VITDSDGNE y NINDFDED, ambas reconocidas por una integrina. Combinada con la capacidad de promover el crecimiento celular, esta característica otorga a la FS la capacidad de bio-reconocimiento¹⁵⁵. Entre las células que se han cultivado en andamios basados en FS se encuentran: células MG-63¹⁵⁶,



BMSC,^{157,93,158,159} ADSC⁶⁷, condrocitos^{160,161,162}, condrocitos inmortalizados¹⁶³, células de núcleo pulposo¹⁶⁴ y fibroblastos¹⁶⁵.

Otra combinación fue estudiada por Jaipaew y col.,⁹¹ quienes combinaron FS con ácido hialurónico (AH) y obtuvieron andamios elásticos; donde las células crecidas en estos andamios mostraban la habilidad de expresar marcadores condrogénicos. Li y col.⁷⁴ obtuvieron resultados similares produciendo andamios de nanofibras por electrohilado de FS con ácido poli(L-láctico). Otros materiales que han sido utilizado en combinación con la FS para crear andamios incluyen la agarosa⁸⁸, colágeno tipo II (COL II)¹⁶⁶; colágeno tipo I (COL I)¹⁶⁷ e HA¹⁶⁸.

Un evento crucial para la formación de tejido es la agregación celular que da lugar a las interacciones célula-célula. La FS se caracteriza por promover estas interacciones beneficiando la agregación celular,¹⁶⁹ si bien, las células cultivadas en FS no se atraen entre sí, siguen manteniendo cercanía,¹⁷⁰ esto es importante para mejorar el desarrollo de tejido neoformado ya que se ha observado que a mayor densidad celular inicial, mayor es la cantidad de GAGs y colágeno en andamios 3D de fibroína, además de poseer una mejorada resistencia mecánica a la compresión.¹⁷¹

La biocompatibilidad de la FS también ha sido demostrada en aplicaciones asociadas con la reparación de hueso^{172,173,174,175,176,177,178,179}, meniscos¹⁸⁰, piel¹⁸¹ y defectos en tendones¹⁰⁷.

2.2.3.4 Métodos de procesamiento para andamios 3D de FS

La FS es fácil de modificarse químicamente y puede ser procesada en diversas formas, como fibras, geles, films, microesferas, tubos y esponjas (acuosas o con solventes).^{123,182} Los andamios 3D deben ofrecer propiedades mecánicas adecuadas, además de una porosidad, tamaño de poro, orientación e interconectividad apropiada entre los poros dependiendo del tejido que se desea reparar; permitir el cultivo celular dentro de estos biomateriales es igualmente importante.

A pesar de las diversas técnicas para el procesamiento de la FS, los métodos mayormente utilizados para desarrollar andamios 3D para reparar cartílago y hueso son fibras obtenidas por electrohilado, esponjas acuosas o esponjas utilizando el solvente



1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). El electrohilado es una técnica que produce fibras de diámetro pequeño con grandes superficies, produciendo una esfera isotrópica no tejida de fibras de seda. Las esponjas de FS brindan andamios 3D porosos; las esponjas acuosas poseen excelente interconectividad entre los poros y pueden incorporar moléculas bio-activas, mientras que las esponjas a base de HFIP tienen superficies más lisas en los poros y mayor resistencia mecánica, permitiendo añadir agentes de refuerzo para aumentar la resistencia mecánica.¹⁸²

Una ventaja primordial que ofrece la FS en la elaboración de andamios tridimensionales es la modulación del tamaño de poro. Kim y col.¹⁸³ desarrollaron andamios 3D derivados de FS acuosa utilizando diferentes tamaños de partículas de NaCl para la formación de poros, observando que con partículas entre 470 a 940 μm se obtenían poros altamente homogéneos e interconectados. Resultados similares fueron obtenidos por Wang y col.¹⁸⁴ en andamios 3D de FS utilizando partículas de sal de 500-1000 μm , subsecuentemente a la caracterización biológica del andamio, ellos observaron una alta expresión de genes condrogénicos, así como abundante producción de matriz extracelular (MEC) cartilaginosa. De manera contraria, Han y col.¹⁸⁵ sugieren que el uso de partículas de sal de 90-180 μm proporcionan un mejor ambiente para la adhesión y proliferación de condrocitos, generando una MEC rica en GAGs y COL II. Además del uso de NaCl, otros tipos de partículas porógenas han sido utilizadas. Moon y col.¹⁸⁶ utilizaron una mezcla de NaCl y sacarosa como porógeno para generar andamios 3D con diferentes características, sugiriendo que esos andamios eran aplicables en la IT.

Makaya y col.¹⁸⁷ compararon andamios de FS derivados de las combinaciones NaCl/agua y sacarosa/HFIP, empleando tamaños de partículas entre 300 y 500 μm , la combinación NaCl/agua mostraba un tamaño promedio de poro de 108.2 μm y resultó mucho más resistente en la prueba de compresión que la de sacarosa/HFIP que mostraba un tamaño de poro de 329.8 μm . Es importante destacar que en este trabajo no se puede concluir si los resultados se deben al porógeno o al solvente utilizado. En otro estudio, Nazarov y col.¹⁸⁸ emplearon partículas de bicarbonato de amonio como porógeno, utilizando el método espuma de gas para producir andamios 3D, observando alta resistencia a la fuerza de compresión y tamaños de poro interconectados mayores a 100 μm de diámetro.



Uno de los desafíos en la construcción de andamios osteocondrales se encuentra en la unión de dos biomateriales diferentes. Para brindar una solución, Foss y col.¹⁸⁹ proponen el uso de genipina como entrecruzador natural para la formación de esponjas de AH y FS, ya que estas permanecieron unidas a diferencia de las que no se elaboraron con el entrecruzador.

2.2.3.5 Degradación

De acuerdo con la definición de la Farmacopea de los Estados Unidos, la FS como sutura no es considerada degradable debido a que conserva el 50% de sus características de tensión *in vivo* después de 60 días. Sin embargo, la literatura demuestra que la FS es degradable durante periodos prolongados *in vivo*, a pesar de las múltiples formas y técnicas de procesamiento.^{145,190,191} Básicamente, se ha observado que la FS induce una respuesta inflamatoria leve *in vivo*, generando la activación de macrófagos, detectándola como un cuerpo extraño, promoviendo así la formación de células multinucleares gigantes¹²⁰. La respuesta inmune es dependiente de la estructura, sitio de implantación y método de fabricación de los materiales de FS.

La degradación de la FS puede verse afectada por diversos factores, incluyendo el método de fabricación, y puede variar de horas a años. Por ejemplo, en estudios *in vivo*, se observa que andamios de FS acuosa se degradan más rápido (2-6 meses) porque poseen características hidrófilas haciéndola más susceptible a la degradación enzimática, mientras que andamios de FS derivados del solvente HFIP poseen una degradación lenta por su característica hidrófoba (1 año).¹⁹²

Como se mencionó anteriormente, los biomateriales deben degradarse de acuerdo con la tasa de formación del neot Tejido para restaurar las funciones fisiológicas. Este requerimiento necesita un entendimiento fundamental de las interacciones entre los factores fisiológicos, como la carga mecánica rutinaria específica a la que cada tejido es sometido en condiciones fisiológicas y el efecto que esto tendría en la degradación de los biomateriales. Kluge y col. elaboraron un modelo matemático experimental para caracterizar la degradación de las fibras de seda que se produce después del tratamiento enzimático (α -quimotripsina o proteasa XVI) combinado con carga y descarga cíclica para elucidar el fenómeno de degradación para futuras aplicaciones clínicas.¹⁹³



Al resumir las observaciones anteriores, se demuestra inicialmente que la FS es un biomaterial con características adecuadas para su uso en aplicaciones biomédicas, y la selección del sistema de dilución utilizado resulta crítica para la degradación de la FS.

2.2.3.6 Estructura 3D de la FS en la reparación de DOCs

Los DOCs comprometen el cartílago articular, el hueso subcondral y los tejidos interfásicos, afectando la mecánica de la articulación y generando cambios degenerativos.¹⁹⁴ La elaboración de andamios que buscan restaurar las funciones normales de un defecto OC es compleja debido a las diferencias en la composición y estructura de cada segmento, además de las necesidades mecánicas y bioquímicas que se deben considerar para cada fase. Contemplando tales requerimientos, los andamios OC intentan generar estructuras biomiméticas que puedan incorporar materiales bioactivos que influyan significativamente en la osteogénesis y/o condrogénesis, buscando obtener características mecánicas y bioquímicas similares a estos tejidos.

Se han propuesto andamios tridimensionales porosos basados en FS para emular la red de fibrillas de colágeno de la MEC del cartílago nativo, ya que la porosidad en las fases de los andamios es importante para lograr una eficiente regeneración osteocondral. Generalmente, poros pequeños en la fase condral son deseados para inducir hipoxia y favorecer la condrogénesis^{195,196}, mientras que poros más grandes son deseados en la fase ósea^{197,198} para promover la angiogénesis; esta estructura simula las condiciones fisiológicas. Sin embargo, la caracterización de los andamios osteocondrales revela que estas especificaciones no se cumplen a menudo, no obstante, tal deficiencia no limita su capacidad para diferenciarse eficazmente en linajes condrogénicos u osteogénicos, porque la diferenciación está influenciada no solo por el tamaño del poro, sino también por todo el proceso de la creación del andamio, desde la elección del biomaterial, su procesamiento, el tipo celular empleado en el cultivo y la forma en el que éstas son cultivadas (**Tabla 2**).

La **tabla 2** muestra un resumen de los andamios 3D basados en FS para su aplicación en ITOC. La mayoría de las estrategias se basan en el constructo de cada fase (condral y hueso) por separado. Para aumentar la eficiencia de la diferenciación hacia el linaje respectivo realizan un pre-cultivo celular de alta densidad en cada fase antes de su ensamblaje. Las fases se ensamblan mediante el uso de pegamentos, suturas, péptidos



o métodos físicos. Finalmente, algunos diseños desarrollan sistemas de co-cultivo donde se usan medios basales o factores comunes a los medios condrogénicos y osteogénicos para la maduración del fenotipo osteocondral.

Es notable que las nuevas investigaciones están dirigidas a desarrollar sistemas de co-cultivo que permitan una mejor emulación de las características nativas en cada fase del tejido osteocondral. La aplicación de los sistemas de co-cultivo se basa en la comunicación celular heterotípica, esta capacidad de las células de diferente estirpe para influir mutuamente en sus funciones y simular el nicho nativo,¹⁹⁹ por lo tanto, modelar el "nicho regenerativo" en los tejidos estratificados como el tejido osteocondral representa el mayor desafío en el desarrollo de biomateriales.

Como se mencionó, la mayoría de los diseños de andamios osteocondrales basados en FS se cultivan inicialmente en medios inductores de diferenciación por separado para cada fase; en contraste, algunos diseños utilizan técnicas que involucran compresión⁸¹, liofilización,⁸³ o gradiente de temperatura⁶⁷ para ensamblar las fases antes de realizar el cultivo inicial. Esto mejora la integración, sin embargo, a pesar de tener un andamio integrado, la capacidad de soportar la diferenciación (condrogénica y osteogénica) aún se evalúa en cada fase antes de ser ensambladas, en lugar de evaluar la diferenciación post-ensamblaje. Recientemente, Chen y col.²⁰⁰ desarrollaron cámaras para co-cultivo, permitiendo así la diferenciación coordinada del fenotipo condrogénico y osteogénico. A pesar de la complejidad del desarrollo de co-cultivos *in vitro*, se predice que serán la opción clínica más prometedora para proporcionar una solución a las lesiones osteocondrales.

Se ha observado que el uso de moléculas bioactivas mejora la diferenciación osteocondral. Saha y col.⁸⁰ agregaron TGF- β 3 en la fase condral y BMP2 en la fase ósea de andamios osteocondrales basados en FS, estas moléculas bioactivas inducen diferenciación condrogénica y osteogénica, respectivamente, incluso cuando se implantan sin células en surcos de la rótula femoral de ratas Wistar. Sus resultados confirman, aún más, que dependiendo de la variedad de gusanos de seda utilizados se influye en la eficiencia para dirigir las células al fenotipo condrogénico u osteogénico tanto *in vivo* como *in vitro*. Adicionalmente, se han utilizado osteoconductores como el fosfato de calcio,⁵ HA^{67,201} y estroncio-hardistonita-gahnita,⁸³ los cuales son incorporados



en la fase ósea de los andamios osteocondrales para mejorar la osteogénesis y las propiedades mecánicas. Lo ideal para una aplicación clínica rápida sería que el andamio, por sí solo, sin aditivos celulares o moléculas bioactivas, pudiera influir en el proceso condrogénico y osteogénico del tejido osteocondral para restaurar las funciones fisiológicas nativas.²⁰² Un pequeño número de andamios osteocondrales basados en FS se evalúan mediante modelos *in vivo*,^{80,5} aunque los resultados parecen ser prometedores, las investigaciones futuras deberían centrarse en modelos donde la carga y el diseño de las articulaciones se parezcan más a las del humano (caballo, cerdo, oveja).

A pesar de la dificultad para lograr la aplicación clínica, existen opciones comerciales para regenerar los DOCs, como ChondroMimetic^{TM57} que contiene colágeno I-condroitín-6-sulfato para la fase condral y fosfato de calcio para la fase ósea. TruFit CB,^{TM 58,59,60,61} el cual es una bicapa sintética de PDLG para la fase condral y sulfato de calcio para la fase ósea. Por otra parte, MaioRegen®^{54,53} es un andamio trifásico que considera la biomimética de la fase condral, la tidemark y hueso subcondral, su fase condral se compone de colágeno I de equino, su fase intermedia y subcondral están compuestas por colágeno I de equino y magnesio-HA. A pesar de su aplicación clínica, no se han evaluado los resultados a largo plazo en los pacientes. Los andamios basados en FS para la regeneración osteocondral aún no se encuentran en el mercado, lo que representa un área de oportunidad para seguir investigando combinaciones de biomateriales basados en FS que representen la mejor versión para su rápida y exitosa aplicación clínica.



Tabla 2. Andamios 3D basados en FS para la ingeniería del tejido osteocondral.²⁰³

Referencia	# fases	Condral				Ósea				Cultivo	Ensamble
		Material	Tamaño poro /Técnica formación de poro	% Porosidad	Células	Material	Tamaño poro /Técnica formación de poro	% Porosidad	Células		
2008 Augst ^{78†}	2	FS	300-425µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	95.5%	BMSC	FS	300-425µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	95.5%	BMSC	Pre-cultivo por separado en cada fase del andamio con medio de control (cultivo estático) y posterior cambio a MC o MO (cultivo dinámico). Co-c en biorreactores después del ensamblaje de ambas fases con MO, MC o medio control	Sutura
2012 K. Chen ^{82†}	2	FS	150µm / congelación- liofilización	NA	BMSC	FS	150µm / congelación- liofilización	NA	Osteoblastos	Pre-cultivo por separado en cada fase del andamio con su respectivo MC o MO. Co-c después del ensamblaje	Péptido RADA
2013 Saha ^{80†} ★	3	FS mulberry o no-	Mulberry 72µm; No- mulberry 74µm /	74-82%	<i>In vivo</i> : BMSC; <i>In vitro</i> : SC	FS mulberry o no-mulberry + BMP2	Mulberry 72 µm; No-mulberry 74µm /	74-82%	<i>In vivo</i> : BMSC <i>In vitro</i> : SC	<i>In vitro</i> : cultivos dinámicos en los andamios sin medios de inducción por	Pegamento de fibrina solamente antes de la



		mulberry + TGF-β3	Congelación-liofilización				Congelación-liofilización			separado, posteriormente con MC u MO <i>In vivo</i> : SC	implantación <i>in vivo</i>
2013 K. Chen ^{79†}	2	FS	150µm /Liofilización	NA	BMSC	FS	150µm / Liofilización	NA	BMSC	Pre-cultivo por separado en el andamio con respectivo MC u MO. Co-c después del ensamble	Péptido Rada auto-ensamble
2014 Yan ^{5†*}	2	FS	300-700µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	82.02%	BMSCs solo para caracterización <i>in vitro</i>	Seda-nanoCaP	300-700µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	62.27%	BMSC solo para caracterización <i>in vitro</i>	<i>In vivo</i> : SC para implantes en DOCS	Liofilización
2014 Ding ^{67†}	3	FS	112.43 µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	85.30%	ADSCs	FS/HA	362.23 µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	90.25%	ADSCs	Pre-cultivo por separado en monocapa con MC o MO y posterior cultivo por separado en cada fase del andamio con MC o MO	Técnica SFIT
2015 Ghezzi ^{81†}	3	Híbrido Col I-FS-Col I	NA	NA	BMSC	Híbrido Col I-FS-Col I	NA	NA	BMSCs	Se sembraron las células en el híbrido y en cada fase por separado con medio de no-diferenciación, MC y MO para cada uno	Técnica CP



2015 J. Li ^{83‡}	2	FS	100-120µm / congelación a -20° C	NA	BMSCs	EHG-slk	400-500µm / MEP	NA	BMSCs	Se cultivaron células en ambas fases del andamio y se cultivó como bifásico o fases separadas con MC y MO	Liofilización
2016 K. Chen ^{200‡}	2	FS	NA / Congelación- liofilización	NA	BMSCs	FS	NA / Congelación- liofilización	NA	BMSCs	Cultivo en cámaras para co-cultivo con medio MC u MO para cada compartimento	Péptido RADA de auto-ensamblaje
2016 Çakmak ^{201‡}	3	Hidrogel- PA-RGDS	NA	NA	Condrocitos	Seda-HA	240-585µm / Lixiviación de partícula (NaCl)	90%	BMSCs	BMSC se cultivaron en el andamio de seda con MO y los condrocitos se cultivaron en hidrogeles- PA-RGDS con MC, por separado. Posterior ensamblaje y Co-c en MO	A través de una interfase acelular de FS, la MEC secretada por las células en cada fase ayudó a la autoadhesión

NA: No analizado, **MC:** Medio condrogénico, **MO:** Medio osteogénico, **Co-c:** Co-cultivo (estudio *in vitro*), **SC:** Sin células, **BMSC:** Células madre derivadas de médula ósea, **ADSC:** Células madre derivadas de tejido adiposo, **DOCs:** Defectos osteocondrales, -nanoCaP: nanopartículas de fosfato de calcio, **SFIT:** Separación de fase inducida térmicamente guiada por gradiente de temperatura, **CP:** Compresión plástica, **EHG:** Estroncio-hardistonita-gahnita, **MEP:** Método de esponja polimérica, **PA-RGDS:** Péptido anfifilo con secuencia de aminoácidos (Arg-Gly-Asp-Ser), ‡:Estudio *in vitro*, ★: Estudio *in vivo*



La FS como biomaterial es promisorio para la construcción de andamios osteocondrales debido a su buena biocompatibilidad, su procesamiento versátil, las diversas opciones de esterilización y por apoyar la diferenciación condrogénica y osteogénica. Satisfacer los requisitos físicos, biológicos y mecánicos del tejido osteocondral es complicado debido a su naturaleza estratificada, pero los enfoques en el campo de la IT y el cultivo han logrado enfoques biomiméticos prometedores para una posible aplicación clínica a corto plazo.

Consideramos que el siguiente gran paso que deben dar los andamios osteocondrales basados en FS es su aplicación en modelos *in vivo*; especialmente en modelos que representan un desafío para su diseño y para el potencial de regeneración osteocondral, una característica que se les han atribuido a lo largo de sus evaluaciones *in vitro* y que, a diferencia de otros biomateriales, las evaluaciones *in vivo* son escasas. Además, la mayoría de los modelos *in vivo* utilizados rara vez simulan el diseño nativo y las necesidades mecánicas de la articulación humana. Con el fin de acelerar la transferencia de los injertos de múltiples fases al área médica, se deben tener en cuenta los requisitos de la práctica clínica; la dirección para lograr esto requiere mayores esfuerzos en una fabricación simplificada, reproducibilidad de la técnica, condiciones de almacenamiento prácticos y métodos adecuados para esterilizar.

El desarrollo de andamios y la caracterización física, biológica y mecánica, es un trabajo multidisciplinario, por lo que es esencial que los avances en curso en cada rama converjan para lograr resultados de gran alcance clínico para restaurar las funciones normales del tejido osteocondral.

2.2.4 Factores de crecimiento y biofuncionalización de los biomateriales en la ITOC

Regularmente, los materiales por sí solos no ofrecen suficiente apoyo a las células para lograr una correcta generación de hueso y cartílago, por este motivo se ha investigado la utilidad de incluir ciertos factores de crecimiento que puedan encaminar y acelerar el crecimiento y proliferación de las células hacia una estirpe en específico.

Los factores de crecimiento se unen a los receptores de la superficie celular y activan las vías de señalización intracelular, que afectan la proliferación celular, la diferenciación



y la síntesis de MEC durante la regeneración de tejidos.¹⁹⁴ Los factores de crecimiento utilizados en la reparación osteocondral se expresan de manera natural en el cuerpo; sin embargo, la concentración utilizada en estudios *in vitro* suele ser mucho mayor.²⁰⁴ Existen diversas técnicas para incorporar factores de crecimiento en la ITOC. La forma más sencilla y común es a través del medio de cultivo, por ejemplo, con el uso de TGF- β 1²⁰⁵, TGF- β 3⁷¹ e IGF-1⁷² para promover la diferenciación condrogénica, o el uso de BMP-2⁷⁸ para promover la diferenciación osteogénica.

Otro método para agregar los factores de crecimiento es a través del biomaterial, ya sea en una sola fase^{206,175}, o en ambas, generando un gradiente²⁰⁷; estas uniones del biomaterial con un factor de crecimiento se llevan a cabo mediante reacciones químicas de entrecruzamiento²⁰⁸, tecnologías que suelen ser más complicadas y elaboradas. Por ejemplo, funcionalizar los biomateriales con HA²⁰⁹ o iones de CaP,²¹⁰ Mg⁺²¹⁹⁴ para promover la diferenciación osteogénica. Una de las moléculas bioactivas más empleadas es la secuencia RGD (ácido arginina-glicina-aspartico) que es un péptido presente en varios constituyentes importantes de la MEC, proporcionando sitios de unión a integrina para la adhesión celular, incluidos la fibronectina y el colágeno.²¹¹ Debido al enfoque actual de la ITOC, se busca que los nuevos modelos propuestos puedan ser desarrollados mediante técnicas sencillas y reproducibles, incluso libres de células. Aquí radica la importancia de utilizar biomateriales intrínsecamente bioactivos que conserven componentes que puedan ser detectados por los receptores celulares dando lugar a la adhesión y subsecuente proliferación y diferenciación.

La FS y las matrices derivadas del tejido son conocidos por poseer secuencias bioactivas que pueden ser reconocidas por las células. Como se mencionó, la FS presenta dos secuencias activas diferentes que son reconocidas por una integrina (VITDSDGNE y NINDFDED).¹⁵⁵ Por otra parte, respecto a las matrices derivadas del cartílago^{98,97} y del hueso, el proceso ideal de descelularización debería eliminar todas las células y antígenos celulares, al mismo tiempo que conserve los componentes bioactivos que residen en el MEC. El uso de MEC descelularizada es un concepto relativamente nuevo en la IT del cartílago. Los posibles efectos inductivos de los factores de crecimiento y GAGs retenidos dentro de la MEC, y la inmunogenicidad de la matriz aún no se han dilucidado por completo.²¹² Se sugiere que la conservación de los proteoglicanos en las matrices descelularizadas funcionan como reservorio de varios factores de crecimiento en momentos en que estos no se producen y no se liberan fácilmente.²¹³ A pesar de que el



proceso de descelularización compromete la capacidad mecánica de los andamios derivados de la MEC, se propone la combinación con materiales más resistentes como polímeros sintéticos o naturales para mejorar su mecánica.²¹⁴



CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

La limitada capacidad de autorreparación del cartílago plantea retos importantes para su regeneración satisfactoria. En la actualidad se proponen andamios biomiméticos que consideran la estructura estratificada del tejido, los requisitos estructurales, mecánicos y bioquímicos, considerando como un todo a la unidad osteocondral; y bajo esta premisa proponer un producto viable que logre una mejor regeneración del tejido a largo plazo.

Estudios *in vivo* e *in vitro* en el laboratorio sugieren que la matriz de cartílago bovino (MCB) proporciona un microambiente adecuado para promover la expresión de componentes propios del tejido condral, que en sinergia con la fibroína de seda brindará la resistencia mecánica propia del tejido. Por otro lado, el andamio de matriz de hueso bovino (MHB) proveerá una buena integración al tejido adyacente.

Este trabajo propone el diseño, construcción y caracterización *in vitro* de un nuevo andamio bifásico biomimético de componentes bioactivos cultivado con hADSCs para su potencial uso en la clínica.



CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

La construcción de un nuevo andamio bifásico a partir de matriz de cartílago bovino/fibroína de seda y matriz de hueso bovino, celularizado con hADSCs, proporciona el microambiente adecuado para sostener la diferenciación condrogénica, el fenotipo y la distribución celular propia del tejido; además de la formación *de novo* de matriz extracelular característica del cartílago hialino.



CAPÍTULO V

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

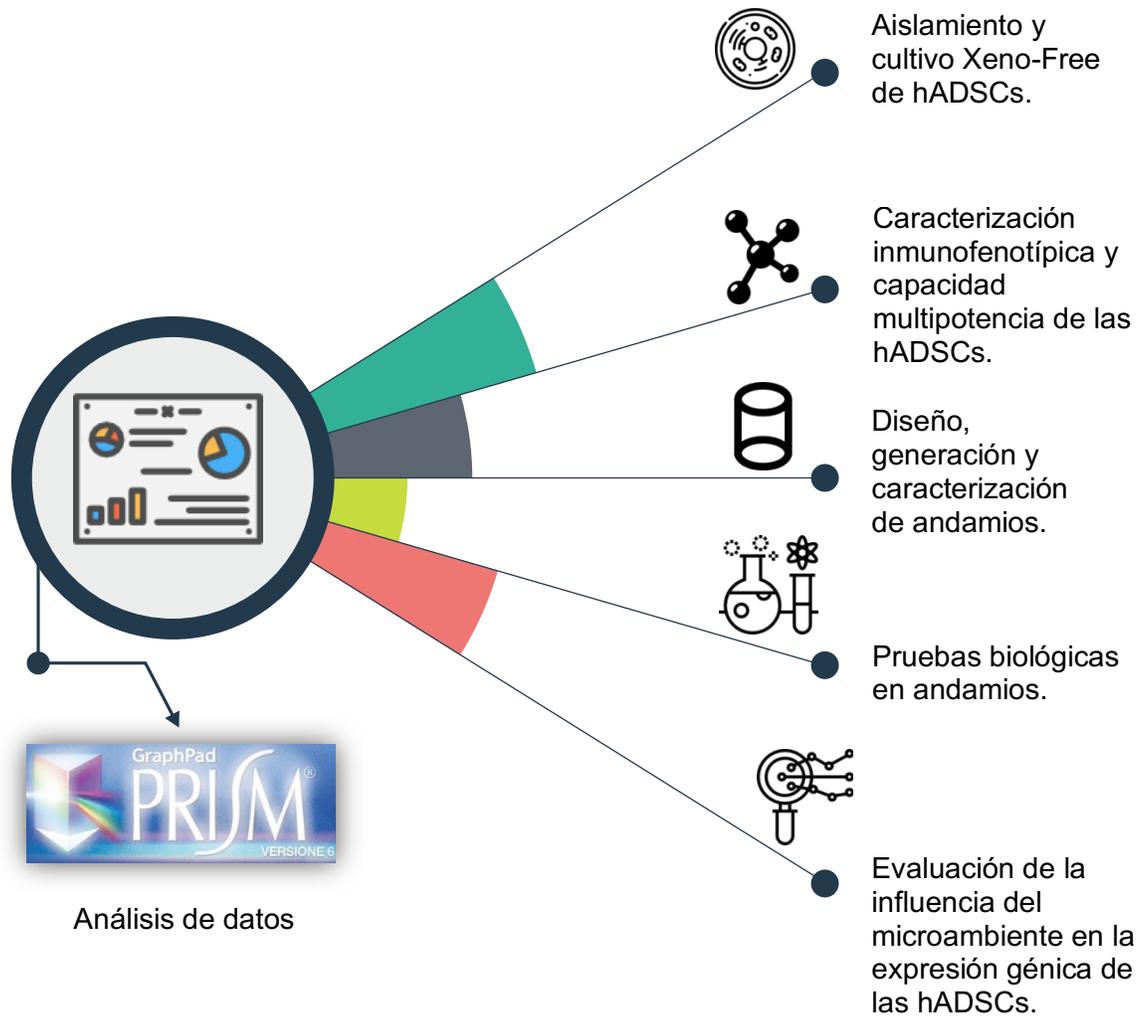
Diseñar y evaluar *in vitro* un implante bifásico bioactivo para la reparación de defectos osteocondrales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar en monocapa la diferenciación condrogénica y osteogénica a partir de hADSCs cultivadas en medio xeno-free.
2. Diseñar y generar andamios bifásicos y biomiméticos a partir de matriz de cartílago bovino-fibroína de seda/matriz de hueso bovino (MCB-FS/MHB) y caracterizar su ultramicroestructura.
3. Estudiar las propiedades biológicas de los andamios, que incluyen: a) Capacidad para sostener la adhesión celular; b) Expresión de marcadores condrogénicos y osteogénicos (condro y osteo –inducción); c) Evaluación de la influencia del microambiente sobre la expresión génica.



CAPÍTULO VI ESTRATEGIA GENERAL





CAPÍTULO VII

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

7.1.2 Matriz de cartílago y hueso bovino: La matriz de cartílago se obtuvo a partir de rodillas de res en un rastro con certificado TIF (Empacadora Treviño).

7.1.3 Tejido adiposo: Las células troncales se aislaron de tejido adiposo proveniente de lipoaspirados abdominales de mujeres voluntarias sanas, con la colaboración del Dr. Yanko Castro Govea.

7.1.4 Andamios: Para generar los andamios se utilizó, además de las matrices bovinas, fibroína de seda proveniente de capullos del gusano *Bombix mori* (#5154-20ML; Advanced Biomatrix, CA).

7.1.5 Suero humano: Este se obtuvo a partir de la sangre de donadores sanos AB Rh⁺.

7.2 MATERIALES Y REACTIVOS.

7.2.1 Matrices de cartílago y hueso bovino: Para la descelularización de la matriz de cartílago bovino (MCB) se utilizó Tris-HCl, EDTA, KCl y MgCl₂, SDS (Bio-Rad. CA), PBS (SIGMA), hojas de bisturí #22 (HERGOM®) y nitrógeno líquido (Praxair). Para la descelularización de hueso bovino se usó SDS (Bio-Rad. CA) y H₂O₂ al 30% (CTR), taladro dremel 2000, trefina de 0.6 mm de diámetro interno (Hu-Fiedy, US). Además, se utilizó una trituradora, coladores, mallas y tamices.

7.2.2 Extracción de suero humano: Para la recolección de la sangre se utilizaron tubos vacutainer tapa roja de 10 ml. Para la separación del suero se utilizaron tubos para centrifuga de 50 ml (4558, Corning) y unidades de filtración de 0.22 µm de 250 y 500 ml (cat. 430767,430769, Corning).



7.2.3 Aislamiento de células troncales mesenquimales: La grasa proveniente del lipoaspirado se digirió con colagenasa tipo I (cat. 17100-017; GIBCO, US), se utilizó PBS (SIGMA), tubos de 50 ml (cat. 4558; Corning, US) y de 15 ml (430791; Corning) para centrifuga, criotubos de 1.5 ml (cat. 430658, Corning), agitadores magnéticos y frascos estériles.

7.2.4 Cultivo celular: Para el cultivo de las células troncales se utilizó medio DMEM (cat.11995-065, GIBCO) suplementado con suero humano y antibiótico-antimicótico 100x (15240-062, GIBCO). Para la diferenciación condrogénica se utilizó el medio DMEM suplementado con antibiótico-antimicótico, dexametasona (D2915-100MG SIGMA), ácido ascórbico (013-19641, WAKO), ITS (25-800-CR, GIBCO) y TGF- β (T7039-2UG, ThermoFisher). Para la diferenciación osteogénica se utilizó DMEM suplementado con suero humano, dexametasona, β -glicerofosfato (G9422-50G, SIGMA) y ácido ascórbico. Para la diferenciación adipogénica se utilizó Adipogenesis Assay Kit (Cat. ECM950, EMD Millipore). Para levantar las células de la placa de cultivo se utilizó tripsina 10x (25-054-CI, Corning). Entre los materiales que se utilizaron fueron: placas de cultivo tratadas (fondo adherente) de 6 pozos (cat. 3516, Corning), placas sin tratar (fondo no adherente) de 24 (cat. 3738), 48 (cat. 351178, Corning) y 96 pozos (cat. 3370, Corning) y botellas de cultivo tratadas de 25 (cat. 430639, Corning), 75 (cat. 3290, Corning) 150 (cat. 430823, Corning) 175 (cat. 431080, Corning) 225 cm² (cat. 3001, Corning), unidades de filtración de 0.22 μ m de 250, 500 y 1000 ml (cat. 430767,430769,430517, Corning), acrodiscos de 0.22 μ m (725-2520, Thermo Fisher Scientific), jeringas de 5 y 10 ml, pipetas serológicas, micropipetas, puntillas para micropipetas y tubos para microcentrifuga de 1.5 y 2 ml, tubos para centrifuga de 15 ml (430791, Corning) y de 50 ml (4558, Corning)

7.2.5 Inmunofenotipificación de MSCs: Se utilizó tripsina (cat. 25200056; GIBCO) para levantar las células de la placa de cultivo, se analizaron los marcadores de superficie que aparecen en la **tabla 3** por citometría de flujo. Se utilizó albúmina de suero bovina (BSA), PBS 1X y tubos de 2 ml.

7.2.6 Construcción de andamios: Para generar los andamios además de los biomateriales, se utilizaron moldes cilíndricos de teflón (2 cm x 1 cm) con un diámetro interno de 0.6 mm, jeringas de insulina, cloruro de sodio (partículas de 77-177 μ m) y



1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (cat. 105228, SIGMA-ALDRICH), varillas de vidrio de 0.6 mm de diámetro, parafilm® (cat. PM992, Bemis), Kimwipes, embudos pequeños y agua destilada.

7.2.7 Ensayos de viabilidad celular. Para medir la viabilidad de las células en el andamio, se utilizó Azul Alamar (AbD Serotec®), placas de 48 pozos sin tratar (Corning) y placas de 96 pozos oscuras para la lectura de la fluorescencia.

7.2.8 Aislamiento de RNA y ensayo de expresión génica. Para disgregar los andamios se utilizó un TissueRuptor (QIAGEN), para aislar el RNA se utilizó TRIzol® Reagent (cat. 15596018, Invitrogen), tubos de 2 ml, cloroformo, isopropanol, etanol al 100 y 70%, agua tratada con DEPC libre de nucleasas (Invitrogen). Para sintetizar el cDNA se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat. 4368813, Applied Biosystems), tubos para PCR de 0.2 ml. Para el ensayo de expresión génica se utilizó el reactivo PowerUp SYBR Green Master Mix (A25776, ThermoFisher), los primers utilizados (**Tabla 3**) fueron diseñados por el M.C. Alejandro García Ruíz para su tesis de doctorado.

7.2.9 Microscopía electrónica de barrido (MEB). Para fijar las muestras se utilizó glutaraldehído 25% grado microscopía electrónica (G5882-50ML, SIGMA), cacodilato de sodio trihidratado (12300-25, Electron Microscopy Science), tetraóxido de osmio (cat 18456, TED PELLA Inc.), acetona (CTR), y dióxido de carbono (Praxair). Entre los materiales, se utilizaron vasos de precipitado, cinta de cobre, pinzas, pipetas Pasteur y canastillas para MEB.

7.2.10 Microtomografía computarizada (micro-CT): Para aumentar la radiopacidad de la fase MCB/FS se utilizó una solución de lugol, y se utilizó parafilm para cubrir la MHB. La muestra se inmovilizó en el equipo con tubos de esponjas de poliestireno. El equipo utilizado para el escaneo fue Skyscan 1176 (Bruker-biospin).

7.2.11 Histologías e inmunohistoquímicas: Para la fijación de las muestras se utilizó formalina 10% (HT501128, Sigma) y Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (cat. 4583; Sakura). Para la deshidratación se utilizaron casetes de inclusión, acetona (CTR) y xilol (CTR). Para la inclusión de las muestras se utilizaron moldes de inclusión y parafina (Mc



Cormick Scientific Paraplast), entre los reactivos utilizados se encuentran: solución de Bouin, ésta se preparó con ácido pícrico (J.T. Baker), formaldehído (J.T. Baker) y ácido acético glacial (CTR); cuchillas de bajo perfil para microtomo (TBS Inc. Carolina del Norte), hematoxilina monohidratada (MERCK), escarlata biebrieh (Analytika), fucsina ácida (Analytika), ácido fosfomolibdico (CTR Scientific), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético glacial (CTR), verde rápido (SIGMA), safranina O (SIGMA), alcohol absoluto (CTR), alcohol de 96° (CTR), portaobjetos tratados con silano al 2% (SIGMA) o portaobjetos silanizados (DAIGGER®). Referente a las pruebas inmunohistoquímicas se utilizó buffer de citratos (**Anexo 1**) para desenmascarar los epítopes, se utilizó el kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab64264, Abcam) (**Anexo 2**), los anticuerpos primarios empleados se muestran en la **tabla 4**. Los cortes histológicos se realizaron en colaboración con el M.C. Víctor Romero y del Técnico Histopatólogo Martín García Guerrero

Tabla 3. Descripción de los anticuerpos empleados para citometría de flujo.

Analito	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo
Mesenquimal:			
CD90	APC	Miltenyi Biotec	130-080-201
CD29	FITC	Miltenyi Biotec	130-101-255
CD44	PE	Miltenyi Biotec	130-098-108
CD73	Biotina-PerCP-Cy5.5	Miltenyi Biotec	120-006-957
Hematopoyético:			
CD45	PE	Miltenyi Biotec	130-080-201
CD14	PE	Miltenyi Biotec	120-004-062
Coctel mesenquimal + control isotipo	PE, FITC, APC, PerCP	Miltenyi Biotec	130-095-198

Tabla 4. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica

Anticuerpo	Fabricante	Catálogo
Anti COL I	Abcam	Ab6308
Anti COL II	Abcam	Ab34712
Anti AGC	Abcam	Ab36861



7.3 EQUIPOS

- Campana de flujo laminar
- Molino pulverizador K10 (Mezcladora Micrón S.A DE C.V).
- Sistema de multi-detección GloMax® (Promega).
- Incubadora de CO₂ Series 8000 WJ
- Potenciómetro SevenMull (METTLER TOLEDO).
- Microtomo RM2235 (Leica. Buffalo Grove, IL).
- Microscopios de luz invertida(Axio)
- Termociclador (Eppendorf)
- Termociclador tiempo real CFX96(BioRad)
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- Microcentrífuga 5424 (Eppendorf).
- Mezclador Vortex-Genie®2 (Scientific Industries, Inc. EE.UU.).
- Cabina para PCR P-030-202 (C.B.S. Scientific).
- Centrífuga IEC CL10 (Thermo Scientific).
- Citómetro de flujo (BD Accuri C6)
- Balanza GX-2000 (AND).
- Placa de calentamiento/agitación CIMAREC SP131325 (Thermo Scientific)
- Microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV (JEOL)
- Sistema de recubrimiento de oro (SCD 040, Balzers union)
- Secador de punto crítico (CPD 020 Balzers union)
- Bomba eléctrica (LR 13758 doerr)
- Cámaras de vacío
- Disgregador de tejidos TissueRuptor (TR 1252045, QIAGEN)
- Taladro Dremel 2000
- Equipo de microtomografía computarizada SkyScan

7.4 METODOLOGÍA

7.4.1 Aislamiento y cultivo de hADSCs: Las hADSCs se aislaron a partir de lipoaspirados del abdomen bajo de mujeres voluntarias sanas, los lipoaspirados fueron realizados por el Dr. Yanko Castro Govea, del Servicio de Cirugía Estética y Reconstructiva del Hospital Universitario, UANL. El tejido se colocó en tubos de 50 ml y se transportó en hielo hasta su uso. El tejido se centrifugó a 1000 rcf por 10 min, dentro



de la cabina de flujo laminar se recolectó el sobrenadante por decantación en un tubo nuevo, posteriormente se lavó suavemente por inversión en una proporción 1:1 (v/v) con PBS 1X que contenía 1% de antibiótico. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rcf por 10 min, se recuperó la fase estromal (sobrenadante) por decantación y se repitió el lavado. Se decantó la fase estromal en un frasco estéril con agitador magnético y se colocó una solución de colagenasa 0.1% en una proporción 1:1 (v/v) adicionando a la mezcla total 1% de gentamicina. Se incubó en baño maría a 37°C durante 30 min en agitación. Se dejó reposar la mezcla por 5 min para separar las fases (infranadante que contiene las células de interés y sobrenadante que contiene adipocitos). El infranadante se tomó con una pipeta de 5 ml y se colocó en tubos estériles de 15 ml o 50 ml dependiendo del volumen observado. Se centrifugó a 1600 rpm por 6 min y se eliminó el sobrenadante con pipeta, se recolectó la grasa desde arriba hacia abajo evitando turbulencia. Se lavó con PBS 1X y se centrifugó a 1600 rpm por 6 min; si aún se observan restos de tejido o mucha grasa, se recomienda utilizar un tamiz de 44 o 100 μm y volver a centrifugar.

El pellet fue resuspendido en un volumen de DMEM suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico y 10% de suero humano y se colocó en placas tratadas de 6 pozos por un día para realizar el subcultivo. Para el subcultivo, se retiró el sobrenadante y se transfirió a placas de 25 cm^2 o 75 cm^2 para su expansión sin cambiar el medio por 5 días, posteriormente, el medio fue cambiado cada 2 o 3 días. Las células se utilizaron en el tercer o cuarto pasaje para los experimentos siguientes. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% de CO_2 .

7.4.2 Inmunofenotipificación de hADSCs: Para evaluar el fenotipo mesenquimal de las hADSC, se analizaron marcadores de superficie mesenquimal, hematopoyéticos y de histocompatibilidad (**Tabla 3**). Se utilizaron aproximadamente 3.6×10^6 células por paciente (n=3), las células en tercer pasaje se levantaron del frasco de cultivo utilizando tripsina 0.5X a 37°C por 5 min. Se inactivó la tripsina utilizando un volumen igual de DMEM suplementado con 10% de suero humano. El volumen del frasco de cultivo fue transferido a un tubo de 15 ml y centrifugado a 1600 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet en una solución de PBS 1X adicionado con 0.5% de BSA, se centrifugó a 1600 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen total de muestras (aproximadamente 20 μl por tubo) y se agregó 2 μl del anticuerpo por tubo. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente y a oscuridad.



Los tubos fueron centrifugados a 1600 rpm por 6 min y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados en PBS 1X con 0.5% de BSA para finalmente resuspender el pellet en 100 μ l de PBS-BSA. Las muestras se transportaron en frío hasta su lectura. Se leyeron 10000 células por ensayo en el citómetro de flujo BD Accuri C6, con la colaboración de la Dr. C. Erika Coronado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

7.4.3 Capacidad de multipotencia de las hADSCs: Para evaluar el fenotipo mesenquimal, las células se diferenciaron al linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% de CO₂. Para la preparación del medio osteogénico y condrogénico se siguió la metodología de Ciuffreda²¹⁵.

El medio condrogénico se preparó utilizando DMEM alto en glucosa, el cual ya contenía 1% de piruvato de sodio y 1% de L-Glutamina, fue suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico, 1% de ITS, 100 nM de dexametasona, 1 μ g/ml de ácido ascórbico y 10 ng/ml de TGF β -1 (**Anexo 1**).

El medio osteogénico se preparó utilizando como base el mismo DMEM alto en glucosa y se adicionó con 10% suero humano, 1% antibiótico-antimicótico, 100 nM de dexametasona, 10 mM de β -Glicerofosfato y 0.05 mM de ácido ascórbico (**Anexo 1**).

Para la diferenciación adipogénica se siguió el protocolo del kit de adipogénesis. Brevemente, el medio de diferenciación adipogénica fue colocado por 5 días, el cual tenía como base DMEM alto en glucosa que ya contenía glutamina, y fue suplementado con 10% de suero humano, 1% de antibiótico-antimicótico, 0.5 nM de IBMX y 1 μ M de dexametasona. Posteriormente, se descartó el medio anterior y se agregó el medio de progresión adipogénica por 5 días, suplementado con 10% de suero humano, 1% de antibiótico-antimicótico y 10 μ g/ml de insulina. Finalmente se descartó el medio anterior y se agregó medio de mantenimiento por 5 días, el cual consistía en DMEM alto en glucosa, 10% de suero humano y 1% de antibiótico.

Los medios de diferenciación fueron agregados a las placas de cultivo cuando las hADSCs se encontraban en el tercer pasaje con un 90% de confluencia. Los medios se



cambiaban cada dos días y fueron preparados bajo esterilidad, una vez preparados solo pueden ser almacenados por 2 semanas a 4°C.

Las diferenciaciones se evaluaron de manera cualitativa a los días 0, 7 y 14 (n=3). En la diferenciación condrogénica se realizó tinción histológica con Azul de Alcian para observar la presencia de polisacáridos sulfatados; en la diferenciación osteogénica tinción con rojo de Alizarina para evaluar los depósitos de calcio y tinción con rojo oleoso para evaluar la presencia de lípidos neutros en la diferenciación adipogénica (**Anexo 2**). Las fotografías macroscópicas fueron tomadas utilizando un escáner convencional de oficina y las fotografías microscópicas fueron tomadas utilizando un microscopio óptico de luz invertida.

7.4.4 Producción de matriz de cartílago bovino (MCB). La producción de la MCB se realizó a partir de 15 rodillas de res en un rastro certificado TIF (Rastro y Empacadora Treviño, S.A. de C.V) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las rodillas se descongelaron durante una noche y utilizando un bisturí se obtuvieron lajas de cartílago de 2 mm aproximadamente de la zona de los cóndilos, rótula y tróclea femoral; se colocaron en PBS 1X a -20°C hasta su descelerización. La descelerización de la MCB se llevó a cabo a través de métodos fisicoquímicos basándonos en el método de Tavassol²¹⁶ y Luo²¹⁷ con diferentes variantes para seleccionar la más adecuada. Para empezar la descelerización, se colocó todo el material cartilaginoso en una malla para drenar el PBS. Dentro de la malla, se sumergió en nitrógeno líquido por 5 min y se descongeló en H₂O a 37°C, repitiendo el ciclo 5 veces; a continuación, el cartílago se trituró por 20 min utilizando una licuadora (de manera discontinua para no sobrecalentar el motor), se conservó a -20°C hasta el siguiente paso. Se colocó un tamiz de 225 µm encima de uno de 177 µm y el cartílago molido fue colocado en el tamiz de poro más grande para drenarlo, se recuperó el tejido de ambos tamices y se colocó en recipientes de acuerdo con los siguientes tratamientos:

Grupo control. Cartílago sin tratamiento con detergente, solo los ciclos de congelación-descongelación con nitrógeno líquido;

A. SDS 2% por 9 h;

B. SDS 2% por 5 h, seguido de SDS 4% por 3 h;

C. SDS 2% por 8 h, seguido de SDS 4% por 4 h;



- D.** Buffer hipotónico (10 mM Tris-HCl/ 2 mM EDTA, pH 8) (BHSS), suplementado con 100 mM de KCl y 5 mM MgCl₂ (BHS) por 24 h, seguido de Buffer hipotónico sin suplementar (BHSS) adicionado con 2% SDS por 5 h.
- E.** Buffer hipotónico suplementado (BHS) por 24 h, seguido de buffer hipotónico sin suplementar (BHSS) adicionado con 0.5% SDS por 36 h.
- F.** BHS por 24 h, seguido de BHS adicionado con 0.5% SDS por 18 h, seguido de BHSS adicionado con 0.5% SDS por 36 h.

El tejido se mantuvo en las soluciones a 37°C y agitación. Cada solución se adicionó en una proporción de 2:1 (solución:tejido; v/v). Para realizar cada cambio de solución, el tejido se centrifugó a 10000 rpm por 10 min decantando el sobrenadante. Al finalizar los tratamientos, el tejido se recuperó nuevamente por centrifugación y se colocó en un tamiz de 177 µm y se lavó con H₂O hasta quitar el detergente para su posterior recuperación por centrifugación. Finalmente, el tejido se coloca en un vaso de precipitado con H₂O (2:1; agua:tejido) y se colocó a 4°C por 6 h, se recuperó el tejido por centrifugación. La MCB se colocó en tubos de 50 ml a -80°C y se liofilizó bajo los parámetros del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL, con la supervisión de la Dra. C. Cecilia Delgado Montemayor. Finalmente, se liofilizó y se realizó la molienda para conservarse libre de humedad hasta su uso.

Para evaluar la conservación de la matriz después de los tratamientos de descelularización, las muestras se colocaron en criomoldes y se incluyeron en Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, se almacenaron a -80°C hasta realizar los cortes por congelado. Los cortes se realizaron en un criotomo, con un grosor de 5 µm en laminillas silanizadas con la colaboración del M.C. Víktor Romero. A todas las muestras se les realizaron tinciones histológicas: H&E, para evaluar de manera general la matriz; tricrómico de Masson, para evaluar las fibras de colágeno y safranina O, para evaluar la conservación de los proteoglicanos (**Anexo 2**). Adicionalmente, se evaluó la conservación de proteínas después de los tratamientos por inmunohistoquímica (**Anexo 2**), utilizando Anti-Colágeno II y Anti-agrecano (**Tabla 4**), además del control negativo sin anticuerpo primario. La densitometría de cada histología e inmunohistoquímica se analizó con el programa Image J normalizando los datos con su respectivo control negativo.



7.4.5 Producción de matriz de hueso bovino (MHB): El análisis de descelularización de la MHB y su estandarización estuvo a cargo de la M.C. Vanessa Pérez y el M.C. Alejandro García, reportado en sus tesis de Doctorado. Brevemente, a partir de las mismas rodillas bovinas empleadas en la descripción anterior, se obtuvieron chips cilíndricos de hueso subcondral utilizando un taladro tipo dremel y una trefina. Las perforaciones se realizaban adicionando agua para no quemar el hueso por la fricción, posteriormente los huesos se colocaron en PBS 1X y se procedió a la descelularización y blanqueamiento. Para empezar el proceso, los chips de hueso se colocaron en un vaso de precipitado con agua hirviendo y SDS al 0.1%, se realizaron varios cambios para permitir disgregar la grasa del hueso, posteriormente los huesos se colocaron en peróxido de hidrógeno al 30% por una hora, al finalizar, se colocaban de nuevo en 4 cambios de agua hirviendo y 0.1% de SDS por 15 min, lo anterior se realizó por 5 ciclos. Los chips de hueso se secaron a temperatura ambiente y se cortaron transversalmente utilizando el dremel, se almacenaron libres de humedad hasta su uso.

7.4.6 Fibroína de seda: Se colocó 1 ml de FS (0.05 g) en crioviales, se liofilizó y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. La FS fue disuelta al 8% con HFIP una hora antes de iniciar la construcción de los implantes bifásicos para permitir su disolución en el solvente hasta obtener una solución homogénea y translúcida.

7.4.7 Construcción de andamios bifásicos: La principal aportación de este proyecto radicaba en el diseño de un andamio bifásico, donde lograr el ensamblaje de las dos fases utilizando tres biomateriales diferentes (fibroína de seda, matriz de cartílago bovino y hueso bovino) implicaba desarrollar una metodología no descrita. Durante la estandarización de nuestra metodología nos apoyamos en publicaciones de diseños bifásicos y monofásicos que tenían como eje central la cristalización de la fibroína de seda, entre ellos, los trabajos de Chen^{79,82,200}, Li⁸³, Wang¹⁹² y Ding⁶⁷. Modificando variables como material de moldes, posicionamiento de los materiales dentro del molde, temperatura, proporciones entre los materiales, tiempo de cristalización, tamaño de partícula porógena, entre otras, logramos estandarizar nuestro proceso.

Para iniciar el proceso de construcción, los moldes de teflón deben sellarse de un extremo utilizando parafilm y cinta. Para formar la fase que simula al cartílago se utilizaron tres componentes, MCB, FS al 8% en HFIP y NaCl con un tamaño de partícula



de 77-177 μm para la formación de poros. Se probaron diferentes proporciones de NaCl:MCB como se muestran a continuación para formar una fase de aproximadamente 2-4 mm de alto y 6 mm de diámetro, para todos se utilizó 625 μl de FS 8%:

1:1 NaCl:MCB/FS. Se pesó y mezcló 0.024 g de NaCl y 0.024 g de MCB.

2:1 NaCl:MCB/FS. Se pesó y mezcló 0.032 g de NaCl y 0.016 g de MCB

3:1 NaCl:MCB/FS. Se pesó y mezcló 0.036 g de NaCl y 0.012 g de MCB

FS. Se pesó 0.09 g de NaCl.

Una vez que los moldes se encontraban listos, se adicionó la mezcla de MCB y/o NaCl en el fondo del molde con ayuda de un embudo pequeño, se compactó la mezcla utilizando un émbolo de jeringa. Se colocó la fibroína de seda al 8% dentro del molde, y se tapó el molde con una varilla de vidrio recubierta con palafilm para evitar que el solvente se evaporara, se dejó reposar por 2 min. Se colocó el chip de MHB hasta el fondo del molde realizando una presión moderada (los chips de MHB fueron previamente sumergidos en metanol 90% por 5 min, retirando el exceso de metanol con Kimwipes). Se adicionó metanol 90% al molde y se tapó con una varilla de vidrio. Se dejó reposar un día para permitir la cristalización de la FS, se destapó y se ventiló por 2 días para permitir la evaporación de los solventes. Se sacaron suavemente los implantes con ayuda de un émbolo y se sumergieron en metanol 90% por 1 h para una segunda cristalización. Se lavaron los implantes con H_2O a 37°C para permitir la disolución del NaCl durante tres días realizando cambios constantes de agua. Finalmente, los andamios son congelados en tubos de 50 ml a -80°C y liofilizados, para posteriormente esterilizarse con óxido de etileno bajo los parámetros de Banco de Hueso y Tejidos del HU (Figura 7).

Para todos los grupos se analizó el comportamiento elástico mediante la evaluación del módulo de Young. Este análisis estuvo a cargo de la M.C. Vanessa Pérez y los resultados se encuentran reportados en su tesis de Doctorado.

7.4.8 Extracción de suero humano: Se extrajo sangre de donadores sanos y en ayunas, aproximadamente 400 ml utilizando tubos vacutainer de 10 ml. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 20 min para separar el suero, el suero fue recuperado por decantación o con una pipeta de 10 ml. El suero fue filtrado con una unidad de filtración



de 0.22 μm y se almacenó en tubos de 15 ml a -20°C hasta su uso. Todo se trabajó bajo esterilidad.

7.4.9 Caracterización morfológica y microporosa del andamio por micro-CT: Para el análisis de la porosidad y distribución de los tamaños de poro, se separaron las dos fases del andamio, mientras que para obtener la reconstrucción 3D del andamio bifásico, las fases no se separaron. Para ambos casos, solo la fase de MCB/FS se puso en contacto con una solución de lugol 10% por cuatro días para mejorar su contraste, por el contrario, en el andamio bifásico, la MHB fue cubierta con parafilm y no se expuso directamente a la solución de lugol para evitar aumentar su radiopacidad. Los andamios se inmovilizaron en un tubo de esponja de poliestireno. La morfología del andamio, la porosidad, la distribución del tamaño de los poros y la conectividad se analizaron con un tamaño de vóxel de 9 μm ($n=3$). Los gradientes de porosidad se analizaron dividiendo cada fase de MCB/FS en tres partes a lo largo del eje Z.

7.4.10 Capacidad de adhesión de las hADSCs en los implantes evaluada por MEB: Se utilizaron implantes bifásicos sin células para observar la estructura del andamio e implantes monofásicos cultivados con hADSCs en DMEM al día 7 para observar la adhesión celular. Los implantes fueron cortados longitudinalmente para su posterior procesamiento, los grupos analizados fueron 1:1, 2:1, 3:1, FS y MHB.

Los andamios fueron fijados en una solución de glutaraldehído 2.5% (grado microscopia electrónica de barrido) en buffer de cacodilato (**Anexo 1**) por 2 días, se lavaron con buffer de cacodilato y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Posteriormente se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio 1% por 1 h en campana de humos. Las muestras se deshidrataron con dos cambios de acetonas en las siguientes concentraciones: 35, 50, 70, 96 y 100% por 10 min cada uno, finalmente se llevaron a punto crítico utilizando CO_2 y se recubrieron con oro, utilizando un espesor de 15 nm. Las muestras se conservaron en cámaras de vacío hasta su observación para evitar la humedad. El protocolo anterior se llevó a cabo bajo los lineamientos del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UANL, con colaboración de la Química Catalina Cortés. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido en el Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica (CIIIA, UANL) bajo la supervisión de la Dra. C. María Lara Banda.



7.4.11 Capacidad proliferativa de las hADSCs en los implantes: Los grupos de andamios utilizados para este estudio fueron 1:1, 2:1, 3:1, FS y MHB. Para el cultivo, la bolsa que contenía los andamios previamente esterilizados con óxido de etileno, fue radiada por 30 min con luz UV, se hidrataron en PBS 1X con 1% gentamicina y 1% antibiótico-antimicótico por dos días. Utilizando pinzas estériles se separaron las dos fases del implante y se colocaron en DMEM alto en glucosa con 10% de suero humano y 1% de antibiótico-antimicótico por un día en placas de 96 pozos no tratadas.

Para el cultivo sin diferenciar, se utilizaron hADSCs en tercer pasaje a un 80% de confluencia (n=3), las células se levantaron de la placa de cultivo con tripsina 1X, se inactivó la tripsina con un volumen igual de DMEM con 10% suero humano, se formó el pellet por centrifugación (1600 rpm por 6 min), se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de DMEM para su conteo, posteriormente las células se centrifugaron y se resuspendió en el volumen necesario para obtener 4×10^5 células/fase contenidas en 25 μ l de medio. Los 25 μ l se colocaron en un tubo eppendorf de 200 μ l y se tomaron con una jeringa de insulina de 1 ml para inyectarlas en la fase condral (MCB/FS) mediante varias punciones, la fase de MHB se sembró por gravedad. Los implantes se dejaron sin medio durante 3 horas, posteriormente se colocaron 200 μ l de DMEM alto en glucosa con 10% de suero humano, 1% de antibiótico-antimicótico durante un día. Los implantes fueron transferidos a una placa de 48 pozos sin tratar para iniciar el ensayo de proliferación. El medio fue cambiado cada 2 días.

Brevemente, al día 1 los andamios fueron lavados suavemente con PBS 1X, se adicionó 500 μ l de DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de azul Alamar, 1% de antibiótico (sin suero y preparado al momento) y se incubó durante 6 h a 37°C, 5% de CO₂ protegido de la luz. Posteriormente se transfieren 200 μ l de este medio a una placa oscura para leer la fluorescencia en un espectrofluorómetro de placas utilizando el filtro de emisión de 580-640 nm y un filtro de excitación verde de 520 nm a los días 1, 4, 6, 8 y 15. Para cada nueva lectura los andamios eran cambiados a un pozo nuevo para evitar que las células pegadas a la placa interfirieran con la lectura. Se incluyó un grupo control de los andamios (sin células) bajo las mismas condiciones para normalizar los datos.

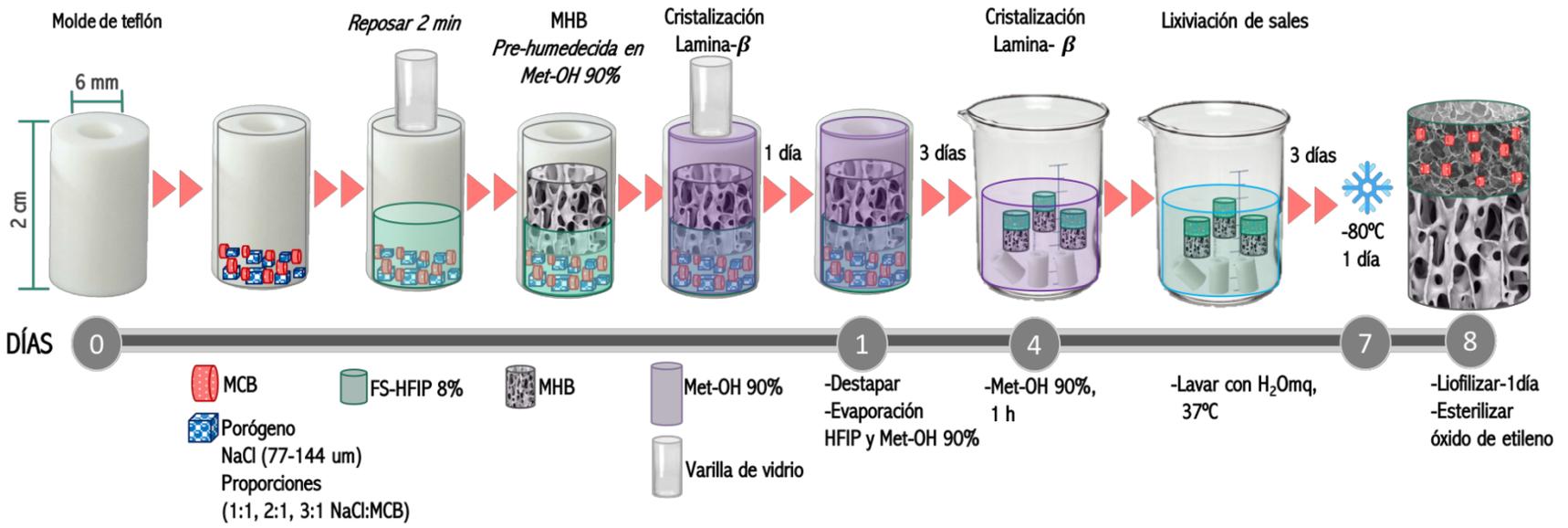


Figura 7. Metodología para la construcción de andamios bifásicos.



7.4.12 Evaluación histológica de la matriz neoformada en los andamios: Para evaluar las características histológicas de la matriz secretada por las células dentro de los implantes se trabajó con los grupos en monocapa, 1:1, 2:1, 3:1 donde se cultivaron hADSCs por 14 días como se describió anteriormente y hADSCs prediferenciadas 5 días en monocapa al linaje condrogénico para su posterior siembra en el andamio como se describió anteriormente. El medio era cambiado cada 2 días (n=3).

Concluidos los 14 días de cultivo dentro del andamio, éstos fueron fijados con formalina 4% por 2 días para su posterior inclusión en parafina y ensayo de inmunohistoquímica anti-COL I, anti-COL II y anti-AGC a una dilución 1:100. Se realizaron tinciones histológicas de H&E para observar su morfología y tricrómico de Masson para observar las fibras de colágeno (**Anexo 2**). El análisis densitométrico de la inmunotinción se llevó a cabo utilizando el programa Image J, utilizando el control negativo para normalizar los datos.

Para la evaluación histológica del andamio bifásico se trabajó únicamente con el grupo 1:1 comparando el cultivo en DMEM contra el cultivo en medio condrogénico (n=3). De igual forma, se cultivaron hADSCs por 14 días en el andamio (cambio de medio cada 2 días), ya sea con DMEM o medio condrogénico (pre-diferenciación de 5 días en monocapa), sembrando solo la fase de cartílago como se describió anteriormente. Para ambos grupos se realizaron tinciones de H&E para observar su morfología, tricrómico de Masson y rojo de picrosirio para observar las fibras de colágeno, azul de toluidina para los mucopolisacáridos y safranina O para observar los proteoglicanos (**Anexo 2**).

Todos los cortes se realizaron en micrótopo, utilizando portaobjetos silanizados. Los cortes histológicos estuvieron a cargo del Técnico Histopatólogo Martín García.

7.4.13 Influencia del microambiente sobre la expresión génica: Para este ensayo se trabajó únicamente con el grupo 1:1 tanto en monofase como bifásico, cultivados con DMEM y/o medio condrogénico. La siembra y el cultivo fueron realizados como se describió anteriormente. La extracción del RNA para todos los grupos experimentales se realizó únicamente en la fase que simula al cartílago (MCB/FS), siguiendo el método de TRIzol utilizando un disgregador de tejidos TissueRuptor (**Anexo 2**) (n=3). El RNA



aislado se resuspendió en 30 μ l de H₂O DEPC, se cuantificó en NanoDrop y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Se sintetizaron 1500 ng/20 μ l de cDNA por muestra, utilizando random primers y siguiendo el protocolo del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. La qPCR se realizó con 50 ng de cDNA por reacción, 500 nM de primers gen-específico para *COL I*, *COLII* y *COLX*, *PA*, *SOX-9*, *AGC* y *RUNX2*, utilizando los primers que fueron diseñados por M.C. Alejandro García Ruíz para su tesis de doctorado (**Tabla 5**). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l utilizando el kit PowerUp SYBR Green Master Mix. El programa de amplificación fue el siguiente: activación UDG 50°C por 2 min, Dual-Lock DNA polimerasa 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización 95°C por 15 s, alineamiento/elongación 60°C por 1 min. Al finalizar los ciclos se corrió el análisis de melt-curve para verificar la especificidad de la reacción. El análisis se realizó por el método Δ Ct.

Tabla 5. Secuencia de los primers utilizados para qRT-PCR

Primer	Forward	Reverse
SOX-9	5' AACGGCTCCAGCAAGAACAAG 3'	5'GCTCCGCCTCCTCCACGAAG 3'
COLÁGENO 1A2	5'TAGAAAGAACCCAGCTCGCACA 3'	5'GGTTTCGCCAGTAGAGAAATCACA 3'
COLÁGENO 2A1	5'TCATCCAGGGCTCCAATGACGTG 3'	5'AACAGTCTTGCCCCACTTACCG 3'
AGRECANO	5'CAACAATGCCCAAGACTACCAG 3'	5'TTCCACTCGCCCTTCTCGTG 3'
FOSFATASA ALCALINA	5'CGGCCTGGACCTCGTTGACA 3'	5'ACGTTGTTCTGTTGTTGAGCTCGTA 3'
COLÁGENO 10A1	5'CAGGAACTCCAGCACGCAGA 3'	5'CAGCGTAAACACTCCATGAACCA 3'
RUNX2	5'GAACTCGTCCGCACCGACAG 3'	5'ATCGTTACCCGCCATGACAGT 3'
RPL13A	5'CGAGGCCCTACCACTTCC 3'	5'GCTTCAGACGCACGACCTTG 3'

7.4.14 Análisis estadístico: Los datos fueron analizados con el programa Prism 7. Para la evaluación de la descelularización y conservación de la matriz, se realizó una prueba t-Student. Para el ensayo de densitometría para evaluar la matriz neoformada, ensayo de porosidad en el eje Z y proliferación, se utilizó un ANOVA de dos vías con una prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Para el ensayo del número de poros, porosidad total y expresión génica, se realizó un ANOVA de una vía con una prueba de Tukey de comparaciones múltiples. Los datos se representan como el promedio \pm error estándar, considerando con significancia estadística una $p < 0.05$.



CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

8.1 Aislamiento, cultivo, inmunofenotipo y capacidad multilínea de las hADSC en medio xeno-free.

Los resultados demuestran que el aislado inicial presentó un aspecto macroscópico heterogéneo, debido a la presencia de células de morfología diversa y a la presencia de eritrocitos, no obstante, tras el subcultivo y los cambios de medio pertinentes, el cultivo fue tomando un perfil morfológico más homogéneo. Se consideró como primera línea de selección a aquella población celular con la capacidad de adherirse a la caja de cultivo posterior al subcultivo, esto para descartar células no mesenquimales que tienden a adherirse de manera más temprana. Las células adherentes cultivadas con suero humano mostraron un buen crecimiento en monocapa, una morfología fusiforme, estrellada y fibroblástica (**Figura 8**), los cuales son aspectos característicos de las MSCs.

Para evaluar el perfil mesenquimal de las células en cultivo, durante el tercer pasaje se analizó la expresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD90, CD105 y CD44; así como la ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD14 y CD45; adicionalmente se evidenció la positividad para el sistema de histocompatibilidad HLA-ABC y la carencia del HLA-DR (**Figura 9B**). La **figura 9A** muestra los porcentajes de expresión para los marcadores mesenquimales analizados, en general, se observa una expresión positiva que osciló entre el 96 y 98%.

Además de la caracterización inmunofenotípica mesenquimal, se probó la multipotencialidad de las hADSCs realizando diferenciaciones al linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. En la **figura 10** se pueden observar las microfotografías y capturas macroscópicas de la diferenciación celular.

Es notorio que tanto para el día 7 como para el día 14 hay cambios morfológicos de las células diferenciadas contra las no diferenciadas. Para la diferenciación adipogénica se observan gotas lipídicas, teñidas con rojo oleoso, confirmando el fenotipo adiposo derivado de la diferenciación adipogénica. Respecto a la diferenciación osteogénica las células mostraron cambios morfológicos, pasando de una configuración alargada a una



poligonal, consistente de una morfología osteoblástica. Desde el día 7 se observó una gran cantidad de nódulos de calcio en color rojo, teñidos por rojo de Alizarina, indicando el inicio de la calcificación de la matriz. La diferenciación condrogénica se indujo mediante la técnica de cultivo de micromasa, donde el cultivo de micromasa de alta densidad asegura una condensación efectiva de las células, considerada como una etapa crítica en el inicio de la diferenciación condrogénica.²¹⁸ El cultivo en micromasa de las hADSCs dio como resultado la formación de agregados celulares densos con morfología redondeada, teñidos con azul de Alcian, correspondientes a mucopolisacáridos característicos del fenotipo condrogénico.

El perfil de expresión del inmunofenotipo, por citometría de flujo, además de la capacidad de multipotencia, es típico de las MSCs. Lo anterior cumple con los lineamientos establecidos por la ISCT (International Society for Cellular Therapy) y la IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science) para su uso en terapia celular, por lo tanto, los resultados demuestran el aislamiento exitoso de las hADSCs libres de componentes de origen animal (xeno-free).

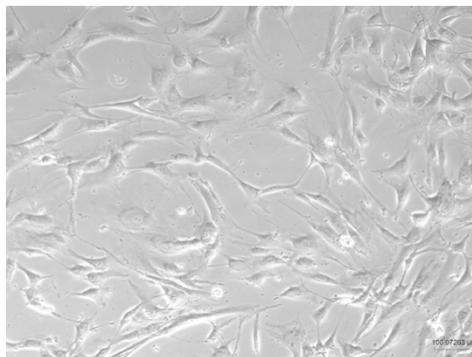


Figura 8. Fenotipo de las hADSCs aisladas y cultivadas en medio xeno-free. Cultivo en monocapa de hADSCs en el tercer pasaje mostraron un fenotipo fusiforme. Barra de escala: 100 μ m

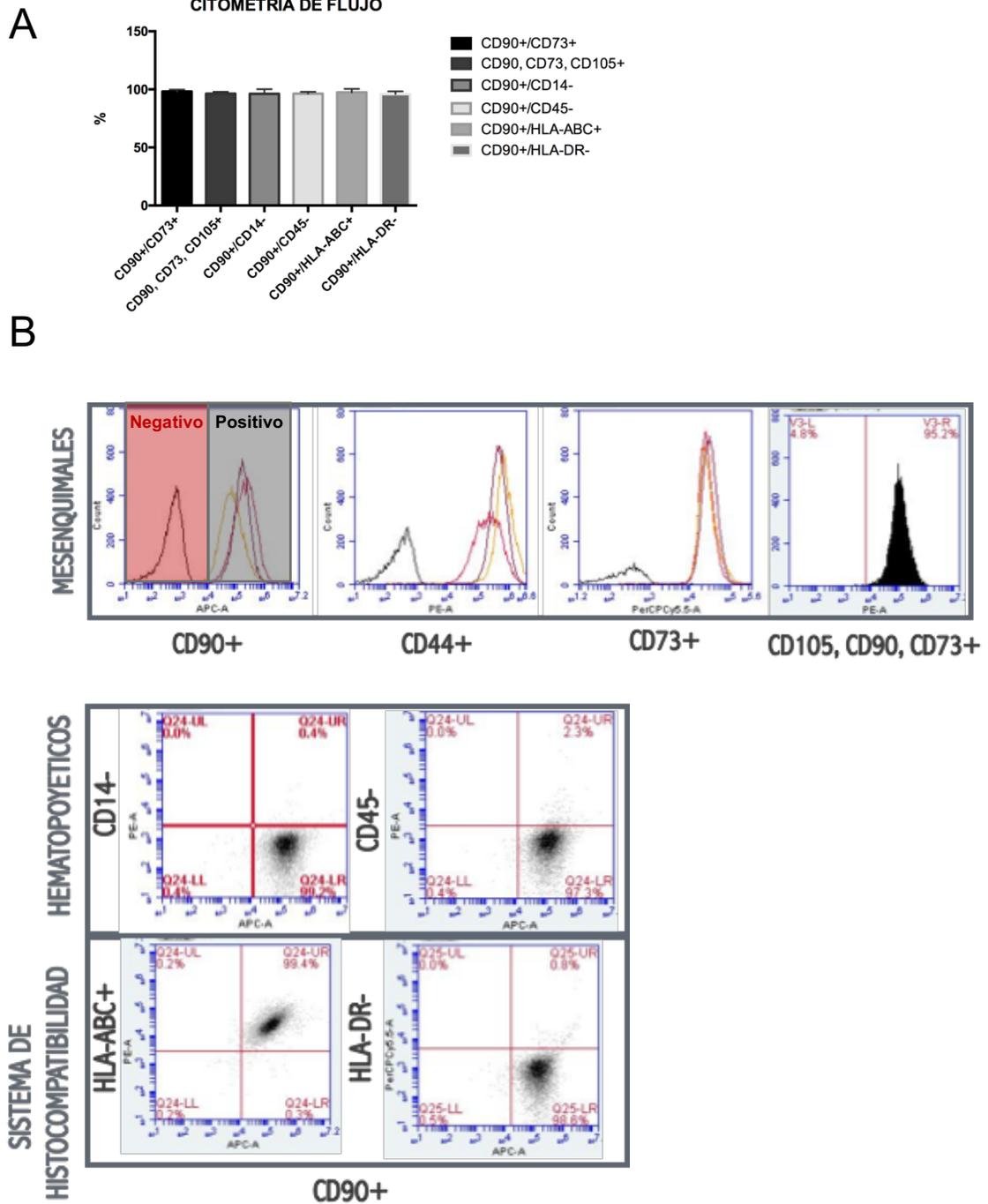


Figura 9. Inmunofenotipificación de las hADSCs por citometría de flujo. A. Inmunofenotipo por citometría de flujo de las hADSCs en tercer pasaje, positivas para marcadores mesenquimales y HLA-ABC; negativas para marcadores hematopoyéticos y HLA-DR. **B.** Histograma de expresión positiva para los marcadores mesenquimales, dot plot positivo para HLA-ABC, dot plot negativos para marcadores hematopoyéticos y el sistema de histocompatibilidad HLA-DR. (n=3)

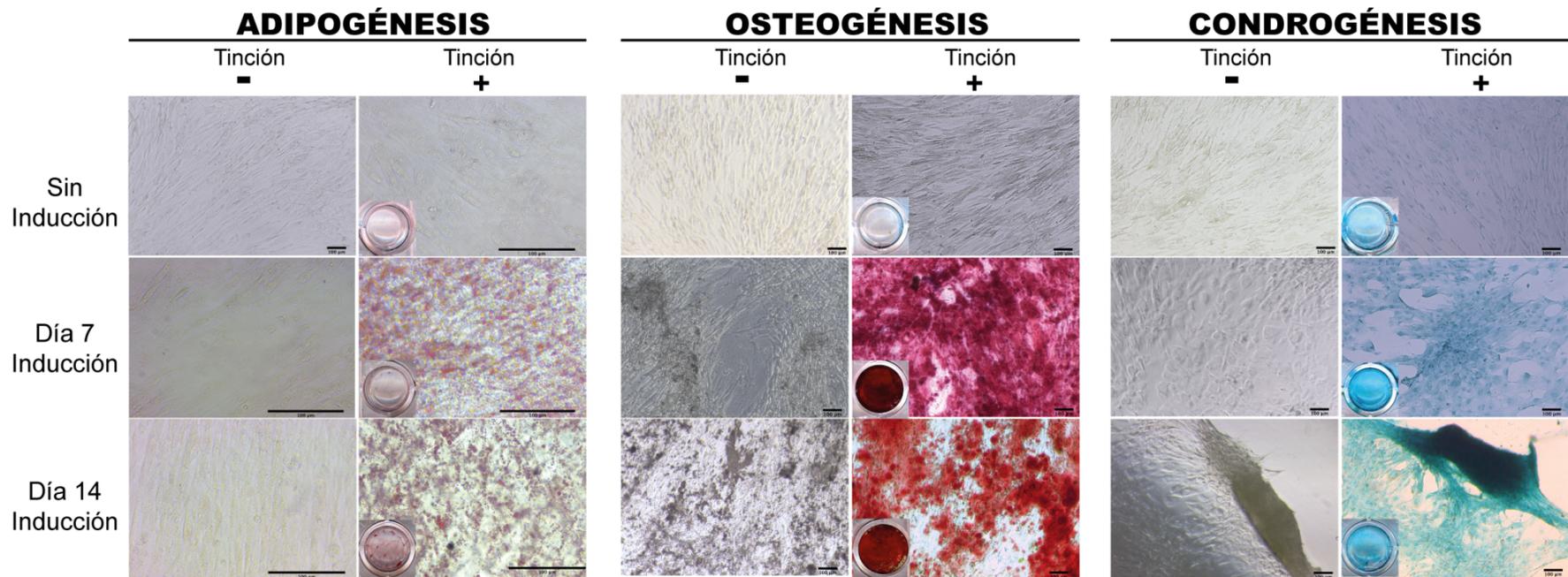


Figura 10. Capacidad de multipotencia de las hADSCs. Diferenciación adipogénica mediada por IBMX con tinción positiva de micelas con rojo oleoso. Diferenciación osteogénica mediada por dexametasona donde se observa en rojo los depósitos de calcio con tinción rojo de alizarina. Diferenciación condrogénica mediada por TGF- β 1 con tinción de azul de Alcian para los mucopolisacáridos. Barra de escala: 100 μ m. (n=3)



8.2 Producción y descelularización de la MCB

La selección de matriz de cartílago bovino como biomaterial para el diseño del andamio bifásico se conceptualizó desde el punto de vista de la disponibilidad, bajo costo, fácil accesibilidad, alto rendimiento y bioactividad. Por lo tanto, como fuente de cartílago se utilizó la rodilla de bovino, ya que es un material rico en fibras de colágeno y proteoglicanos, componentes que pueden ser reconocidos por las células para su adhesión y crecimiento.²¹⁹ El primer paso para la utilización del cartílago bovino fue minimizar la presencia del componente celular sin comprometer la matriz extracelular de cartílago, para ello se trató el biomaterial por métodos fisicoquímicos, ensayando tiempos, concentraciones y soluciones en el proceso, con la finalidad de elegir el más conveniente.

La **figura 11** muestra las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas de la MCB después de los tratamientos de descelularización. En el grupo control que sólo fue sometido a los ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido, se puede observar una matriz extracelular prácticamente intacta, con grupos isógenos y lagunas de condrocitos (flecha negra); además una tinción fuertemente positiva para tricrómico de Masson, donde se observan conservadas las fibras de colágeno en color azul; mediante la tinción con Safranina O, observamos la presencia de proteoglicanos en rojo; y en las inmunohistoquímicas se muestra en color marrón la presencia de las proteínas agregano y colágeno tipo II. En contraste, cuando la concentración de SDS utilizada era del 2% y 4% (A-C), la matriz de cartílago se vio comprometida en mayor proporción, incluso en el grupo A donde la exposición al detergente tuvo menor duración; esto con base en el análisis densitométrico de la tinción con tricrómico de Masson (**Figura 12B**). Como consecuencia, los tres grupos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a la conservación de la matriz en comparación con el control. En cambio, los grupos donde se utilizaron buffers hipotónicos (D-F), se observa la tendencia hacia una mayor conservación de la matriz cuando la concentración de SDS es menor (0.5%); de igual manera, los tres grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, con excepción del grupo F para la tinción de tricrómico de Masson. Esto nos indica que el tratamiento aplicado en el grupo F conserva mejor las fibras de colágeno. A pesar de la similitud metodológica entre los grupos E y F; el análisis densitométrico muestra que agregando un paso de 18 h con SDS 0.5% en buffer



hipotónico suplementado, permite una mayor conservación del agregado en el grupo F respecto al grupo E.

Cuando centramos el análisis en el porcentaje de descelularización; observamos que como se muestra en la **figura 12A**, todos los grupos poseen una diferencia estadísticamente significativa respecto al control, siendo el grupo F el que muestra un porcentaje más alto de lagunas vacías. Por lo tanto, por poseer una mejor conservación de la matriz, además de un mayor porcentaje de descelularización; se estableció utilizar la metodología del grupo F para tratar el cartílago a usar en la construcción del implante en los estudios posteriores.

A partir del cartílago de 15 rodillas se logró obtener 19.5 g en peso seco de MCB, suficiente para realizar aproximadamente 800 andamios. El tamaño de partícula después de la molienda osciló en un rango de 60 a 1500 μm (**Figura 12C**).

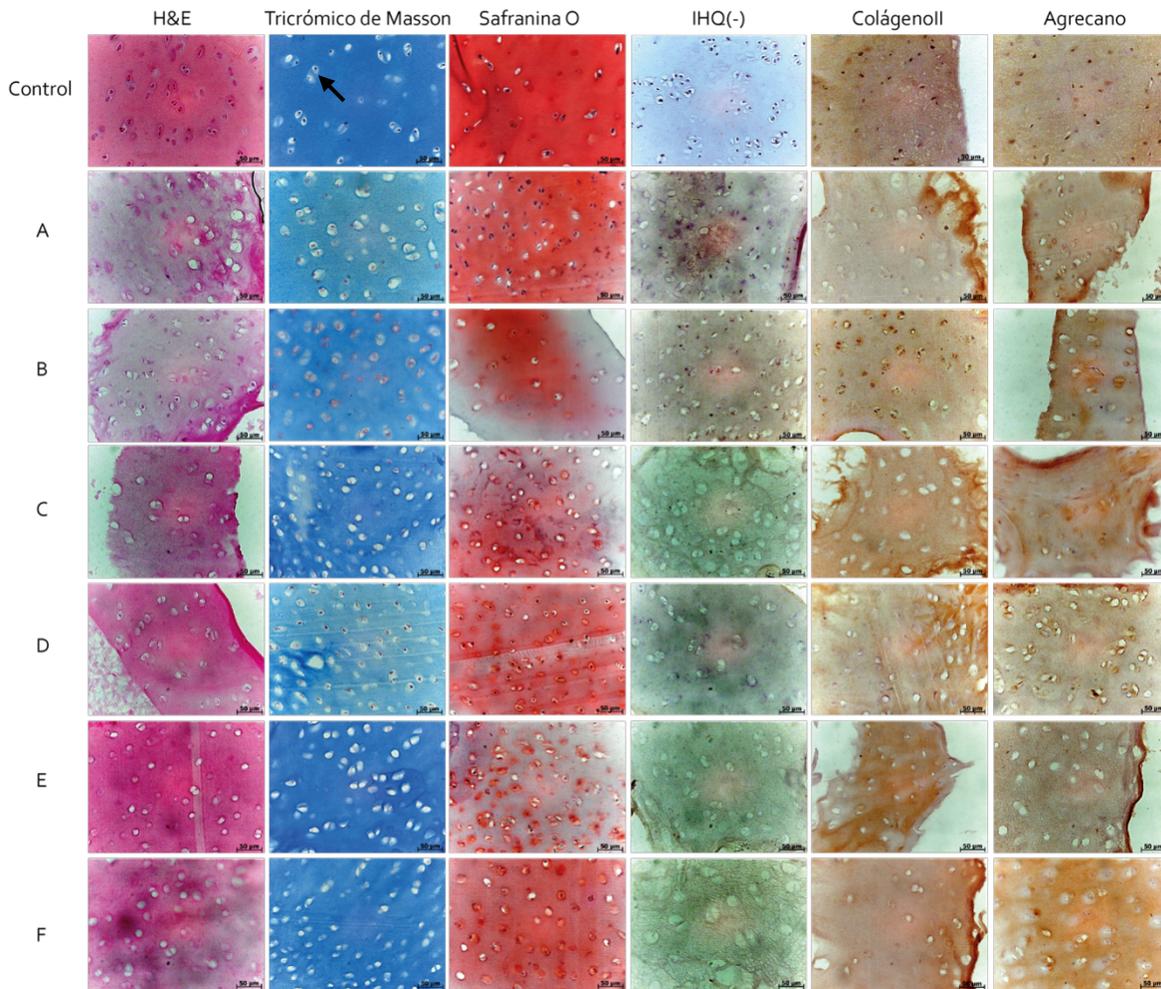


Figura 11. Matriz de cartilago bovino descelularizada. Control. Sin tratamiento con detergentes, solo ciclos de congelación en nitrógeno líquido, flecha negra muestra grupos isógenos. **A.** 9 h en SDS2%; **B.** 5h en SDS 2%, seguido de 3h en SDS 4%; **C.** 8h SDS 2%, seguido de 3h SDS 4%; **D.** 24h en Buffer hipotónico (Tris-HCl y EDTA) suplementado con KCl y MgCl₂ (BHS), seguido de 5h en buffer hipotónico sin suplementar (BHSS); **E.** 24h en BHS, seguido de 36h en BHSS adicionado con 0.5% de SDS; **F.** 24h en BHS, seguido de 18h en BHS adicionado con 0.5% de SDS y 36h en BHSS adicionado con 0.5% de SDS. Tinción de tricrómico de Masson para identificar fibras de colágeno, safranina O para GAGs, H&E para estructura general. Inmunohistoquímicas para detectar colágeno I y agrecano. Barra de escala = 50 µm

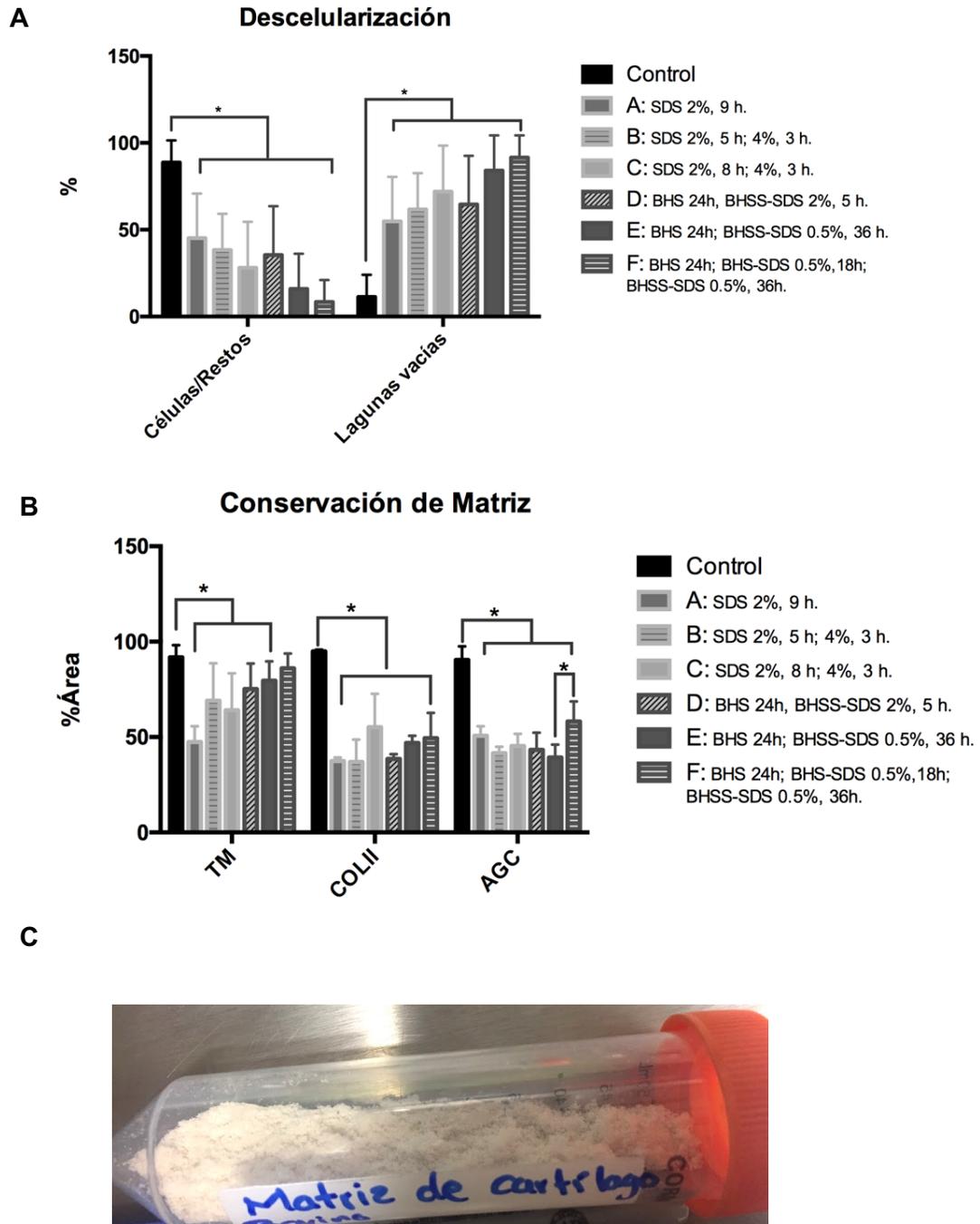


Figura 12. Análisis de la MCB descelularizada. **A.** Porcentaje de lagunas vacías y células íntegras y/o restos celulares después de los tratamientos de descelularización. **B.** Porcentaje de conservación de la MEC después de los tratamientos de descelularización mediante evaluación densitométrica de la tinción con tricrómico de Masson (TM), IHQ para colágeno II (COL II) y agregano (AGC). **C.** Aspecto de la matriz de cartilago bovino descelularizada con el tratamiento "F" luego de la molienda. \pm Error estándar de la media. Significancia estadística $p < 0.05$.



8.3 Producción y descelularización de la matriz de hueso bovino.

Bajo los mismos parámetros de selección utilizados para el cartílago bovino, se consideró al hueso bovino como biomaterial para el diseño del andamio bifásico, con la finalidad de aprovechar los componentes propios del tejido además de ser un material económico de fácil acceso, alto rendimiento y bioactivo.

Para disminuir el componente celular del hueso, en un inicio se utilizó una solución de dextran 1% donde se colocaban los huesos a ebullición durante 1 h para un posterior tratamiento con peróxido de hidrógeno durante 1 noche, realizando lo anterior por 3 ciclos. A pesar de que se eliminó el componente celular (**Figura 13-B3**), los chips de hueso se mostraban frágiles e incapaces de soportar el crecimiento de las células resembradas. Por ello, en colaboración con el M.C. Alejandro García y la M.C. Vanessa Pérez, la técnica fue estandarizada de la siguiente manera; los chips de hueso son hervidos en 0.1% SDS seguido de 1 h en peróxido de hidrógeno 30% repitiendo este ciclo 4 veces más. Mediante esta metodología se observó una adecuada descelularización, conservación de la matriz y mantenimiento del crecimiento celular (resultados mostrados en sus tesis de doctorado). La **figura 12-B1 y 12-B2** muestra una imagen macroscópica de los chips de hueso después del tratamiento estandarizado, donde se puede apreciar la estructura porosa del hueso.

Considerando lo anterior, se decidió trabajar con esta metodología para la descelularización de los chips de hueso que serían usados en la construcción del andamio bifásico.

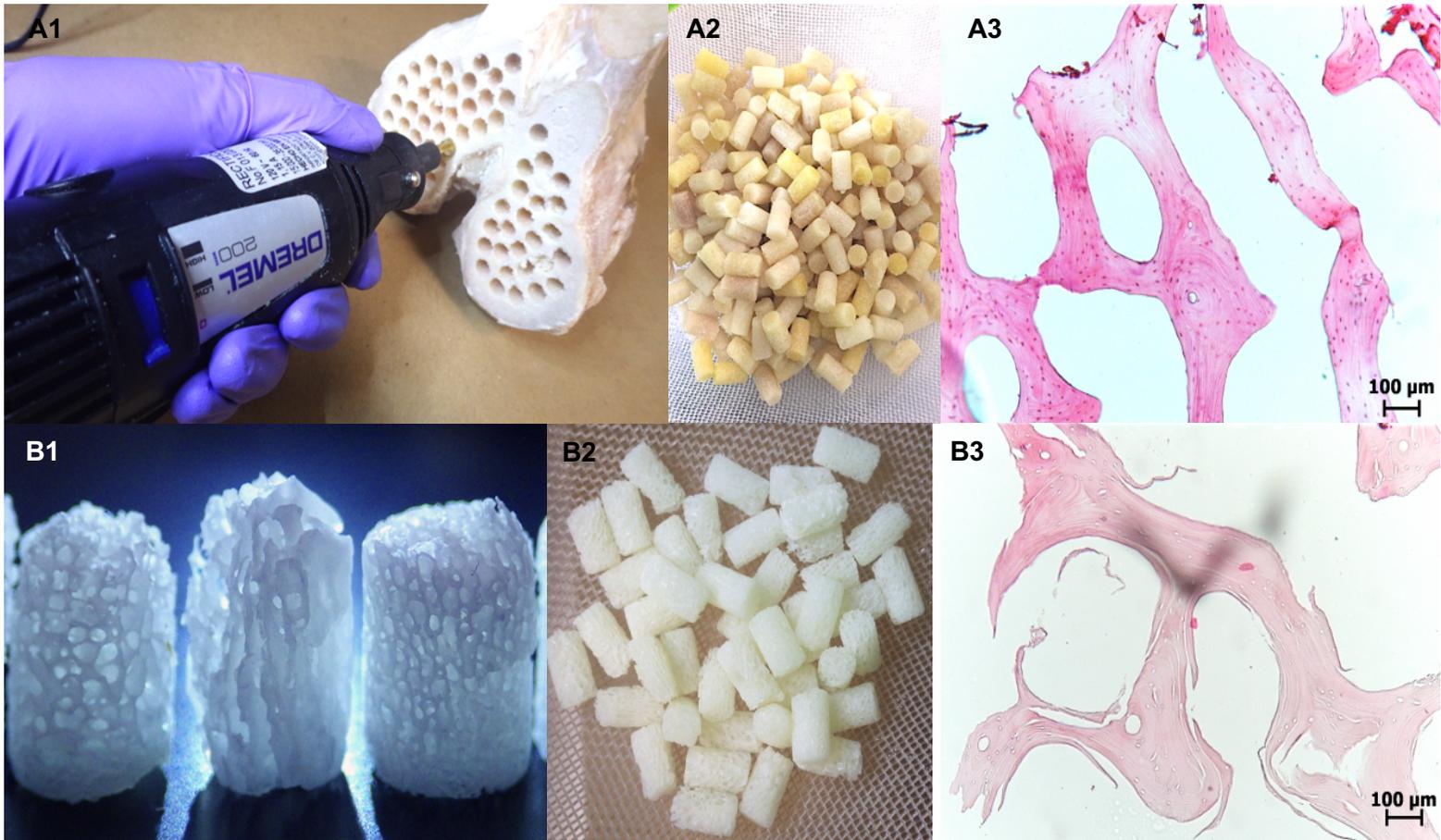


Figura 13. Procesamiento de la MHB. **A1.** Obtención de los chips de hueso bovino con taladro DREMEL. **A2.** Imagen macroscópica de los huesos antes del tratamiento de blanqueamiento; **A3.** Tinción H&E del control de hueso sin blanquear donde se observan los nucleos en morado; **B1, B2.** Imagen macroscópica de la MHB después del blanqueamientos; **B3.** Tinción H&E de la MHB descelerizada donde se observa la ausencia de nucleos. Barra de escala = 100 μm



8.4 Construcción de los implantes bifásicos y análisis de su microestructura, capacidad para favorecer la adhesión y la proliferación celular.

Como remarcamos en la metodología, el diseño de este implante bifásico es completamente inédito, por lo que para lograr la integración de sus fases se diseñó un método que fuera reproducible, sencillo y económico. Apoyados en la literatura, la estrategia final para la construcción y ensamblaje del andamio se basó en lograr la cristalización de la FS. La metodología diseñada para el ensamblaje del andamio se basó en lograr la cristalización de la FS utilizando metanol al 90% como agente cristalizador. De manera general, se utilizaron moldes de teflón donde se colocaba la mezcla de las diferentes proporciones (1:1, 2:1 o 3:1) de NaCl:MCB (**Figura 14**) para posteriormente agregar FS al 8% diluida con HFIP y la MHB, utilizando metanol 90% para su cristalización y consecuente ensamblaje; finalmente se eliminaron los solventes por evaporación y las partículas de sal por lixiviación, esterilizando el andamio con óxido de etileno. Los grupos analizados en las siguientes secciones corresponden a las diferentes proporciones de NaCl y MCB que se utilizaron para el ensamblaje (1:1, 2:1 y 3:1 NaCl:MCB), además de un grupo con solamente FS.

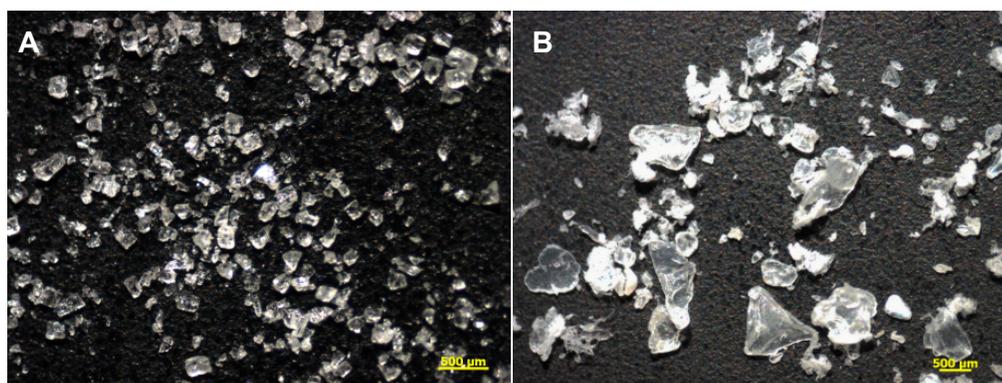


Figura 14. Partículas de NaCl y MCB observadas con estereomicroscopio. A. Partículas de sal utilizadas, de 77-144 µm. **B.** Partículas de MCB descelularizadas, de 60-1500 µm. Barra de escala = 500 µm.

Una vez que se logró el ensamblaje de las dos fases, se procedió a la caracterización morfológica de cada uno de los grupos de andamios generados. Los análisis se realizaron en cada fase, las cuales fueron separadas después del ensamblaje. La ultraestructura fue revelada por MEB y micro-CT, mientras que los parámetros como la porosidad, el tamaño promedio de los poros y la distribución del tamaño del poro, fueron



calculados con base en las mediciones de micro-CT. La **figura 15 del 1-4A**, muestra una panorámica de los diferentes grupos de los andamios bifásicos, en donde la fase que simula al cartílago es señalada con una flecha verde, y la que simula al hueso está indicada con una flecha amarilla; es notoria la diferencia en la estructura porosa entre ambas fases, donde a simple vista se observan poros más pequeños para la fase que simula al cartílago en comparación con la fase que simula al hueso. En un acercamiento del 20x y 40x en la interfase entre los dos materiales, se puede apreciar en todos los grupos que las fases se encuentran integradas en una transición gradual proporcionada por la FS que penetra a través de los poros del hueso. Esta observación fue confirmada por micro-CT específicamente para el grupo 1:1 mediante la reconstrucción 3D del andamio bifásico, donde se puede observar en azul la presencia de FS penetrando los poros del hueso (color blanco) (**Figura 17**).

En la **figura 15** se muestra el aumento 200x, que corresponde a un acercamiento de la estructura que simula al cartílago. Cabe señalar que resulta evidente que la presencia de la MCB en los grupos 1:1, 2:1 y 3:1 (**Figura 15**) modifica la topografía del poro, tornándola rugosa en comparación con el grupo de FS que carece de MCB, donde se observan poros con una superficie lisa.

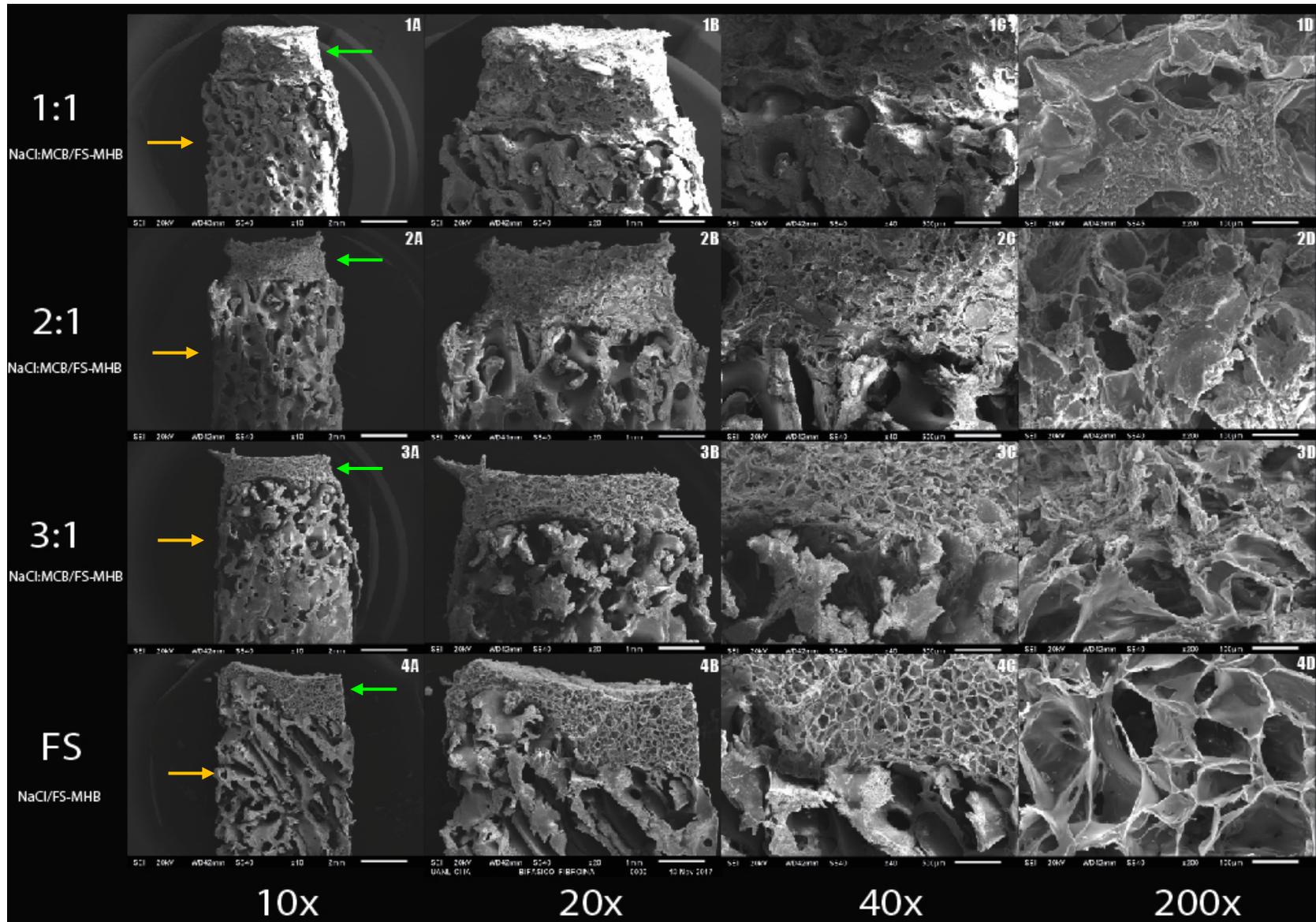


Figura 15. Microestructura de los andamios bifásicos analizada por microscopía electrónica de barrido. Se observa la estructura porosa de los andamios en cada una de sus partes. Las flechas verdes muestran la fase que simula al cartílago, mientras que las amarillas la fase que simula al hueso. Las figuras en 20-40X muestran un aumento en la interfase entre el “cartílago” y el “hueso”. El aumento en 200X muestra la fase que simula al cartílago con su estructura microporosa.



Es de importancia analizar la porosidad del andamio y la distribución del tamaño del poro para correlacionar estas características físicas con sus propiedades biológicas, como degradabilidad, capacidad del andamio de soportar el crecimiento y diferenciación celular. La porosidad es la relación entre el volumen vacío y el volumen total de la muestra analizada, poseer alta porosidad o poros pequeños se relaciona con una lenta degradación del material; por otra parte, la presencia de microporos favorece la adhesión celular, mientras que los macroporos favorecen la migración y proliferación. Los resultados de estos análisis por micro-CT se muestran en la **figura 16** y un resumen en la **tabla 6**.

Tabla 6. Análisis morfométrico de los andamios monofásicos por micro-CT

Monofase	Porosidad total	Número de poros	Poros <70 μm	Poros 71-200 μm	Poro 201-500 μm	Poros >500 μm
1:1 NaCl:MCB/FS	74.60%	415.5	1.38%	20.33%	46.78%	31.49%
2:1 NaCl:MCB/FS	67.04%	410	2.84%	22.63%	30.78%	43.74%
3:1 NaCl:MCB/FS	78.26%	394	1.28%	19.74%	33.61%	45.35%
FS	63.05%	1285.67	13.88%	49.60%	32.25%	4.26%
MHB	75.63%	59	0.193%	2.87%	26.82%	70.10%

Respecto a la porosidad total obtenida para cada fase del andamio, la intención era obtener una porosidad entre el 60 y 80%, ya que es el rango de porosidad reportada dentro del tejido osteocondral.⁹ Podemos observar que para todos los grupos se tiene un rango de porosidad entre el 63.05% y 78.26%. Debido a que el tamaño de partícula porógena utilizada está relacionada con favorecer la condrogénesis, buscábamos conservar el perfil morfométrico que muestra el grupo FS, donde dicho grupo solo contiene la partícula porógena. Se esperaba que para los grupos 1:1, 2:1 y 3:1 aumentara gradualmente la porosidad a mayor contenido de partícula porógena utilizada, sin embargo, no se observó esta tendencia; aún así, de estos tres, el grupo 3:1 donde se utilizó mayor cantidad de partícula porógena, fue el que obtuvo un mayor porcentaje de porosidad. Adicionalmente se observó que la adición de MCB aumenta la porosidad de los grupos 1:1, 2:1 y 3:1 respecto al de FS que no contiene MCB, aún y cuando se utilizó menor cantidad de partícula porógena. A pesar de las diferencias en las proporciones de partícula porógena utilizada para los grupos que contenían MCB, estos no mostraron diferencias significativas entre ellos, solo contra el grupo FS. La correlación con la cantidad de partícula porógena empleada se observa en la cuantificación del número de poros, donde a mayor cantidad de sal mayor número de poros, así, la FS contiene más poros que los grupos 1:1, 2:1 y 3:1.



Para el análisis de la distribución del tamaño, los resultados del análisis se dividieron en los siguientes tamaños: microporos $<70 \mu\text{m}$, relacionados a promover la adhesión celular; $71-200 \mu\text{m}$, rango donde se encuentra nuestra partícula porógena relacionada a promover la condrogénesis; $201-500 \mu\text{m}$, tamaño de partícula relacionado de igual manera con la regeneración del cartílago y con mejorar la proliferación y migración celular; y $>500 \mu\text{m}$ relacionado con promover la osteogénesis. Como se mencionó anteriormente, nos interesaba conservar el perfil mostrado por el grupo FS, que al contener solo la partícula porógena más la fibroína de seda, era el que conservaba en mayor porcentaje el tamaño de poro deseado. A pesar de que el grupo 2:1 conservaba en mayor porcentaje la partícula porógena, también mostraba valores más altos de poros $>500 \mu\text{m}$; condición que se relaciona con favorecer la osteogénesis en vez de la condrogénesis. Debido a estos resultados en conjunto, se concluyó que la proporción 1:1 conserva el perfil de porosidad deseado que se relaciona con favorecer la condrogénesis.

El promedio de los porcentajes de porosidad en el eje “Z” en cada grupo, muestra que el grupo con mayor variabilidad entre sus zonas fue el 2:1, seguido por el de 1:1; no hubo diferencias significativas entre las zonas del grupo FS y 3:1. El análisis de cortes en 2D realizado en estas tres zonas (superior, medial, inferior) es afín con el análisis anterior de porosidad, donde se observa que la estructura se vuelve más heterogénea y abierta en la zona inferior, la cual es la que participa de manera directa en la transición con los poros de la MHB del andamio bifásico, que como mostró el análisis, estos son más grandes. El poseer un gradiente de porosidad es deseable para emular el tejido osteocondral. Respecto a los resultados anteriores del análisis morfométrico por micro-CT podemos concluir que se obtuvieron andamios porosos, con microporos que promoverán la adhesión celular y macroporos que promoverán la migración.

El corte longitudinal de la **figura 18 y 19** revela un cambio en la altura del andamio dependiendo de la MCB utilizada, así, a mayor cantidad de MCB, más altura (desde 2 a 4 cm), a pesar de que los cálculos se realizaron considerando ocupar el mismo espacio de MCB y/o NaCl (vol/vol). La **figura 18**, muestra la reconstrucción 3D por micro-CT de cada fase del andamio, se observa su estructura porosa externa e interna (mediante un corte cilíndrico, longitudinal y transversal).

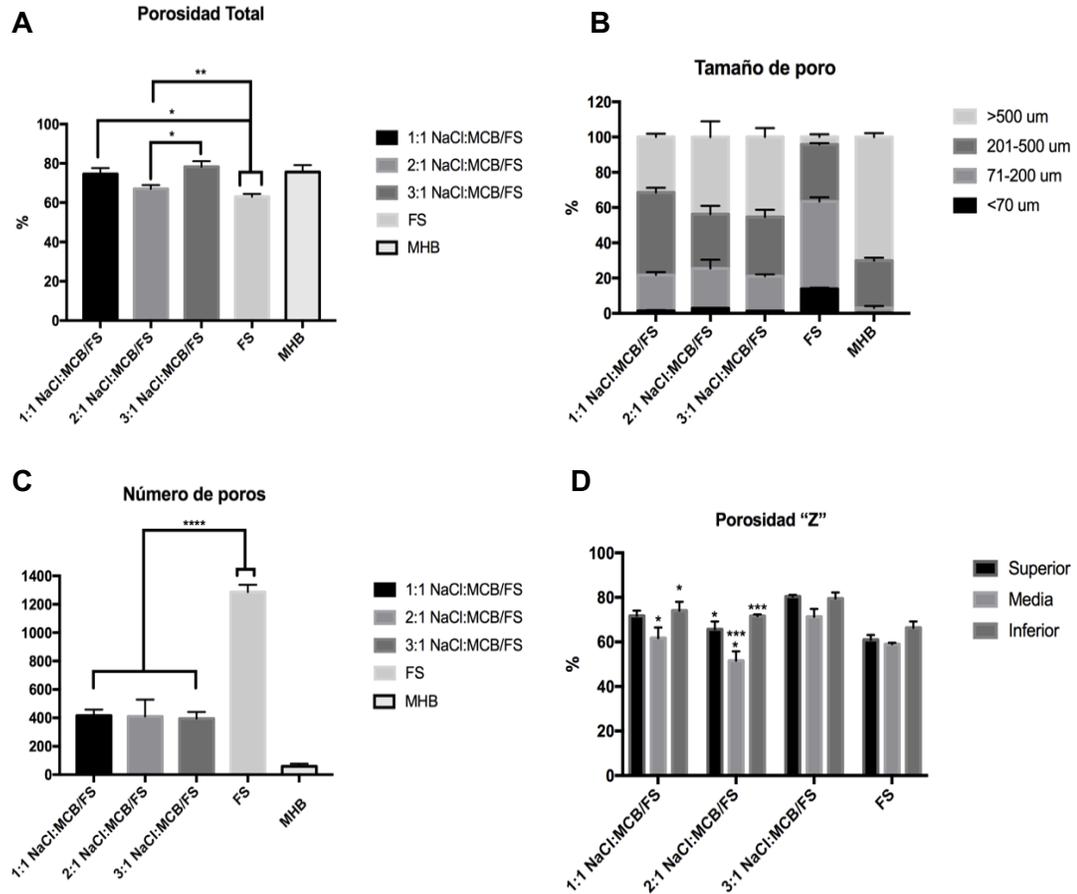


Figura 16. Análisis de la porosidad por micro-CT en cada fase del andamio. A. Porosidad total. B. Distribución del tamaño del poro. C. Conteo del número de poros. D. Porosidad a lo largo del eje Z en tres zonas. ± Error estándar de la media. Significancia estadística $p < 0.05$. $n = 3$.

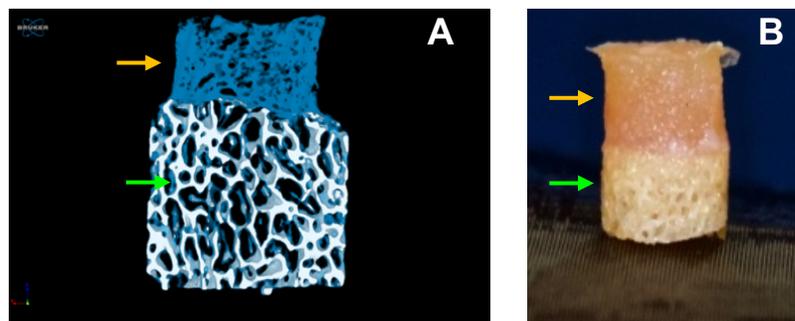


Figura 17. Estructura del andamio bifásico 1:1 MCB/FS-MHB. A. Reconstrucción 3D del andamio bifásico por micro-CT. Con flecha amarilla se señala la fase que simula al cartílago teñida de azul, lo que corresponde a la mezcla de MCB/FS. La fase de MHB se observa en blanco. La flecha verde señala la presencia de FS, teñida de azul, penetrando a través de los poros de la MHB, logrando así el ensamblaje y la transición gradual de las fases. B. Imagen macroscópica del andamio bifásico hidratado en DMEM. Flecha amarilla señala la fase que simula al cartílago (MHB/FS) y la flecha verde la fase que simula al hueso.

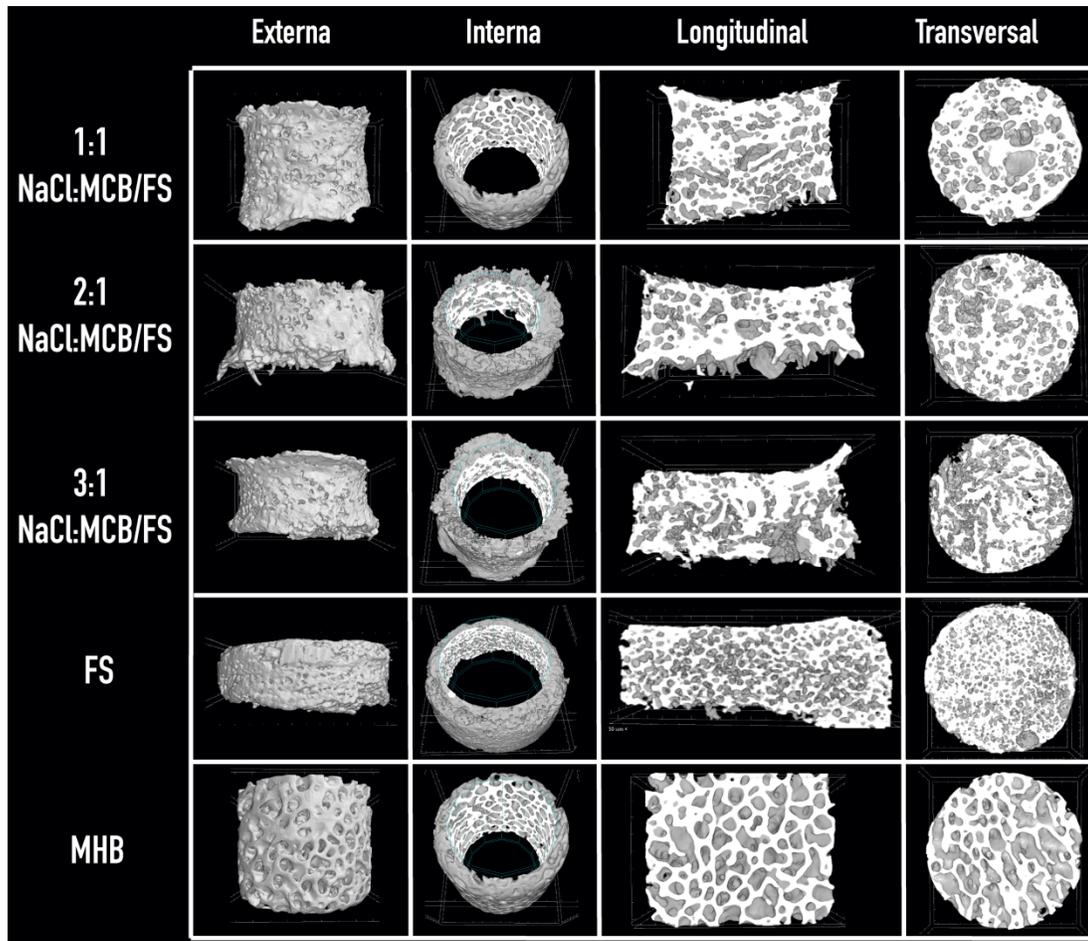


Figura 18. Reconstrucción 3D por micro-CT. Se observa la estructura externa e interna de cada fase, además de la distribución de los poros en cortes longitudinales y transversales.

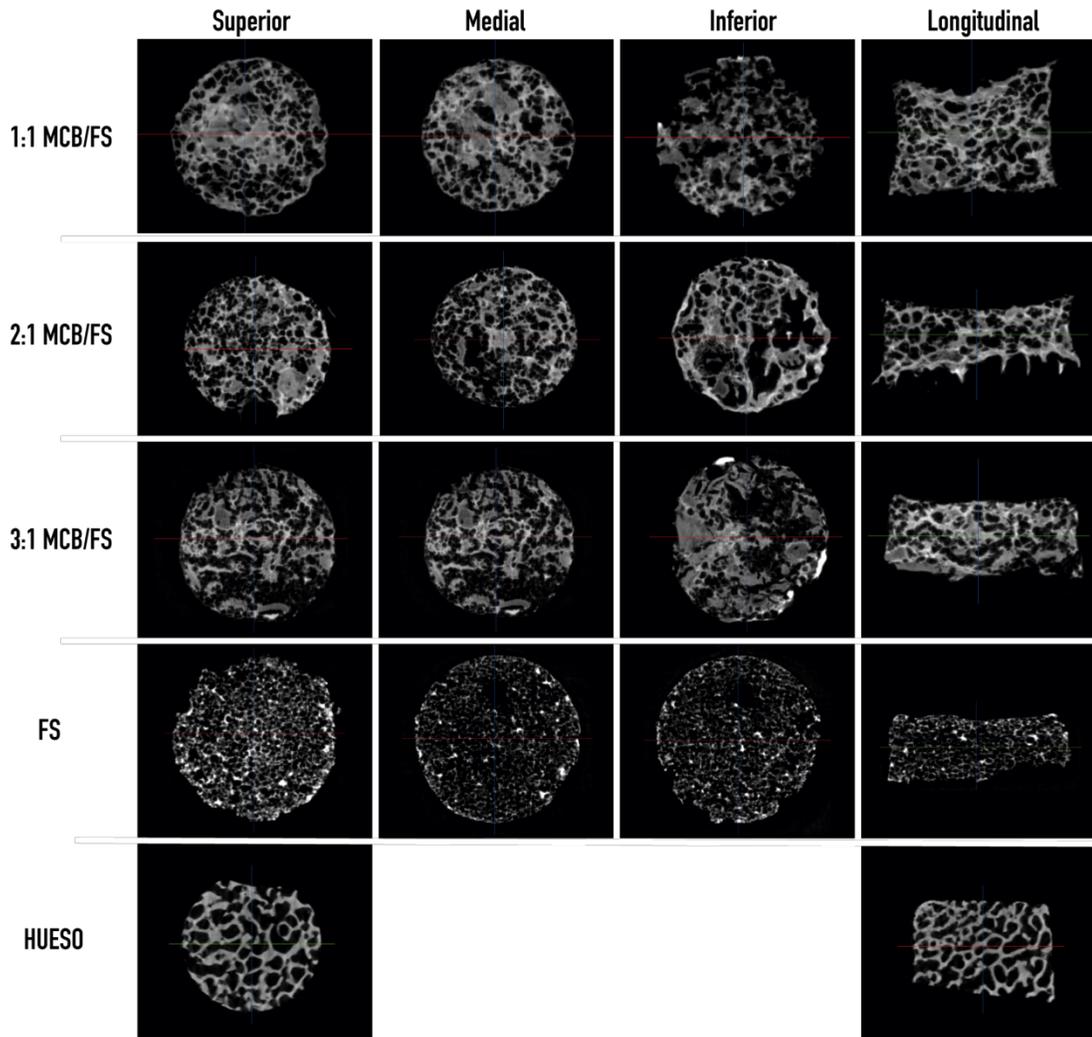


Figura 19. Imágenes de micro-CT, corte en 2D. Se muestra la estructura interna del andamio en cortes transversales a lo largo del eje Z (superior, media, inferior), donde la parte inferior es la que tiene contacto con la fase de hueso del andamio bifásico. De igual manera, se observa la estructura porosa de cada fase en un corte longitudinal.



Una vez logrado el ensamblaje y caracterización estructural del andamio, se analizó la habilidad de las fases condral y ósea, para permitir la adhesión celular y como consecuencia la proliferación. El implante bifásico fue celularizado con hADSCs y cultivado durante 7 días en DMEM. En la **figura 20** se muestra cada fase del andamio donde a simple vista se observa que el tamaño del poro ha sido modificado como consecuencia de la producción de MEC *de novo* por parte de las células embebidas; pasando de un poro abierto a uno más cerrado al comparar este contra la estructura del andamio sin células (**Figura 15**). Las flechas amarillas señalan a las células adheridas a los biomateriales, encontrando una morfología celular alargada para los grupos que contienen MCB/FS y MHB, mientras que para el grupo que solo contiene FS la morfología se observa redondeada. De manera interesante resaltamos que en aquellos grupos que contenían MCB se observó la presencia de abundantes estructuras fibrilares (flecha verde), lo que nos indica que la biofuncionalización de la fibroína con MCB promueve la secreción de MEC en las células adheridas.

Si bien, esta es una evidencia de la capacidad de cada uno de los andamios para promover la adhesión celular de las hADSCs, el siguiente paso fue demostrar si el microambiente era capaz de sostener el crecimiento celular. Mediante una curva de crecimiento evaluada por azul de Alamar, observamos que todos los grupos que contenían MCB mostraban una curva de crecimiento positiva hasta al día 15, si bien, para el grupo 1:1 y 2:1, hay un decremento en el día 4, la proliferación se recupera a partir del día 6. El grupo 3:1 fue el único en superar la lectura inicial desde el día 4, sin embargo, no hubo diferencias significativas respecto a los otros grupos. Tanto el grupo FS como el grupo MHB no mostraron ser capaces de proveer las condiciones propicias para la proliferación de las hADSCs a lo largo de 15 días, tal como lo demuestra la curva de crecimiento negativa respecto al punto inicial.

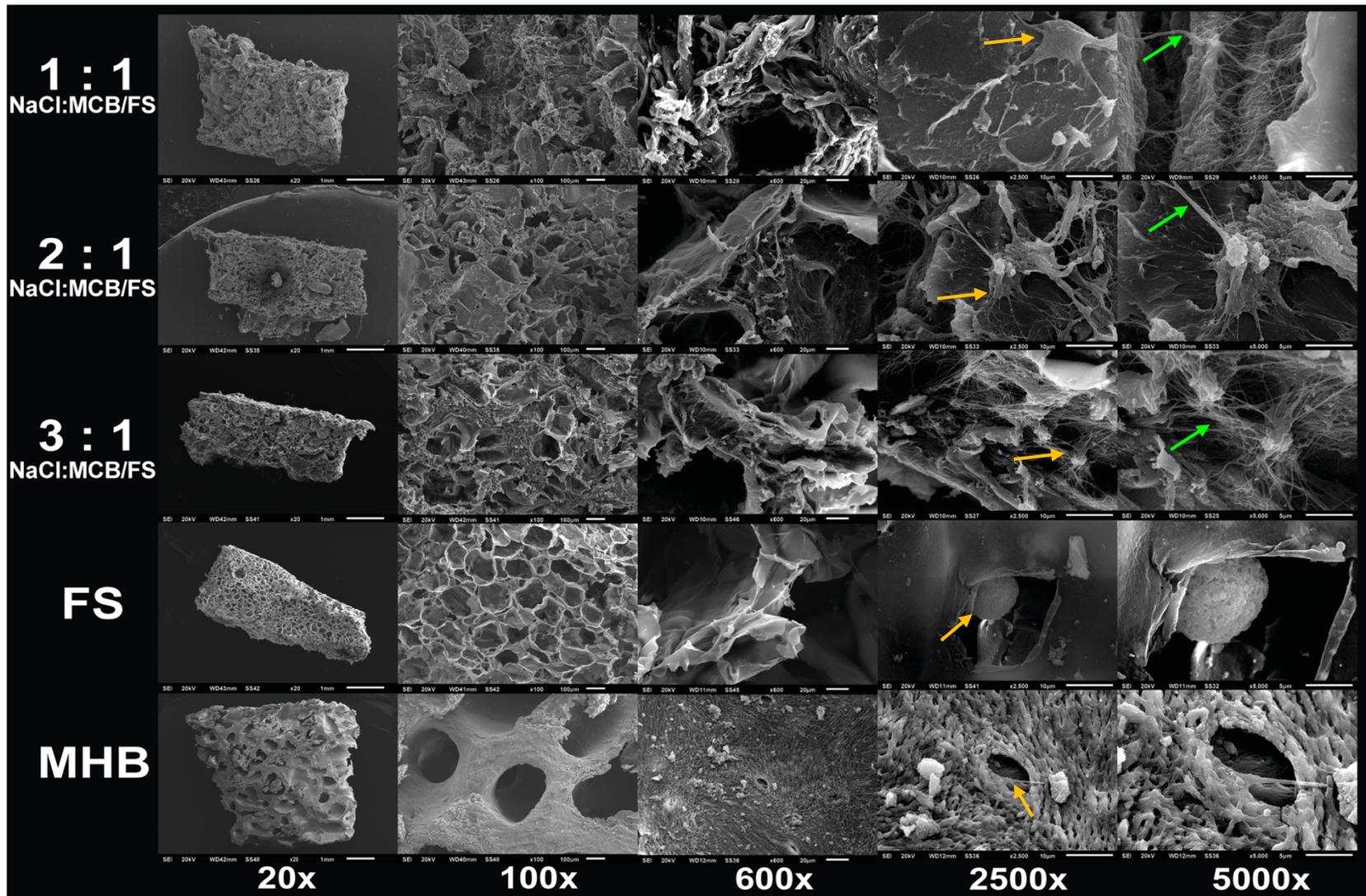


Figura 20. Microfotografía de los andamios celularizados con hADSCs mostrando la adhesión celular. 20X muestra cada fase de los andamios con un corte longitudinal. 100X muestra la estructura porosa de los andamios. 600X muestra un acercamiento a los poros del andamio. 2500X-500X muestran células adheridas (flechas amarillas) a los materiales del andamio y una estructura con fibrillas (flechas verdes) para los grupos que contenían MCB (1:1, 2:1 y 3:1 NaCl:MCB/FS).

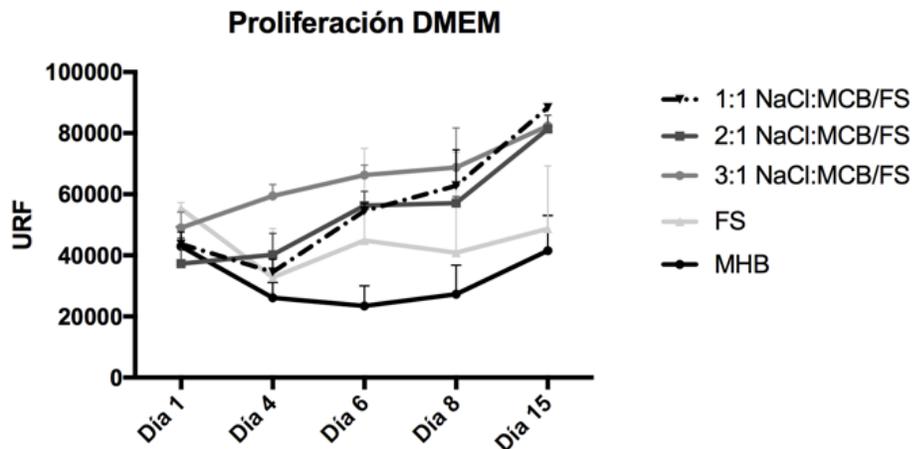


Figura 21. Proliferación celular en andamios monofásicos. Proliferación de hADSC en los andamios monofásicos con medio basal (DMEM). \pm Error estándar de la media (n=3).

8.5 Evaluación histológica de la matriz neoformada en los andamios

Mediante tinciones histológicas es posible identificar la arquitectura del tejido, morfología y por lo tanto la naturaleza de las células que lo componen. Una característica deseable en la regeneración del cartílago hialino es la producción de fibras de colágeno que pueden ser identificadas en color azul con la tinción de tricrómico de Masson. Debido a la morfología fibrilar que observamos en los grupos que contenían MCB mediante los ensayos de MEB, decidimos analizar la histología con tinción de tricrómico de Masson y H&E, y la inmunodetección para COL I, COL II y AGC, para evaluar la naturaleza de las fibras secretadas.

La **figura 22A** muestra la reacción inmunohistoquímica para la monofase de cartílago de los grupos 1:1, 2:1, 3:1 NaCl:MCB/FS después de haber sido celularizada con hADSCs y cultivada por 14 días en DMEM o celularizada con precondrocitos (diferenciados a partir de hADSCs por 5 días en monocap) cultivados en medio condrogénico por 14 días. En el panel de la derecha de la **figura 22A**, se puede observar que al tener el estímulo químico del medio condrogénico, éste aumenta la expresión de todas las proteínas. Sin embargo, es importante resaltar que, sin el estímulo químico, el microambiente generado por el andamio es capaz de favorecer, sobre todo, la expresión de COL II, manteniendo niveles bajos de COL I, siendo esto deseable. En el análisis densitométrico al evaluar la expresión de COL I y II, en las células cultivadas en medio condrogénico, se observó una mayor expresión de COL II para la proporción 1:1, teniendo una diferencia



significativa contra los grupos 2:1 y 3:1; no se observaron diferencias significativas entre los grupos al evaluar la expresión de COL I en la misma condición. La proporción 1:1 además de poseer una mejor relación COL II/COL I, también se observaba una mayor secreción de matriz neoformada respecto a los otros grupos.

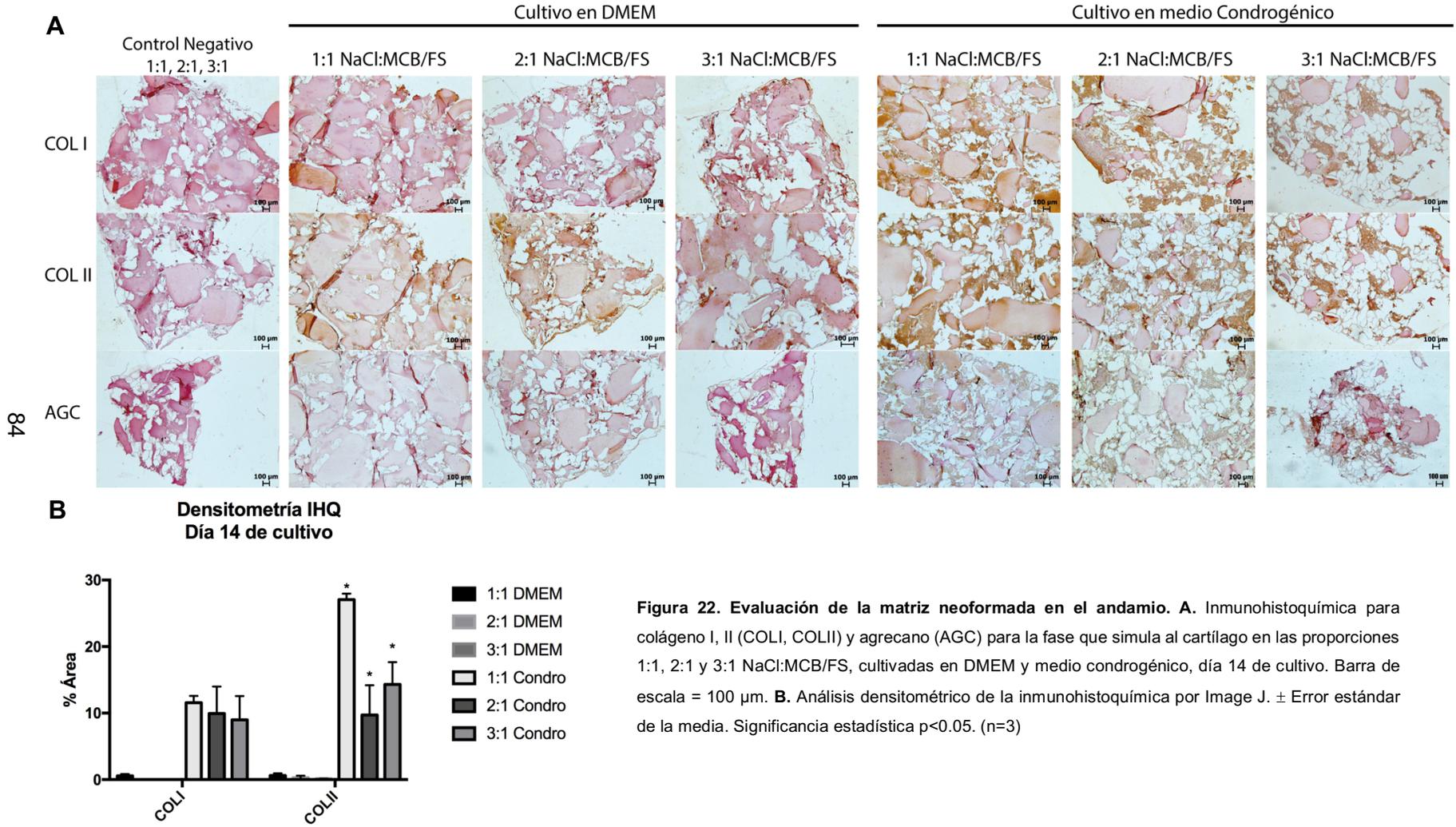
Durante la técnica de inmunohistoquímica, se observó que a menor contenido de MCB la muestra era más lábil y difícil de conservar en el portaobjetos, lo mismo sucedía para los controles sin células, sugiriendo que el componente celular y la secreción de matriz neoformada, así como la cantidad de MCB influyen en proporcionar una mejor resistencia y conservación de la estructura al andamio. Podríamos correlacionar estas observaciones con los datos de elasticidad mecánica obtenidos por la M.C. Vanessa Pérez en su tesis de doctorado, donde encontró un mayor módulo de Young para la proporción 1:1; esto nos indica que esta proporción soporta una fuerza mecánica mayor. Debido a todos los resultados aquí mostrados donde se evaluaron las proporciones 1:1, 2:1 y 3:1, se decidió seleccionar la proporción 1:1 para futuros ensayos, ya que preservaba mejor el perfil de tamaño de poro deseado, porosidad, capacidad para soportar el crecimiento celular, una buena relación en la expresión de COL II/COL I y una mejor resistencia mecánica a la compresión.

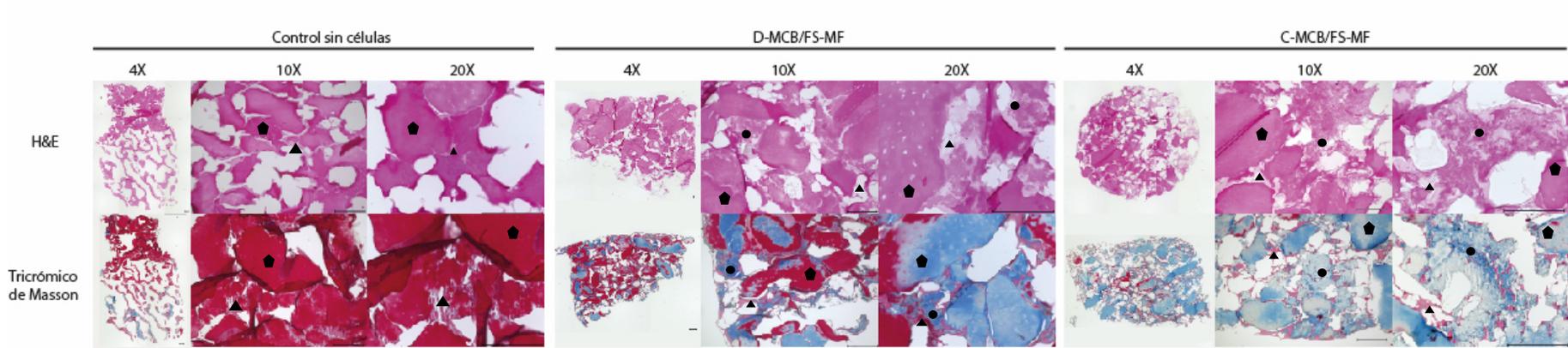
Para comprobar la presencia de fibras de colágeno en la monofase que simula al cartílago, se realizó la tinción de tricrómico de Masson, donde podemos observar estas fibras en color azul como lo muestra la **figura 23**, en la cual, se muestran cortes histológicos del andamio 1:1 después de ser cultivado con hADSCs en DMEM por 14 días (D-MCB/FS-MF), contrastando contra el grupo cultivado con hADSCs prediferenciadas por 5 días en monocapa con medio condrogénico y posterior cultivo por 14 días en el mismo medio (C-MCB/FS-MF). En el control sin células se muestra en 4X al andamio bifásico, y en mayor magnitud la monofase que simula al cartílago. Un inconveniente técnico con el que nos enfrentamos fue que la FS presente en el andamio captaba de manera inespecífica los colorantes, por ejemplo, para la tinción de tricrómico de Masson, la FS se observa en rojo (triángulo), al igual que los fragmentos derivados de la MCB (pentágono), sin embargo, gracias al control negativo sin células, pudimos identificar los componentes iniciales del andamio diferenciándolos de la matriz neoformada. De manera similar, para la tinción H&E en el grupo control, se puede observar en rosa claro la FS (triángulo) y en rosa fuerte los fragmentos derivados de la



MCB (pentágono). Tanto para los grupos cultivados con DMEM, como con medio condrogénico, fue posible identificar matriz neoformada amorfa (círculo), siendo más desorganizada para los cultivados con medio condrogénico, con el mismo código de formas se muestran los fragmentos derivados de la MCB (pentágono) y la FS (triángulo) para cada grupo.

La mayoría de las investigaciones que proponen andamios bifásicos para la regeneración del tejido osteocondral, se limitan a cultivar la fase que simula al cartílago como monofase, es decir, no acoplada a la fase que simula al hueso. Por este motivo, decidimos llevar a cabo la siembra de las hADSCs en la fase que simula al cartílago (de la proporción 1:1) pero como cultivo bifásico, es decir, con la presencia de la MHB, tanto en DMEM (D-MCB/FS-BF) como en medio condrogénico (C-MCB/FS-BF). La **figura 24** muestra cortes histológicos longitudinales del andamio bifásico en 4X y magnificaciones 10X y 20X de la fase que simula al cartílago. En 4X se puede observar los cambios generales en la coloración del andamio bifásico, producto de la secreción de matriz neoformada para los grupos que contienen células contra el control sin células. La intención de realizar la tinción de safranina O y azul de toluidina fue para identificar los GAGs y proteoglicanos. Sin embargo, debido a la tinción inespecífica de la FS, aunado a la pérdida de GAGs relacionada al proceso de descalcificación y preparación de la muestra²²⁰, no fue posible identificar de manera clara estos componentes. Por el contrario, la tinción de rojo de picrosirio que identifica las fibras de colágeno, resultó la más adecuada para diferenciar la matriz neoformada amorfa, teñida en rosa intenso (círculo); los fragmentos derivados de la MCB de aspecto liso, teñidos en rojo intenso (pentágono); y la FS (triángulo) teñida en color amarillo claro. La tinción de rojo de picrosirio corresponde con la tinción de tricrómico de Masson, que también identifica las fibras de colágeno, donde observamos la FS en rojo (triángulo), la matriz neoformada amorfa en azul (círculo) y los fragmentos derivados de la MCB en azul (pentágono). No se encontraron grandes diferencias morfológicas en la matriz neoformada para ambos grupos. Sin embargo, la tinción de tricrómico de Masson del grupo cultivado con medio condrogénico se percibe mayormente irregular. Lo que resulta evidente y meritorio de resaltar es el aumento en la densidad de la matriz neoformada (círculos) en los grupos de la **figura 24** que provienen de cultivos bifásicos, contra los grupos de la **figura 23** que provienen de cultivos monofásicos; lo cual sugiere que el microambiente, específicamente la presencia de la MHB, propicia favorablemente esta característica.





85

Figura 23. Producción de matriz extracelular en los andamios. Tinción H&E donde se observa la matriz neoformada (círculo) producida por las hADSCs cultivadas dentro de los andamios monofásicos con DMEM (D-MCB/FS-MF) y con medio condrogénico (C-MCB/FS-MF). Tinción de tricrómico de Masson donde se observa en azul las fibras de colágeno secretadas por las células (círculo). Los pentágonos y los triángulos muestran los fragmentos derivados de la MCB y la FS, respectivamente. Cultivos al día 14. Barra de escala= 250 μ m

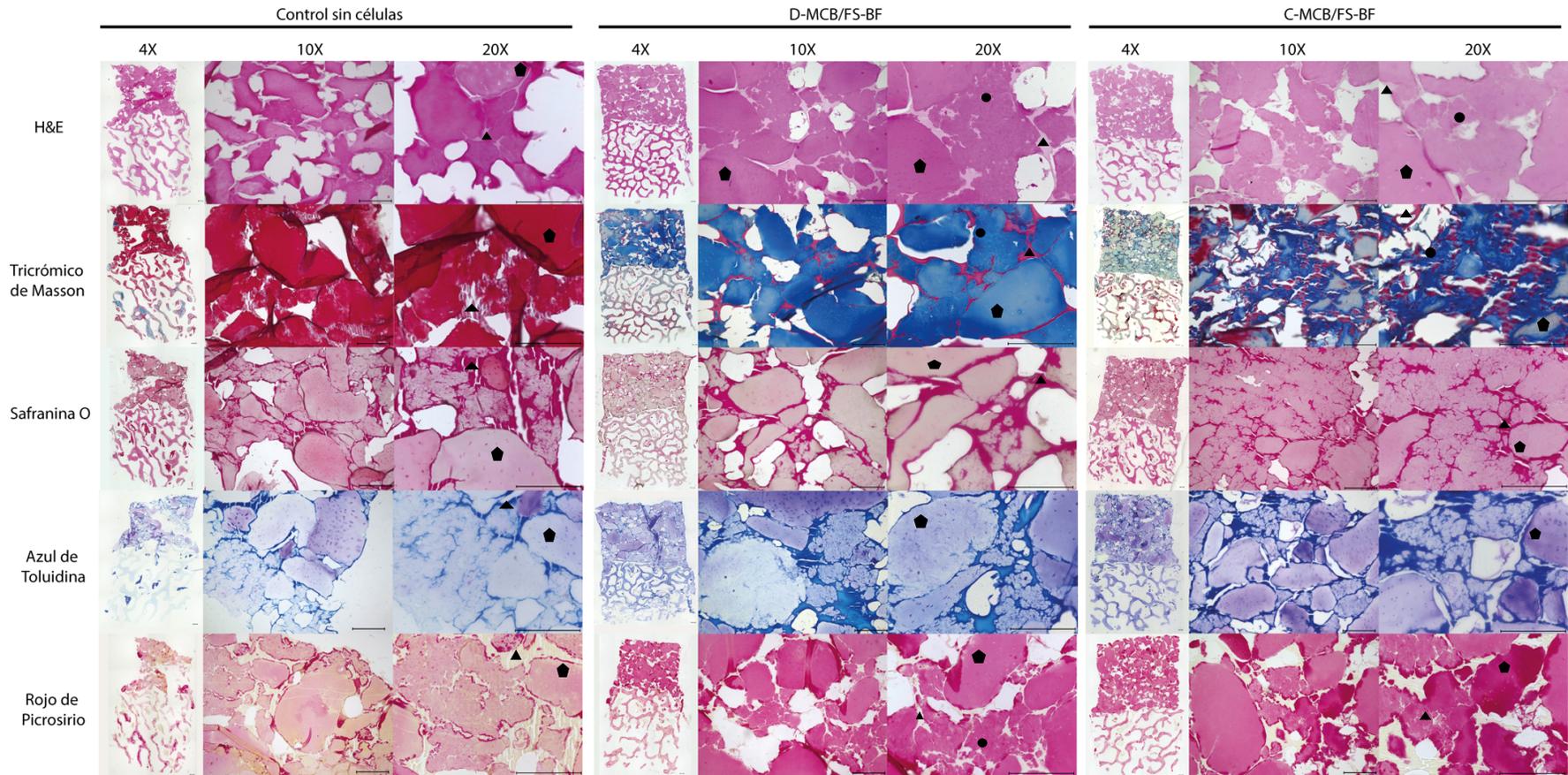


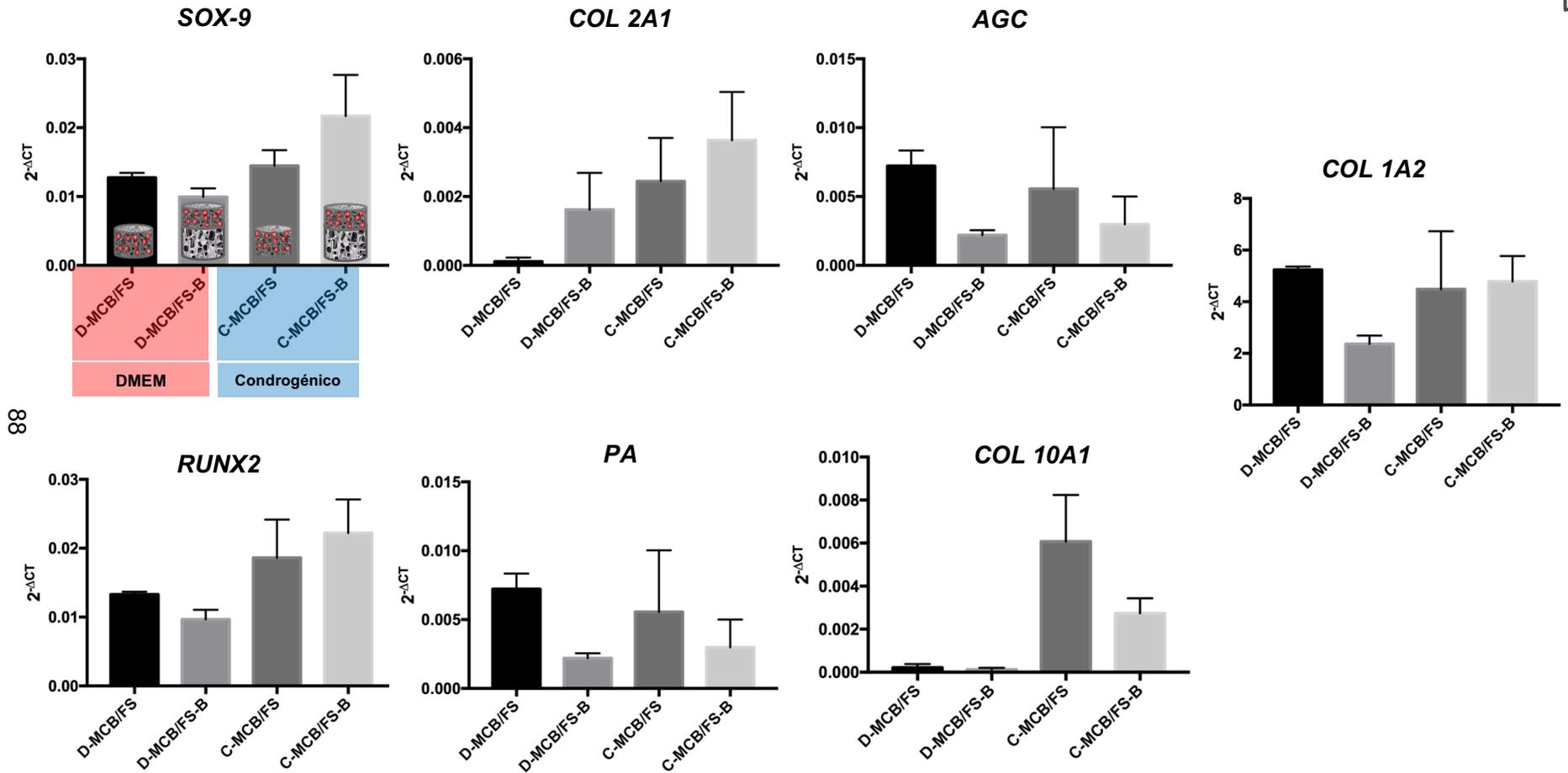
Figura 24. Cultivo bifásico en DMEM y medio condrogénico. La siembra se llevó a cabo solo en la fase que simula al cartílago, analizando su histología al día 14. Tinción H&E para observar la estructura, tricrómico de Masson para las fibras de colágeno en azul, safranina O para GAGs en rojo, azul de toluidina para proteoglicanos en morado y rojo de picrosirio para las fibras de colágeno (rosa). Los círculos muestran la matriz neoformada, los triángulos la FS y los pentágonos los fragmentos derivados de la MCB.

Barra de escala = 250 μ m



8.6 Influencia del microambiente sobre la expresión génica de marcadores condrogénicos y osteogénicos.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las investigaciones en los modelos bifásicos propuestos para la regeneración osteocondral, llevan a cabo todos los ensayos separando las fases. Por esta razón se propuso analizar la influencia de la presencia de la MHB (andamio bifásico) sobre la expresión génica de las células sembradas en la fase que simula al cartílago. La **figura 25** muestra la expresión génica de las células cultivadas en DMEM (D-) y medio condrogénico (C-) al día 14 en el andamio, tanto para cultivos monofásicos (MCB/FS) como para cultivos bifásicos (MCB/FS-B). Se analizaron los marcadores de diferenciación condrogénica *SOX-9*, *COL II*, y *AGC*; y los marcadores de osteogénesis *RUNX2* y *PA*, mientras que para evaluar la presencia de un proceso hipertrófico se incluyeron los marcadores *COL I* y *X*. De manera general se observó que los andamios D-MCB/FS y D-MCB/DS-B son capaces de promover la expresión génica de marcadores condrogénicos, incluso en ausencia del estímulo químico del medio condrogénico. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre los grupos, sí se observa una tendencia, remarcando que la expresión de *COL II* fue mayor para aquellos cultivos que provienen de andamios bifásicos, y resaltando aún más, que los marcadores osteogénicos (*PA*, *COL X*, *COL I*) se mantienen más bajos en aquellos grupos que provienen del cultivo bifásico; este comportamiento es ideal considerando que se está analizando la fase que simula al cartílago, donde se busca moderar la expresión osteogénica para evitar la hipertrofia.



88

Figura 25. Influencia del microambiente sobre la expresión génica de marcadores condrogénicos y osteogénicos. Patrón de expresión génica después de 14 días en cultivo dentro del andamio monofásico y bifásico, cultivados con DMEM (D-) y medio condrogénico (C-). ± Error estándar de la media.



CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

9.1 Caracterización de las hADSCs aisladas y cultivadas bajo condiciones xeno-free.

La Federación Internacional de Terapéutica Adiposa y Ciencia (IFATS) y la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) ha establecido criterios mínimos para la identificación de MSCs humanas que pretenden ser destinadas a terapia celular²²¹, entre estos se encuentran: poseer morfología fusiforme, poder ser aisladas por métodos enzimáticos y poseer la capacidad de adherirse a las cajas de cultivo, ser capaces de diferenciarse al linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico; además de tener un inmunomarcaje positivo para los marcadores mesenquimales CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), CD90 (Thy-1), CD44 (HCAM) y CD105 (endogлина); y ser negativas para al menos uno de los marcadores hematopoyéticos CD34 (antígeno de células progenitoras hematopoyéticas CD34), CD14 (antígeno de diferenciación de monocitos CD14), CD11 (integrina alpha-M) o CD45 (Proteína tirosina fosfatasa CD45).^{222,223,224}

Tomando en consideración la posterior aplicación clínica, era importante establecer un cultivo libre de suero fetal bovino (xeno-free) sustituyéndolo por suero humano como un abordaje pre-clínico. Los resultados del cultivo con suero humano mostraron una morfología adecuada correspondiente al fenotipo mesenquimal, buena adherencia y proliferación de las células a la placa de cultivo, mantenimiento de la expresión de marcadores mesenquimales, ausencia de marcadores hematopoyéticos y capacidad multipotencial de diferenciación al linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. Los datos concuerdan con diversas investigaciones que pretenden destinar estas células a una terapia celular, donde se prefiere utilizar el suero humano para evitar la inmunogenicidad de las proteínas presentes en el suero fetal bovino^{218,225,226} y a su vez eliminar el riesgo de enfermedades por presencia de priones.²²⁷

Nuestros resultados cumplen con los parámetros establecidos por la ISCT y la IFATS, adicionalmente, respecto a las observaciones en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad. Diversos estudios han correlacionado la presencia de HLA-ABC y la ausencia de expresión de HLA-DR con las propiedades inmunosupresoras de las



MSCs.^{228,229} Si bien la aplicación futura de estas células incluye una diferenciación condrogénica (para este trabajo o posibles abordajes pre-clínicos), lo cual modifica la expresión de diversos marcadores; la investigación de Le Blanc²²⁹ concluye que las MSCs indiferenciadas y diferenciadas no provocan respuestas proliferativas de linfocitos alorreactivos y modulan además respuestas inmunitarias, confirmando que las MSCs pueden ser trasplantables entre individuos incompatibles con HLA.

El método utilizado para la obtención y cultivo celular podría tener aplicaciones benéficas en terapia celular debido a que resulta una fuente eficaz para la obtención de células que podrían ser utilizadas para la regeneración de tejidos dañados. Nuestro protocolo resulta apropiado para fines de investigación, fundamentalmente debido a que las hADSCs poseen pocas limitaciones éticas en su uso, y porque son relativamente fáciles de obtener debido a que derivan de muestras de tejido adiposo que generalmente son desechadas luego de los procedimientos quirúrgicos relacionados. De igual forma, estas células, se convierten en un buen modelo para la evaluación de diferentes biomateriales que actúan como andamios para la fabricación de sustitutos biológicos, ya que, debido a su potencial de diferenciación, podrían representar un buen simulador tejidos-específicos, con lo cual se puede determinar la funcionalidad, citocompatibilidad y genotoxicidad de las células frente al biomaterial.

9.2 Descelularización de la MCB

Para cubrir la limitante de la disponibilidad que existe al trabajar con ciertos materiales, se buscó un biomaterial natural de fácil acceso y de fácil manipulación, siendo los fragmentos derivados de matriz del cartílago bovino (MCB) un material conveniente y de bajo costo. Pensando en futuras aplicaciones pre-clínicas y clínicas resultaba importante reducir la presencia del componente celular en la MCB para evitar posibles reacciones inmunes de rechazo o inflamatorias en modelos *in vivo*²³⁰. Por tal motivo, se implementó por primera vez en el laboratorio una técnica para descelularizar el cartílago articular basado en buffers hipotónicos. Con la descelularización, no solo se buscaba eliminar los condrocitos, sino también aumentar la porosidad para generar espacios que puedan hospedar nuevas células, facilitar la transferencia de nutrientes, productos de desecho y facilitar la migración de las nuevas células a usar.⁹⁷ Se buscaba lograr un equilibrio entre descelularización y conservación de los componentes de la MEC, como lo son las fibras



de colágeno y proteoglicanos, ya que estos pueden ser reconocidos por las células para su adhesión y crecimiento.²¹⁹

Debido a la estructura compacta del cartílago y la baja penetrabilidad de soluciones, se optó por métodos fisicoquímicos para su descelularización, la literatura sugiere que tiempos cortos de SDS a porcentajes bajos conservan mejor la matriz. Por ello, basándonos en el protocolo propuesto por Tavassoli y col,²³¹ se probó su propuesta y variantes de ella, donde describen ciclos de congelación/descongelación y tratamientos con diversas concentraciones de dodecil sulfato de sodio (SDS). A pesar de que sus resultados concluyen que someter al cartílago de 5 a 8 h en SDS 2%, seguido de 3 h de SDS 4% descelularizan el cartílago al 100% conservando la matriz, esto no fue reproducible en nuestro estudio, donde obtuvimos de un 54-61% de descelularización utilizando su metodología.

Existen otros trabajos como el de Chang y col.²³² y Yang y col., donde al tratar al tejido con tritón X-100 y métodos enzimáticos refieren haber eliminado casi por completo el componente celular. Los tratamientos enzimáticos o químicos adicionales suelen ser necesarios para facilitar la eliminación de los desechos celulares, ya que la eliminación de los restos de ADN del tejido puede ser particularmente difícil debido a la naturaleza "pegajosa" del ADN y su tendencia a adherirse a las proteínas de la MEC.²³⁰ Sin embargo, en nuestro trabajo evitamos utilizar métodos enzimáticos ya que la literatura señala que son más difíciles de eliminar, pudiendo causar respuestas inmunes de rechazo o inflamatorias^{233,230}. En este contexto, Chang y col., discuten que los resultados de la muerte celular en los análisis de citotoxicidad de su matriz, pueden deberse precisamente a los remanentes químicos del método utilizado, además de que la integridad de la matriz se ve mayormente comprometida utilizando enzimas.

Otro abordaje para descelularizar la MCB fue mediante el uso de buffers hipotónicos basándonos en la metodología de Luo y col.²¹⁷ Las soluciones hipotónicas pueden causar fácilmente la lisis celular por simples efectos osmóticos con cambios mínimos en las moléculas de la matriz y la arquitectura. Para un efecto osmótico máximo, es común que los tejidos se sumerjan alternativamente en soluciones hiper e hipotónicas a través de varios ciclos. Las soluciones hipertónicas e hipotónicas también ayudan a enjuagar los residuos celulares desde adentro²³⁴, pero para este trabajo solo se utilizaron buffers



hipotónicos con o sin suplementar con KCl y MgCl₂, con la finalidad de facilitar la eliminación de las membranas celulares y los antígenos al aumentar la solubilidad de estas proteínas en la solución de descelularización. Si bien, Luo y col. buscaban eliminar los GAGs con hialuronidasa, basados en el supuesto de que su eliminación puede conducir al desarrollo de una matriz descelularizada más porosa, para nosotros era importante conservar estas estructuras como componentes de reconocimiento celular para propiciar la adhesión y la proliferación de las células sembradas ya que para cubrir el requisito de porosidad nosotros utilizamos NaCl como partícula porógena en el diseño de la fase que simula al cartílago (MCB/FS). Nuestro tratamiento logró un mayor porcentaje de descelularización y contenido de GAGs respecto al estudio de Luo y col.

No hay pautas claras para el grado de descelularización mínimo necesario para evitar una respuesta inmune. Debido a su naturaleza avascular, el cartílago resulta inmunoprivilegiado en gran medida, lo que amplía las fuentes para la selección de un material minimizando el rechazo²³⁵. Los restos celulares en el tejido descelularizado no siempre impiden la regeneración de los tejidos, es decir, no siempre la respuesta inmune es catabólica²¹³; sin embargo, es importante desarrollar y experimentar diferentes y nuevos métodos de descelularización, hasta descubrir aquel que ofrezca cero por ciento de restos celulares, sin comprometer de manera significativa la MEC para la implementación en futuros ensayos *in vivo*.

9.3 Microestructura de los andamios bifásicos y sus propiedades biológicas

El objetivo principal en la ingeniería tisular para regenerar los DOCs es promover la reparación simultánea de la fase ósea y cartilaginosa. Por lo tanto, existe la necesidad creciente de desarrollar andamios con una arquitectura distinta para cada fase, que mimetice las características estructurales, biológicas, químicas y mecánicas de cada zona dentro de la unidad osteocondral. A la fecha, se han desarrollado un gran número de enfoques sugeridos para la fabricación de andamios, que consideran diversas características osteocondrales, estos pueden ser clasificados en las siguientes categorías según Li y col.: andamios monofásicos, andamios para la fase ósea pero con células de la fase condral, ensamble de andamios con fases individuales (ósea y condral) regularmente pre-cultivados por separado, andamios homogéneos pero con diferentes poblaciones celulares para cada fase, andamios homogéneos con gradiente continuo de



moléculas bioactivas para una o ambas fases y andamios individuales con fase condral y ósea integradas durante su fabricación. Nuestro trabajo pertenecería a la última categoría, donde al evaluar los diferentes tipos de estrategias de ingeniería tisular basadas en andamios, frente a los diversos requisitos tisulares para la regeneración del TOC, esta categoría se destaca como un enfoque eficaz y práctico. Sin embargo, algunos desafíos comunes que se presentan con diseños similares deben ser considerados y abordados, incluyendo la integración potencialmente pobre entre las fases, métodos de procesamiento complejos y/o poco prácticos y la falta de reproducibilidad.

Cada uno de estos enfoques de andamiaje tiene sus propias ventajas y desventajas que rigen su efectividad, pero la respuesta eficiente de cada estrategia también está sujeta a requisitos prácticos, como la facilidad y reproducibilidad de la fabricación, la elección de materiales que ya están aprobados (o que probablemente obtendrán aprobación) para uso clínico, método de esterilización, y la preferencia por productos que pueden usarse independientemente de la incorporación de células y/o moléculas bioactivas.⁸³ La dificultad para desarrollar un andamio que satisfaga simultáneamente todos los requisitos anteriores, explica la inopia de implantes o andamios comercializados exclusivamente para el tratamiento de DOCs, además del resultado insatisfactorio a largo plazo. Considerando todo lo anterior, la idea sobre la que se trabajó para bosquejar el diseño del andamio propuesto, se basó en lograr un método sencillo, altamente reproducible, con materiales ampliamente analizados y de fácil acceso, además de ser intrínsecamente bioactivos y mecánicamente adecuados; ensamblados en un solo paso. A pesar de que las matrices de cartílago y hueso propuestas son de origen bovino para fines de la investigación, se prevé la obtención de los mismos materiales pero de origen humano para futuros ensayos pre-clínicos.

La elección del uso de la MHB descelularizada, se fundamentó en la evidencia emergente de que el hueso subcondral podría mediar la condrogénesis en un ambiente osteocondral²³⁶, además del beneficio de preservar la estructura nativa del hueso, conservando principalmente el colágeno I después del tratamiento de descelularización¹⁴, característica deseable para su bioactividad. La selección de la MCB descelularizada se seleccionó, de igual forma, por ser un constituyente nativo del cartílago, que con el tratamiento adecuado de descelularización, puede conservar



componentes bioactivos como los GAGs y colágeno tipo II, proveyendo un microambiente natural para la adhesión y proliferación celular, sin embargo, posee propiedades mecánicas insatisfactorias²³⁷. Es por esto que para cubrir la necesidad mecánica se propuso el uso de FS, la cual es una proteína natural fibrosa y ampliamente usada tanto biomédica como biotecnológicamente, entre sus características benéficas sobresalen su resistencia mecánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad¹⁴³, además, al disolverla con HFIP le confiere mayor resistencia mecánica¹⁸², retardando su degradación enzimática por su característica hidrófoba.¹⁹²

En la búsqueda de mimetizar el tejido osteocondral, considerar la porosidad heterogénea de cada fase resulta importante. Nuestro porcentaje de porosidad obtenido en el andamio bifásico 1:1 tiene un rango del 61.73% al 75.63%, lo que se asemeja a la porosidad nativa del tejido reportada en la literatura (60-80%).⁹ Existen diversas metodologías para lograr generar poros en cada fase del andamio; una de las más ampliamente utilizadas es NaCl como partícula porógena. Sin embargo, dependiendo del tamaño de la partícula utilizada, la concentración y la polaridad de la solución de FS puede dar lugar o no a la formación de la estructura porosa homogénea. Por ejemplo, Kim y col.¹⁸³ al utilizar un tamaño de partícula de NaCl por debajo de 500 μm en la misma concentración de FS que nosotros utilizamos (8%) pero en su caso acuosa, reportan que no fue posible lograr la formación del poro; sin embargo, en nuestra investigación, utilizando un tamaño de partícula de 77-144 μm en una solución de FS al 8%, diluida en HFIP fue posible generar estructuras porosas homogéneas. La influencia de los poros pequeños en la formación de cartílago o hueso, fue establecida experimentalmente en estudios que mostraron que andamios de la misma composición, inducen condrogénesis en la presencia de poros pequeños (80-120 μm), y osteogénesis en la presencia de poros grandes >300 μm ²³⁸. La generación de poros pequeños en la fase que simula al cartílago es deseable para inducir hipoxia y favorecer la condrogénesis^{195,196}, mientras que poros más grandes son deseados en la fase que simula al hueso para promover la angiogénesis.^{197,198} Si bien, el consenso establece utilizar partículas porógenas pequeñas para estimular la condrogénesis y partículas grandes para estimular la osteogénesis, esto no siempre se conserva después de la creación del andamio, ya que el tamaño de partícula utilizado como porógeno cambia debido a la técnica empleada o a los materiales con los que interacciona.²¹⁰ En nuestro trabajo se observó que la MCB aumentaba el tamaño de poro, incluso en los grupos que contenían menor proporción



de partícula porógena en comparación del grupo de FS donde solo se utilizó NaCl. Analizando diversos diseños bifásicos basados en FS para la regeneración osteocondral, existe una gran variabilidad entre el tamaño de partícula usada y su correlación con la porosidad deseable en cada fase. Por ejemplo, Li y col. proponen tamaños de poro entre 100-120 μm para la fase que simula el cartílago y 400-500 μm para la que simula el hueso⁸³, Yan y col. proponen tamaños de poro entre 300-700 μm para ambas fases pero obtienen porcentajes de porosidad diferentes entre ellas (82.02% para cartílago y 62.27% para hueso), la diferencia en el porcentaje de porosidad lo atribuyen a los materiales empleados⁵. Esto también contrasta con lo diseñado por Ding y col. donde al tener tamaños de poro de 112.43 μm obtienen una porosidad del 85.30% para simular cartílago y con tamaños de poro de 363.23 μm , obtienen 90.25% para simular hueso²³⁹. Tener poros de tamaños pequeños y grandes dentro de la misma fase, como lo muestran nuestros resultados, también es una característica deseable; como se observó en las imágenes por MEB, las paredes de los poros en los grupos que contenían matriz también mostraban poros pequeños, esta heterogeneidad favorece la adhesión celular, infiltración celular y el intercambio de nutrientes.²¹⁰ No hay un patrón claro a seguir respecto al tamaño de poro y porosidad necesaria para estimular la condrogénesis, ya que el éxito de la diferenciación no solo depende de la microporosidad, sino también del tipo de material utilizado como andamiaje, la fuente celular, el sistema de cultivo, los factores de crecimiento empleados, etc.

Las primeras interacciones célula-biomaterial ocurren a través de interacciones no específicas, como fuerzas de van der Waals, fuerzas iónicas y fuerzas electrostáticas; mientras que la adhesión específica, es mediada por la MEC, como el colágeno, fibronectina, péptidos, factores de crecimiento, moléculas activas etc., influyendo también en el crecimiento celular.²⁴⁰ La topografía del poro es otro aspecto que del mismo modo influye en la adhesión celular, por ejemplo, cuando la FS es diluida en agua, se obtienen poros rugosos, dando lugar a una mayor adhesión celular, a diferencia de la FS disuelta en HFIP, donde los poros muestra una estructura lisa y menor adhesión celular.^{143,192,160} Nuestras imágenes por MEB revelan la estructura lisa de la FS (diluida en HFIP) para el grupo donde no se utilizó MCB, sin embargo, para los grupos que contenían MCB con FS, la topografía del poro se observa rugosa. Estos datos podrían correlacionarse con las diferencias encontradas en la proliferación celular, donde para la FS con topografía de poro lisa no se observó un aumento en la proliferación, pudiendo



indicar que las interacciones célula-célula y célula-biomaterial no propiciaron su crecimiento; mientras que para los grupos con MCB/FS que mostraban topografía de poro rugosa (a pesar de que la FS también fue disuelta en HFIP) sí superaron la cantidad inicial de células desde el día 4 o 6, sugiriendo que la topografía y las interacciones específicas célula-matriz favorecieron este resultado. A pesar de que la MHB y la FS poseen moléculas bioactivas, no superaron la siembra inicial de las células. Este comportamiento podríamos explicarlo debido a la técnica de esterilización empleada por óxido de etileno, ya que se ha reportado inhibe la adhesión celular si no se logra eliminar las trazas, si bien, para todos los grupos se utilizó el mismo método de esterilización, su lixiviación podría variar dependiendo del material con el que interactúa, para esto se propone el uso de gas plasma como agente esterilizante.²⁴¹

La tinción inespecífica de la FS ante diversos colorantes, parece ser un inconveniente general en las investigaciones, no solo es inespecífica en las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas, sino también en inmunofluorescencias. A pesar de esto, pocos son los autores que lo abordan^{67,242}, siendo indispensable la inclusión del grupo control sin células para una correcta identificación de los componentes neoformados. De nuestras observaciones histológicas, podemos resaltar que la MEC neoformada por el andamio 1:1, resulta ser sobresalientemente más densa comparada con aquellos diseños que proponen andamios bifásicos para la regeneración osteocondral basados en FS para la fase que simula al cartilago^{78,82,80,79,67,81, 200,243}, característica atribuible, en nuestro caso, al uso de la MCB. En el trabajo de Yang y col.²³⁷ proponen un modelo monofásico de FS 3% mezclado con un ultra-homogenizado de MCB 6%. A pesar de acoplar a su diseño una molecular que estimula la condrogénesis (TGF- β 3) y poseer los mismos biomateriales que nuestro modelo para la fase condral, la matriz neoformada sigue siendo más densa en nuestro estudio, además de poseer mayor grosor en las paredes del poro al mismo día de prueba. Esto puede atribuirse a diversos factores como su porosidad, procesamiento de los biomateriales, tamaño de partícula de matriz y técnica de ensamblaje.

9.4 Influencia del microambiente en la expresión de marcadores condrogénicos y osteogénicos.

Debido a que solo analizamos un tiempo en la expresión génica, no podemos establecer



la progresión de la condrogénesis. Sin embargo, sí podemos analizar la influencia del microambiente o el sistema de cultivo para los diferentes grupos en un mismo tiempo. Este tipo de abordaje no es comúnmente analizado por aquellos diseños que proponen andamios bifásicos osteocondrales, limitándose a evaluar la expresión génica de cada fase por separado, omitiendo la influencia que pudiera llegar a tener el microambiente para la diferenciación osteogénica y condrogénica. A pesar de que solo se sembró la fase que simula al cartílago, existe la posibilidad de que algunas de estas células hayan migrado a la fase que simula al hueso y que esto, probablemente, influyera en el perfil de expresión génica, regulando los marcadores osteogénicos al simular el nicho nativo a través de la comunicación celular heterotípica.¹⁹⁹ Resultados similares obtuvieron Li y col.⁸³ en un andamio de FS acoplado a una cerámica, donde al analizar la expresión génica al día 14 para *PA*, *COL X* y *COL I* observaron menor expresión cuando el cultivo era bifásico contra la expresión del cultivo monofásico. A pesar de que en nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, la tendencia nos sugiere que el desarrollo y mantenimiento del fenotipo condrocítico fue preferencialmente fomentado por el cultivo en el andamio bifásico, más que en el monofásico.

En resumen, el presente trabajo logró integrar tres biomateriales (FS, MCB, MHB) en un andamio bifásico para mimetizar el tejido OC mediante una técnica sencilla y reproducible, demostrando ser adecuado para la adhesión y proliferación celular de la hADSC, además de ser capaz de estimular la expresión de genes y proteínas características del tejido OC.



CAPÍTULO X

CONCLUSIONES

Las MSCs aisladas bajo condiciones xeno-free mostraron el inmunofenotipo adecuado para su uso en terapia celular (CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD14⁻).

La estrategia de descelularización con buffers hipotónicos minimiza la presencia de condrocitos xenogénicos, ideal para futuros ensayos pre-clínicos.

La interacción de la MCB con la FS da lugar a topografías rugosas en los poros del implante, facilitando la adhesión y proliferación celular.

Empleando una técnica sencilla y altamente reproducible, nuestro sistema de andamiaje bifásico de tres componentes (MCB/FS-MHB) provee un entorno que mimetiza el tejido osteocondral y soporta la proliferación, adhesión, y diferenciación de las células, con una distribución homogénea, donde las células son capaces de secretar colágeno tipo II a la MEC. Por lo anterior se acepta la hipótesis propuesta.

Este trabajo representa la base para posteriores estudios *in vivo* en el campo de la regeneración del tejido osteocondral.



BIBLIOGRAFÍA

1. Toegel, S. *et al.* Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Mol. Biol.* **8**, 13 (2007).
2. Kisiday, J. D., Jin, M., DiMicco, M. a, Kurz, B. & Grodzinsky, A. J. Effects of dynamic compressive loading on chondrocyte biosynthesis in self-assembling peptide scaffolds. *J. Biomech.* **37**, 595–604 (2004).
3. Vos, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1211–1259 (2017).
4. Tamaddon, M., Wang, L., Liu, Z. & Liu, C. Osteochondral tissue repair in osteoarthritic joints: clinical challenges and opportunities in tissue engineering. *Bio-Design Manuf.* **1**, 101–114 (2018).
5. Yan, L. P. *et al.* Bilayered silk/silk-nanoCaP scaffolds for osteochondral tissue engineering: In vitro and in vivo assessment of biological performance. *Acta Biomater.* **12**, 227–241 (2015).
6. Farokhi, M. *et al.* Silk fibroin scaffolds for common cartilage injuries: Possibilities for future clinical applications. *Eur. Polym. J.* **115**, 251–267 (2019).
7. Álvarez-lozano, E., Lara-arias, J., Mendoza-lemus, Ó. & Martínez-rodríguez, H. Ingeniería tisular en la reparacion de las lesiones articulares. *Ortho-tips* **5**, 308–314 (2009).
8. German, D., Falke, F. & Atala, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch.argent.pediatr* **98**, 103–115 (2000).
9. Ansari, S., Khorshidi, S. & Karkhaneh, A. Engineering of gradient osteochondral tissue: From nature to lab. *Acta Biomater.* **87**, 41–54 (2019).
10. Di Luca, A., Van Blitterswijk, C. & Moroni, L. The osteochondral interface as a gradient tissue: From development to the fabrication of gradient scaffolds for regenerative medicine. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **105**, 34–52 (2015).
11. Araya, J. Estudio morfológico comparativo de un hueso liofilizado fabricado en Chile y de un hueso comercial (bio-oss). (2006).
12. Li, G. *et al.* Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 223 (2013).



13. Donell, S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev.* **4**, 221–229 (2019).
14. Kim, Y. S., Majid, M., Melchiorri, A. J. & Mikos, A. G. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng. Transl. Med.* **4**, 83–95 (2019).
15. Ma, Y. *et al.* Imaging of the region of the osteochondral junction (OCJ) using a 3D adiabatic inversion recovery prepared ultrashort echo time cones (3D IR-UTE-cones) sequence at 3 T. *NMR Biomed.* **32**, e4080 (2019).
16. Longo, U. G. *et al.* Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.* **2012**, 1–9 (2012).
17. Matsiko, A., Levingstone, T. & O'Brien, F. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials (Basel).* **6**, 637–668 (2013).
18. Knight, M., Wang, C., Pacifici, M. & Fernandez, P. Development of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, S2–S3 (2013).
19. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* **4**, 30–35 (2002).
20. Sopena, J., Carrillo, J. & Rubio, M. Estructura y función del cartílago articular. *En Portada/ Armas frente a la patología articular* 24–26
21. Chung, C. & Burdick, J. a. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 243–62 (2008).
22. Jadin, K. D. *et al.* Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3d imaging and analysis. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1109–19 (2005).
23. Ortíz, M. *Tejido óseo y cartílago.*
24. Temeno, J. S. & Mikos, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* **21**, 431–440 (2000).
25. Jing, Y. *et al.* Chondrogenesis and osteogenesis are one continuous developmental and lineage defined biological process. *Sci. Rep.* **7**, 10020 (2017).
26. Kock, L., van Donkelaar, C. C. & Ito, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* **347**, 613–27 (2012).
27. Fortier, L. a, Barker, J. U., Strauss, E. J., McCarrel, T. M. & Cole, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **469**, 2706–15 (2011).
28. Bastiaansen-jenniskens, Y. M. *A Novel Approach to Stimulate Cartilage Repair: Targeting Collagen Turnover.* (2009).
29. Khan, I. M. *et al.* In vitro growth factor-induced bio engineering of mature articular



- cartilage. *Biomaterials* **34**, 1478–87 (2013).
30. Lee, S.-H. & Shin, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 339–59 (2007).
 31. Longobardi, L. *et al.* Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. bone Miner. Res.* **21**, 626–36 (2006).
 32. Lepage, S. I. M. *et al.* Beyond Cartilage Repair: The Role of the Osteochondral Unit in Joint Health and Disease. *Tissue Eng. Part B Rev.* **25**, 114–125 (2019).
 33. Escobar Ivirico, J. L., Bhattacharjee, M., Kuyinu, E., Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Regenerative Engineering for Knee Osteoarthritis Treatment: Biomaterials and Cell-Based Technologies. *Engineering* **3**, 16–27 (2017).
 34. Gracitelli, G. C., Moraes, V. Y., Franciozi, C. E., Luzo, M. V & Belloti, J. C. Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. Gracitelli, G. C.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). doi:10.1002/14651858.CD010675.pub2
 35. Beris, A. E., Lykissas, M. G., Papageorgiou, C. D. & Georgoulis, A. D. Advances in articular cartilage repair. *Injury* **36**, S14-23 (2005).
 36. Nieminen, H. J., Salmi, A., Karppinen, P., Hæggström, E. & Hacking, S. A. The potential utility of high-intensity ultrasound to treat osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 1784–1799 (2014).
 37. Clar, C. *et al.* Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* **9**, iii–iv, ix–x, 1–82 (2005).
 38. Randsborg, P.-H. *et al.* Focal cartilage defects in the knee –a randomized controlled trial comparing autologous chondrocyte implantation with arthroscopic debridement. *BMC Musculoskelet. Disord.* **17**, 117 (2016).
 39. Mancò, A. *et al.* Microfracture versus microfracture and platelet-rich plasma: arthroscopic treatment of knee chondral lesions. A two-year follow-up study. *Joints* **4**, 142–147 (2016).
 40. Gormeli, G. *et al.* Clinical Effects of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid as an Additional Therapy for Talar Osteochondral Lesions Treated with Microfracture Surgery: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Foot Ankle Int.* **36**, 891–900 (2015).



41. Manunta, A. F. & Manconi, A. The treatment of chondral lesions of the knee with the microfracture technique and platelet-rich plasma. *Joints* **1**, 167–70 (2013).
42. Koh, Y.-G., Kwon, O.-R., Kim, Y.-S., Choi, Y.-J. & Tak, D.-H. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **32**, 97–109 (2016).
43. Pers, Y.-M. *et al.* Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 847–856 (2016).
44. Jo, C. H. *et al.* Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells* **32**, 1254–1266 (2014).
45. Vega, A. *et al.* Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* **99**, 1681–90 (2015).
46. Orozco, L. *et al.* Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplant. J.* **95**, 1535–1541 (2013).
47. Saw, K.-Y. *et al.* Articular Cartilage Regeneration With Autologous Peripheral Blood Stem Cells Versus Hyaluronic Acid: A Randomized Controlled Trial. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **29**, 684–694 (2013).
48. Lee, M. C. *et al.* A placebo-controlled randomised trial to assess the effect of TGF- β 1-expressing chondrocytes in patients with arthritis of the knee. *Bone Joint J.* **97-B**, 924–932 (2015).
49. Cherian, J. J. *et al.* Preliminary results of a phase II randomized study to determine the efficacy and safety of genetically engineered allogeneic human chondrocytes expressing TGF- β 1 in patients with grade 3 chronic degenerative joint disease of the knee. *Osteoarthr. Cartil.* **23**, 2109–2118 (2015).
50. Ha, C.-W. *et al.* A Multicenter, Single-Blind, Phase IIa Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell-Mediated Gene Therapy in Degenerative Knee Arthritis Patients. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **26**, 125–130 (2015).
51. Zheng, M.-H. *et al.* Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation (MACI[®]): Biological and Histological Assessment. *Tissue Eng.* **13**, 737–746 (2007).
52. Kon, E. *et al.* A novel nano-composite multi-layered biomaterial for treatment of osteochondral lesions: Technique note and an early stability pilot clinical trial.



- Injury* **41**, 693–701 (2010).
53. Kon, E. *et al.* Novel Nano-composite Multilayered Biomaterial for Osteochondral Regeneration: A Pilot Clinical Trial. *Am. J. Sports Med.* **39**, 1180–1190 (2011).
 54. Panseri, S. *et al.* Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **20**, 1182–1191 (2012).
 55. Kon, E. *et al.* Clinical Results and MRI Evolution of a Nano-Composite Multilayered Biomaterial for Osteochondral Regeneration at 5 Years. *Am. J. Sports Med.* **42**, 158–165 (2014).
 56. Kon, E. *et al.* A one-step treatment for chondral and osteochondral knee defects: clinical results of a biomimetic scaffold implantation at 2 years of follow-up. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 2437–2444 (2014).
 57. Getgood, A. M. J. *et al.* Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic scaffold based on a collagen–glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model. *Knee* **19**, 422–430 (2012).
 58. Matsiko, A., Levingstone, T. & O'Brien, F. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials (Basel)*. **6**, 637–668 (2013).
 59. Dell'Osso, G. *et al.* The biphasic bioresorbable scaffold (TruFit®) in the osteochondral knee lesions: long-term clinical and MRI assessment in 30 patients. *Musculoskelet. Surg.* **100**, 93–96 (2016).
 60. Gelber, P. E. *et al.* Magnetic resonance evaluation of TruFit® plugs for the treatment of osteochondral lesions of the knee shows the poor characteristics of the repair tissue. *Knee* **21**, 827–832 (2014).
 61. Bekkers, J. E. J. *et al.* Articular Cartilage Evaluation After TruFit Plug Implantation Analyzed by Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC). *Am. J. Sports Med.* **41**, 1290–1295 (2013).
 62. Fuentes-Mera, L., Camacho, A., Moncada-Saucedo, N. K. & Peña-Martínez, V. Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering. in *Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization and Applications* (InTech, 2017). doi:10.5772/intechopen.68172
 63. Keane, T. J. & Badylak, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin. Pediatr. Surg.* **23**, 112–118 (2014).
 64. Fragonas, E. *et al.* Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* **21**, 795–801 (2000).



65. Hunziker, E. B. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 22–32 (2001).
66. Lahner, M. *et al.* Biomimetic structured surfaces increase primary adhesion capacity of cartilage implants. *Technol. Heal. Care* **23**, 205–213 (2015).
67. Ding, X. *et al.* Integrated Trilayered Silk Fibroin Scaffold for Osteochondral Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 16696–16705 (2014).
68. Aydin, H. M. A Three-Layered Osteochondral Plug: Structural, Mechanical, and in vitro Biocompatibility Analysis. *Adv. Eng. Mater.* **13**, B511–B517 (2011).
69. Li, Z. & Zhang, M. Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *Wiley Interisci.* 486–93 (2005). doi:10.1002/jbm.a.30449
70. Jan, J. Á. *et al.* Mechanical Response of Porous Scaffolds for Cartilage Engineering. *Physiol. Res.* **56**, S17–S25 (2007).
71. Vinatier, C. & Guicheux, J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 139–144 (2016).
72. Moncada-Saucedo, N. K. *et al.* A Bioactive Cartilage Graft of IGF1-Transduced Adipose Mesenchymal Stem Cells Embedded in an Alginate/Bovine Cartilage Matrix Tridimensional Scaffold. *Stem Cells Int.* **2019**, 1–15 (2019).
73. Shangkai, C. *et al.* Transplantation of Allogeneic Chondrocytes Cultured in Fibroin Sponge and Stirring Chamber to Promote Cartilage Regeneration. *Tissue Eng.* **13**, 483–492 (2007).
74. Li, Z. *et al.* Composite poly(L-lactic-acid)/silk fibroin scaffold prepared by electrospinning promotes chondrogenesis for cartilage tissue engineering. *J. Biomater. Appl.* **30**, 1552–1565 (2016).
75. Schulze-Tanzil, G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann. Anat.* **191**, 325–38 (2009).
76. Brodtkin, K. R., García, a J. & Levenston, M. E. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* **25**, 5929–38 (2004).
77. Martin, I., Miot, S., Barbero, A., Jakob, M. & Wendt, D. Osteochondral tissue engineering. *J. Biomech.* **40**, 750–65 (2007).
78. Augst, A. *et al.* Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. *J. R. Soc. Interface* **5**, 929–939 (2008).



79. Chen, K., Shi, P., Teh, T. K. H., Toh, S. L. & Goh, J. C. In vitro generation of a multilayered osteochondral construct with an osteochondral interface using rabbit bone marrow stromal cells and a silk peptide-based scaffold. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 284–293 (2013).
80. Saha, S. *et al.* Osteochondral Tissue Engineering In Vivo: A Comparative Study Using Layered Silk Fibroin Scaffolds from Mulberry and Nonmulberry Silkworms. *PLoS One* **8**, e80004 (2013).
81. Ghezzi, C. E. *et al.* Multilayered dense collagen-silk fibroin hybrid: a platform for mesenchymal stem cell differentiation towards chondrogenic and osteogenic lineages. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **4**, (2015).
82. Chen, K., Teh, T. K. H., Ravi, S., Toh, S. L. & Goh, J. C. H. Osteochondral Interface Generation by Rabbit Bone Marrow Stromal Cells and Osteoblasts Coculture. *Tissue Eng. Part A* **18**, 1902–1911 (2012).
83. Li, J. J. *et al.* A biphasic scaffold based on silk and bioactive ceramic with stratified properties for osteochondral tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B* **3**, 5361–5376 (2015).
84. Ribeiro, V., Pina, S. & Oliveira, J. M. *Regenerative Strategies for the Treatment of Knee Joint Disabilities*. **21**, (Springer International Publishing, 2017).
85. Maghdouri-White, Y., Bowlin, G. L., Lemmon, C. A. & Dréau, D. Bioengineered silk scaffolds in 3D tissue modeling with focus on mammary tissues. *Mater. Sci. Eng. C* **59**, 1168–1180 (2016).
86. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
87. Awad, H. a, Wickham, M. Q., Leddy, H. a, Gimble, J. M. & Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* **25**, 3211–22 (2004).
88. Singh, Y. P., Bhardwaj, N. & Mandal, B. B. Potential of Agarose/Silk Fibroin Blended Hydrogel for in Vitro Cartilage Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21236–21249 (2016).
89. Park, H. & Lee, K. Y. Facile control of RGD-alginate/hyaluronate hydrogel formation for cartilage regeneration. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1107–1112 (2011).
90. Jung, S. H., Jang, J. W., Kim, S. H. & Hong, H. H. Articular Cartilage Regeneration Using Hyaluronic Acid Loaded PLGA Scaffold by Emulsion Freeze-Drying Method. *Tissue Eng. Regen. Med.* **5**, 643–649 (2008).



91. Jaipaew, J., Wangkulangkul, P., Meesane, J., Raungrut, P. & Puttawibul, P. Mimicked cartilage scaffolds of silk fibroin/hyaluronic acid with stem cells for osteoarthritis surgery: Morphological, mechanical, and physical clues. *Mater. Sci. Eng. C* **64**, 173–182 (2016).
92. Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z. & Gao, C. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1961–8 (2007).
93. Sawatjui, N. *et al.* Silk fibroin/gelatin–chondroitin sulfate–hyaluronic acid effectively enhances in vitro chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C* **52**, 90–96 (2015).
94. Filová, E. *et al.* Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol. Res.* **56 Suppl 1**, S5–S16 (2007).
95. O'Brien, F. J., Harley, B. a, Yannas, I. V & Gibson, L. J. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* **26**, 433–41 (2005).
96. Lv, Q., Hu, K., Feng, Q. & Cui, F. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: Preparation, properties, and cytocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **84A**, 198–207 (2008).
97. Yang, Q. *et al.* A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **29**, 2378–87 (2008).
98. Yang, Q. *et al.* Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin. Med. J. (Engl)*. **124**, 3930–3938 (2011).
99. Raghunath, J., Rollo, J., Sales, K. M., Butler, P. E. & Seifalian, A. M. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **46**, 73–84 (2007).
100. B Malafaya, P. P. *et al.* Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16**, 1077–85 (2005).
101. Panjapheree, K., Kamonmattayakul, S. & Meesane, J. Biphasic scaffolds of silk fibroin film affixed to silk fibroin/chitosan sponge based on surgical design for cartilage defect in osteoarthritis. *Mater. Des.* **141**, 323–332 (2018).



102. Mottaghitlab, F. *et al.* Silk as a potential candidate for bone tissue engineering. *J. Control. Release* **215**, 112–128 (2015).
103. Bhattacharjee, P. *et al.* Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. *Acta Biomater.* **63**, 1–17 (2017).
104. Yeelack, W. Hybrid Biomimetic Scaffold of Silk fibroin/collagen Type I Film for Tissue Engineering: Preparation and Characterization. (Prince of Songkla University, 2014).
105. Zhao, C. & Asakura, T. Structure of Silk studied with NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **39**, 301–352 (2001).
106. Li, G. *et al.* Silk-Based Biomaterials in Biomedical Textiles and Fiber-Based Implants. *Adv. Healthc. Mater.* **4**, 1134–1151 (2015).
107. Hennecke, K. *et al.* Bundles of Spider Silk, Braided into Sutures, Resist Basic Cyclic Tests: Potential Use for Flexor Tendon Repair. *PLoS One* **8**, (2013).
108. Gimenes, M. L., Silva, V. R., Vieira, M. G. a., Silva, M. G. C. & Scheer, A. P. High Molecular Sericin from *Bombyx mori* Cocoons: Extraction and Recovering by Ultrafiltration. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **5**, 266–271 (2014).
109. Wang, P. *et al.* Covalent Immobilization of Catalase onto Regenerated Silk Fibroins via Tyrosinase-Catalyzed Cross-Linking. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **177**, 472–485 (2015).
110. Ju, H. W. *et al.* Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-model. *Int. J. Biol. Macromol.* **85**, 29–39 (2016).
111. Altman, A. M., Gupta, V., Ríos, C. N., Alt, E. U. & Mathur, A. B. Adhesion, migration and mechanics of human adipose-tissue-derived stem cells on silk fibroin–chitosan matrix. *Acta Biomater.* **6**, 1388–1397 (2010).
112. Bai, S. *et al.* Silk scaffolds with tunable mechanical capability for cell differentiation. *Acta Biomater.* **20**, 22–31 (2015).
113. Dong, Y. *et al.* Fabrication and characterization of silk fibroin-coated liposomes for ocular drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **91**, 82–90 (2015).
114. Mwangi, T. K. *et al.* Synthesis and characterization of silk fibroin microparticles for intra-articular drug delivery. *Int. J. Pharm.* **485**, 7–14 (2015).
115. Germershaus, O., Werner, V., Kutscher, M. & Meinel, L. Deciphering the mechanism of protein interaction with silk fibroin for drug delivery systems. *Biomaterials* **35**, 3427–3434 (2014).
116. Gil, E. S., Frankowski, D. J., Spontak, R. J. & Hudson, S. M. Swelling Behavior



- and Morphological Evolution of Mixed Gelatin/Silk Fibroin Hydrogels. *Biomacromolecules* **6**, 3079–3087 (2005).
117. Kim, D. W. *et al.* Novel fabrication of fluorescent silk utilized in biotechnological and medical applications. *Biomaterials* **70**, 48–56 (2015).
 118. Teramoto, H. & Kojima, K. Production of Bombyx mori Silk Fibroin Incorporated with Unnatural Amino Acids. *Biomacromolecules* **15**, 2682–2690 (2014).
 119. Burke, K. A., Roberts, D. C. & Kaplan, D. L. Silk Fibroin Aqueous-Based Adhesives Inspired by Mussel Adhesive Proteins. *Biomacromolecules* **17**, 237–245 (2016).
 120. Chung, D. E. *et al.* Effects of different Bombyx mori silkworm varieties on the structural characteristics and properties of silk. *Int. J. Biol. Macromol.* **79**, 943–951 (2015).
 121. Malay, A. D. *et al.* Relationships between physical properties and sequence in silkworm silks. *Sci. Rep.* **6**, 27573 (2016).
 122. Cao, T.-T. & Zhang, Y.-Q. Processing and characterization of silk sericin from Bombyx mori and its application in biomaterials and biomedicines. *Mater. Sci. Eng. C* **61**, 940–952 (2016).
 123. Vepari, C. & Kaplan, D. L. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 991–1007 (2007).
 124. Aznar-Cervantes, S. D., Vicente-Cervantes, D., Meseguer-Olmo, L., Cenis, J. L. & Lozano-Pérez, A. A. Influence of the protocol used for fibroin extraction on the mechanical properties and fiber sizes of electrospun silk mats. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 1945–1950 (2013).
 125. Zurovec, M. *et al.* Sericin Composition in the Silk of Antheraea yamamai. *Biomacromolecules* **17**, 1776–1787 (2016).
 126. Sehnal, F. & Žurovec, M. Construction of Silk Fiber Core in Lepidoptera. *Biomacromolecules* **5**, 666–674 (2004).
 127. Wilson, D., Valluzzi, R. & Kaplan, D. Conformational Transitions in Model Silk Peptides. *Biophys. J.* **78**, 2690–2701 (2000).
 128. Fedic, R. Correlation between Fibroin Amino Acid Sequence and Physical Silk Properties. *J. Biol. Chem.* **278**, 35255–35264 (2003).
 129. Zhou, C.-Z. *et al.* Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **44**, 119–122 (2001).
 130. Murphy, A. R. & Kaplan, D. L. Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin. *J. Mater. Chem.* **19**, 6443 (2009).



131. Fedic, R., Zurovec, M. & Sehnal, F. The Silk of Lepidoptera. *J. Insect Biotechnol. Sericology* **71**, 1–15 (2002).
132. He, S.-J., Valluzzi, R. & Gido, S. P. Silk I structure in Bombyx mori silk foams. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 187–195 (1999).
133. Asakura, T. *et al.* A repeated beta-turn structure in poly(Ala-Gly) as a model for silk I of Bombyx mori silk fibroin studied with two-dimensional spin-diffusion NMR under off magic angle spinning and rotational echo double resonance. *J. Mol. Biol.* **306**, 291–305 (2001).
134. Ming, J., Pan, F. & Zuo, B. Influence factors analysis on the formation of silk I structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **75**, 398–401 (2015).
135. Hino, T., Tanimoto, M. & Shimabayashi, S. Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere. *J. Colloid Interface Sci.* **266**, 68–73 (2003).
136. Valluzzi, R., He, S. J., Gido, S. P. & Kaplan, D. Bombyx mori silk fibroin liquid crystallinity and crystallization at aqueous fibroin–organic solvent interfaces. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 227–236 (1999).
137. Valluzzi, R., Gido, S. P., Muller, W. & Kaplan, D. L. Orientation of silk III at the air-water interface. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 237–242 (1999).
138. Li, M., Tao, W., Kuga, S. & Nishiyama, Y. Controlling molecular conformation of regenerated wild silk fibroin by aqueous ethanol treatment. *Polym. Adv. Technol.* **14**, 694–698 (2003).
139. Zhang, L., Bai, Z., Ban, H. & Liu, L. Effects of the amino acid sequence on thermal conduction through β -sheet crystals of natural silk protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 29007–29013 (2015).
140. Carrascoza Mayen, J. F., Lupan, A., Cosar, C., Kun, A.-Z. & Silaghi-Dumitrescu, R. On the roles of the alanine and serine in the β -sheet structure of fibroin. *Biophys. Chem.* **197**, 10–17 (2015).
141. Grogan, S. P., Miyaki, S., Asahara, H., D’Lima, D. D. & Lotz, M. K. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R85 (2009).
142. Jang, M. J. & Um, I. C. Effect of different Bombyx mori silkworm varieties on the wet spinning of silk fibroin. *Int. J. Ind. Entomol.* **30**, 75–80 (2015).
143. Wang, Y., Kim, H.-J., Vunjak-Novakovic, G. & Kaplan, D. L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* **27**, 6064–6082 (2006).



144. Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K. & Hofmann, S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **31**, 1–16 (2016).
145. Altman, G. H. *et al.* Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, 401–416 (2003).
146. Zaoming, W., Codina, R., Fernández-Caldas, E. & Lockey, R. F. Partial characterization of the silk allergens in mulberry silk extract. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **6**, 237–41 (1996).
147. Chirila, T. V., Suzuki, S. & McKirdy, N. C. Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from *Bombyx mori* silk cocoons. *Prog. Biomater.* **5**, 135–145 (2016).
148. Chirila, T. V, Suzuki, S., Bray, L. J., Barnett, N. L. & Harkin, D. G. Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on *Bombyx mori* sericin membranes. *Prog. Biomater.* **2**, 14 (2013).
149. Liu, B. *et al.* Silk structure and degradation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **131**, 122–128 (2015).
150. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials* **33**, 2848–2857 (2012).
151. Vishwanath, V., Pramanik, K. & Biswas, A. Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **27**, 657–674 (2016).
152. Samal, S. K. *et al.* Silk/chitosan biohybrid hydrogels and scaffolds via green technology. *RSC Adv.* **4**, 53547–53556 (2014).
153. Bhardwaj, N. *et al.* Potential of 3-D tissue constructs engineered from bovine chondrocytes/silk fibroin-chitosan for in vitro cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 5773–5781 (2011).
154. Tamada, Y. New Process to Form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromolecules* **6**, 3100–3106 (2005).
155. Foss, C., Migliaresi, C. & Motta, A. The optimization of a scaffold for cartilage regeneration. *Organogenesis* **9**, 19–21 (2013).
156. Zhang, H., Liu, X., Yang, M. & Zhu, L. Silk fibroin/sodium alginate composite nanofibrous scaffold prepared through thermally induced phase-separation (TIPS) method for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **55**, 8–13 (2015).
157. Wang, Y., Kim, U.-J., Blasioli, D. J., Kim, H.-J. & Kaplan, D. L. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **26**, 7082–7094 (2005).



158. Zheng, L., Yang, J., Fan, H. & Zhang, X. Material-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is material-dependent. *Exp. Ther. Med.* **7**, 1147–1150 (2014).
159. Uebersax, L., Merkle, H. P. & Meinel, L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Control. Release* **127**, 12–21 (2008).
160. WANG, Y., BLASIOLI, D., KIM, H., KIM, H. & KAPLAN, D. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* **27**, 4434–4442 (2006).
161. Bhattacharjee, M., Chameettachal, S., Pahwa, S., Ray, A. R. & Ghosh, S. Strategies for Replicating Anatomical Cartilaginous Tissue Gradient in Engineered Intervertebral Disc. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 183–193 (2014).
162. Chen, C.-H. *et al.* Cartilage Tissue Engineering with Silk Fibroin Scaffolds Fabricated by Indirect Additive Manufacturing Technology. *Materials (Basel)*. **7**, 2104–2119 (2014).
163. Ni, Y. *et al.* Construction of a functional silk-based biomaterial complex with immortalized chondrocytes in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **102**, 1071–1078 (2014).
164. Zeng, C. *et al.* Silk fibroin porous scaffolds for nucleus pulposus tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **37**, 232–240 (2014).
165. Bhardwaj, N. & Kundu, S. C. Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **85**, 325–333 (2011).
166. Sun, K., Li, R., Jiang, W., Sun, Y. & Li, H. Comparison of three-dimensional printing and vacuum freeze-dried techniques for fabricating composite scaffolds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477**, 1085–1091 (2016).
167. Tang, Y., Cao, C., Ma, X., Chen, C. & Zhu, H. Study on the preparation of collagen-modified silk fibroin films and their properties. *Biomed. Mater.* **1**, 242–246 (2006).
168. Zhou, T., Wu, J., Liu, J., Luo, Y. & Wan, Y. Fabrication and characterization of layered chitosan/silk fibroin/nano-hydroxyapatite scaffolds with designed composition and mechanical properties. *Biomed. Mater.* **10**, 045013 (2015).
169. Otaka, A. *et al.* Observation and Quantification of Chondrocyte Aggregation Behavior on Fibroin Surfaces Using Voronoi Partition. *Tissue Eng. Part C Methods* **19**, 396–404 (2013).



170. Otaka, A. *et al.* How do chondrocytes aggregate on fibroin substrate. in *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)* 405–408 (IEEE, 2013). doi:10.1109/EMBC.2013.6609522
171. Talukdar, S., Nguyen, Q. T., Chen, A. C., Sah, R. L. & Kundu, S. C. Effect of initial cell seeding density on 3D-engineered silk fibroin scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 8927–8937 (2011).
172. Su, D., Jiang, L., Chen, X., Dong, J. & Shao, Z. Enhancing the Gelation and Bioactivity of Injectable Silk Fibroin Hydrogel with Laponite Nanoplatelets. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 9619–9628 (2016).
173. Selvakumar, R. *et al.* Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 43 (2015).
174. Zeng, S. *et al.* Characterization of Silk Fibroin/Chitosan 3D Porous Scaffold and In Vitro Cytology. *PLoS One* **10**, e0128658 (2015).
175. Shi, P. *et al.* Silk Fibroin-Based Complex Particles with Bioactive Encrustation for Bone Morphogenetic Protein 2 Delivery. *Biomacromolecules* **14**, 4465–4474 (2013).
176. Correia, C. *et al.* Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater.* **8**, 2483–2492 (2012).
177. Kim, H. J. *et al.* Bone Regeneration on Macroporous Aqueous-Derived Silk 3-D Scaffolds. *Macromol. Biosci.* **7**, 643–655 (2007).
178. Meinel, L. *et al.* Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* **37**, 688–698 (2005).
179. Kim, H. J., Kim, U.-J., Vunjak-Novakovic, G., Min, B.-H. & Kaplan, D. L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* **26**, 4442–4452 (2005).
180. Gruchenberg, K. *et al.* In vivo performance of a novel silk fibroin scaffold for partial meniscal replacement in a sheep model. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **23**, 2218–2229 (2015).
181. Park, Y. R. *et al.* Three-dimensional electrospun silk-fibroin nanofiber for skin tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **93**, 1567–1574 (2016).
182. Rockwood, D. N. *et al.* Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nat. Protoc.* **6**, 1612–1631 (2011).



183. Kim, U.-J., Park, J., Joo Kim, H., Wada, M. & Kaplan, D. L. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* **26**, 2775–2785 (2005).
184. Wang, Y. *et al.* The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration. *Biomaterials* **31**, 4672–4681 (2010).
185. Han, K. *et al.* Effect of pore sizes of silk scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromol. Res.* **23**, 1091–1097 (2015).
186. Moon, B. M. *et al.* Fabrication and characterization of three-dimensional silk fibroin scaffolds using a mixture of salt/sucrose. *Macromol. Res.* **22**, 1268–1274 (2014).
187. Makaya, K., Terada, S., Ohgo, K. & Asakura, T. Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. *J. Biosci. Bioeng.* **108**, 68–75 (2009).
188. Nazarov, R., Jin, H.-J. & Kaplan, D. L. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules* **5**, 718–726 (2004).
189. Foss, C., Merzari, E., Migliaresi, C. & Motta, A. Silk Fibroin/Hyaluronic Acid 3D Matrices for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **14**, 38–47 (2013).
190. Mottaghitab, F., Farokhi, M., Shokrgozar, M. A., Atyabi, F. & Hosseinkhani, H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J. Control. Release* **206**, 161–176 (2015).
191. Cao, Y. & Wang, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1514–1524 (2009).
192. Wang, Y. *et al.* In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials* **29**, 3415–3428 (2008).
193. Kluge, J. A., Thurber, A., Leisk, G. G., Kaplan, D. L. & Luis Dorfmann, A. A model for the stretch-mediated enzymatic degradation of silk fibers. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **3**, 538–547 (2010).
194. Nooeaid, P., Salih, V., Beier, J. P. & Boccaccini, A. R. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2247–2270 (2012).
195. Makris, E. a, Hu, J. C. & Athanasiou, K. a. Hypoxia-induced collagen crosslinking as a mechanism for enhancing mechanical properties of engineered articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 634–41 (2013).
196. Nava, M. M., Draghi, L., Giordano, C. & Pietrabissa, R. The effect of scaffold pore



- size in cartilage tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **14**, (2016).
197. Di Luca, A. *et al.* Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci. Rep.* **6**, 22898 (2016).
198. Xiao, X. *et al.* The promotion of angiogenesis induced by three-dimensional porous beta-tricalcium phosphate scaffold with different interconnection sizes via activation of PI3K/Akt pathways. *Sci. Rep.* **5**, 9409 (2015).
199. Kirkpatrick, C. J. Modelling the regenerative niche: a major challenge in biomaterials research. *Regen. Biomater.* **2**, 267–272 (2015).
200. Chen, K., Ng, K. S., Ravi, S., Goh, J. C. H. & Toh, S. L. In vitro generation of whole osteochondral constructs using rabbit bone marrow stromal cells, employing a two-chambered co-culture well design. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 294–304 (2016).
201. Çakmak, S., Çakmak, A. S., Kaplan, D. L. & Gümüşderelioğlu, M. A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **16**, 1212–1226 (2016).
202. Li, J. J., Kaplan, D. L. & Zreiqat, H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. *J. Mater. Chem. B* **2**, 7272–7306 (2014).
203. Moncada-Saucedo, N. K. Scaffolds Based on Silk Fibroin for Osteochondral Tissue Engineering. *Res. Dev. Mater. Sci.* **10**, (2019).
204. Nukavarapu, S. P. & Dorcenus, D. L. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. *Biotechnol. Adv.* **31**, 706–721 (2013).
205. Kurth, T. *et al.* Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 1178–89 (2007).
206. Luo, Z. *et al.* Mechano growth factor (MGF) and transforming growth factor (TGF)- β 3 functionalized silk scaffolds enhance articular hyaline cartilage regeneration in rabbit model. *Biomaterials* **52**, 463–475 (2015).
207. Wang, X. *et al.* Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J. Control. Release* **134**, 81–90 (2009).
208. Shepherd, J. H. *et al.* Effect of fiber crosslinking on collagen-fiber reinforced collagen-chondroitin-6-sulfate materials for regenerating load-bearing soft tissues. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 176–84 (2013).
209. Farokhi, M. *et al.* Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue



- engineering. *Biotechnology Advances* **36**, (2018).
210. Ribeiro, V. P. *et al.* Enzymatically Cross-Linked Silk Fibroin-Based Hierarchical Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 3781–3799 (2019).
211. Bhat, A., Hoch, A. I., Decaris, M. L. & Leach, J. K. Alginate hydrogels containing cell-interactive beads for bone formation. *FASEB J.* **27**, 4844–52 (2013).
212. Kim, H. J. *et al.* In vivo degradation profile of porcine cartilage-derived extracellular matrix powder scaffolds using a non-invasive fluorescence imaging method. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **27**, 177–90 (2016).
213. Benders, K. E. M. *et al.* Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. *Trends Biotechnol.* **31**, 169–176 (2013).
214. Armiento, A. R., Stoddart, M. J., Alini, M. & Eglin, D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomater.* **65**, 1–20 (2018).
215. Ciuffreda, M. C., Malpasso, G., Musarò, P., Turco, V. & Gneccchi, M. Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages. *Methods Mol. Biol.* **1416**, 149–58 (2016).
216. Tavassoli, A., Mahdavi-shahri, N., Matin, M. M. & Fereidoni, M. Bovine Articular Cartilage Decellularized Matrix as a Scaffold for Use in Cartilage Tissue Engineering.
217. Luo, L., Eswaramoorthy, R., Mulhall, K. J. & Kelly, D. J. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **55**, 21–31 (2016).
218. Bogdanova, A., Bērziņš, U., Brūvere, R., Eivazova, G. & Kozlovskā, T. Adipose-derived stem cells cultured in autologous serum maintain the characteristics of mesenchymal stem cells. *Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B. Nat. Exact, Appl. Sci.* **64**, 106–113 (2010).
219. Pei, M., Li, J., Shoukry, M. & Zhang, Y. A REVIEW OF DECELLULARIZED STEM CELL MATRIX: A NOVEL CELL EXPANSION SYSTEM FOR CARTILAGE TISSUE ENGINEERING. *Eur. Cells Mater.* **22**, 333–343 (2011).
220. Király, K. *et al.* Safranin O reduces loss of glycosaminoglycans from bovine articular cartilage during histological specimen preparation. *Histochem. J.* **28**, 99–107 (1996).
221. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular



- fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
222. García, D. *Células progenitoras multipotentes obtenidas del tejido adiposo y su aplicación clínica*.
223. Arévalo, J., Páez, D. & Rodríguez, V. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA* **5**, 177–184 (2007).
224. Pountos, I., Corcadden, D., Emery, P. & Giannoudis, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Int. J. care Inj.* **38S4**, S23–S33 (2007).
225. Koellensperger, E. *et al.* Choosing the right type of serum for different applications of human adipose tissue-derived stem cells: influence on proliferation and differentiation abilities. *Cytotherapy* **16**, 789–799 (2014).
226. Aldahmash, A. *et al.* Human Serum is as Efficient as Fetal Bovine Serum in Supporting Proliferation and Differentiation of Human Multipotent Stromal (Mesenchymal) Stem Cells In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Rev. Reports* **7**, 860–868 (2011).
227. Lupi, O. Doenças priônicas: avaliação dos riscos envolvidos na utilização de produtos de origem bovina. *An. Bras. Dermatol.* **78**, 7–18 (2003).
228. Demoor, M. *et al.* Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2414–40 (2014).
229. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. & Ringdén, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* **31**, 890–896 (2003).
230. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L. & Badylak, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675–83 (2006).
231. Tavassoli, A., Mahdavi-shahri, N. & Matin, M. M. Bovine articular cartilage decellularized matrix as a scaffold for use in cartilage tissue engineering. *Iran. J. Vet. Sci. Technol.* **4**, 1–8 (2012).
232. Chang, C.-H. *et al.* Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 2248–57 (2014).
233. Rieder, E., Kasimir, M., Silberhumer, G., Seebacher, G. & Wolner, E.



- Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* **127**, 399–405 (2004).
234. Crapo, P., Gilbert, T. & Badylak, S. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233–3243 (2012).
235. Guilak, F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pr. Res Clin Rheumatol* **25**, 815–823 (2011).
236. de Vries–van Melle, M. L. *et al.* Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells in an Osteochondral Environment Is Mediated by the Subchondral Bone. *Tissue Eng. Part A* **20**, 23–33 (2014).
237. Yang, Q. *et al.* Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF- β 3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 12**, 6721–6733 (2017).
238. Jin, Q.-M. *et al.* Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 841–851 (2000).
239. Ding, X. *et al.* Integrated Trilayered Silk Fibroin Scaffold for Osteochondral Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. (2014).
240. Gao, C., Peng, S., Feng, P. & Shuai, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* **5**, 17059 (2017).
241. Rnjak-Kovacina, J., DesRochers, T. M., Burke, K. A. & Kaplan, D. L. The Effect of Sterilization on Silk Fibroin Biomaterial Properties. *Macromol. Biosci.* **15**, 861–874 (2015).
242. Font Tellado, S. *et al.* Fabrication and Characterization of Biphasic Silk Fibroin Scaffolds for Tendon/Ligament-to-Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **23**, 859–872 (2017).
243. Çakmak, S., Çakmak, A. S., Kaplan, D. L. & Gümüşderelioğlu, M. A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* 1212–1226 (2016). doi:10.1002/mabi.201600013
244. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* **97**, 33–44 (2006).



ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medio DMEM para cultivo de hADSCs

Este medio ya contiene 1% de glutamina por lo que solo se adiciona 1% de antibiótico y 10% de suero humano para empezar el cultivo. Para el posterior mantenimiento de las células el suero baja al 5%. Se almacena a 4°C.

Medio de diferenciación condrogénica

Se prepara tomando como base al medio DMEM alto en glucosa que ya contiene glutamina. Se adiciona ITS a una concentración de 0.010 mg/ml, dexametasona soluble a 100 nM, ácido ascórbico a 0.001 mg/ml y TGF- β 1 a 10 ng/ml.

Medio de diferenciación osteogénica

Tomando como base el medio DMEM alto en glucosa con glutamina, se adiciona dexametasona soluble a 100 nM, B-glicerofosfato 10 mM, ácido ascórbico 0.05 mM y 10 % de suero humano. Los medios suplementados son estable por dos semanas a 4°C.

Buffer de cacodilato

9.63 g de cacodilato de sodio trihidratado grado microscopia electrónica en 450 ml de H₂O. Ajustar pH a 7.3 con HCl 1:1 y almacenar en frío

Buffer de citratos

Preparar una solución stock 0.1 M de ácido cítrico anhidro y otra solución stock 0.1 M de citrato de sodio dihidratado. Tomar 9.5 ml de la primera y 41.5 ml de la segunda, aforar a 100 ml con agua destilada y ajustar a pH 6 con 5N NaOH y 1 N HCl. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de Bouin

Agregar 75 ml de ácido pícrico en solución saturada, 25 ml de formaldehído al 37% y 5 ml de ácido acético glacial. Almacenar a temperatura ambiente.

Colagenasa 0.1%

Agregar 100 mg de colagenasa en 100 ml de PBS 1X estéril. Filtrar y almacenar a -20°C



ANEXO 2

PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

Tinciones histológicas en monocapa de hADSCs diferenciadas

Tinción con rojo oleoso para evaluar adipogénesis (kit adipogénesis)

1. Remover medio y lavar con PBS 1x dos veces.
2. Agregar 0.5 ml de la solución de rojo oleoso (kit) por pozo.
3. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
4. Retirar solución de rojo oleoso y lavar con solución de lavado (kit).
5. Observar y fotografiar.

Tinción con rojo de alizarina para evaluar diferenciación osteogénica

1. Retirar medio y lavar con PBS 1X dos veces.
2. Fijar las células con formalina 4% por 15 min y lavar con H₂O
3. Agregar 1.5 ml de una solución de rojo de alizarina 2% pH 4.2, por pozo.
4. Incubar a temperatura ambiente por 5 min
5. Retirar colorante y lavar 4 veces con H₂O de la llave por 5 min cada lavado.
6. Observar y fotografiar.

Tinción con azul de Alcian para evaluar diferenciación condrogénica

1. Retirar medio y lavar con PBS 1X dos veces
2. Fijar las células con etanol al 70% por 15 min
3. Retirar etanol y lavar con H₂O dos veces.
4. Agregar 1 ml de ácido acético 3% por 15 min.
5. Agregar solución de azul de Alcian 1% pH 1 e incubar por 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en oscuridad.
6. Lavar repetidamente con alcohol ácido (1% HCl en etanol) por 20 min.
7. Lavar con H₂O 3 veces.
8. Observar y fotografiar.



Extracción de RNA con TRIzol

Fase de homogenizado

1. Agregar 1 ml de TRIzol por fase del implante. Mantener a 4°C para su pronto uso o a -80°C para su posterior uso.
2. Homogenizar con el taladro TissueRuptor.
3. Centrifugar a 12000 g por 10 min a 4°C
4. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo.

Fase de separación

1. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml que se utilizó de TRIzol.
2. Agitar en vortex por 15 min.
3. Incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12000 rcf por 15 min a 4°C
5. Remover la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo (400-500 ul aproximadamente) y transferir a un tubo nuevo. En dado caso de arrastrar la fase color rosa se puede repetir desde el paso 1 de la fase de separación.

Precipitación

1. Agregar un volumen de isopropanol frío (aproximadamente 500 ul) y 0.2 volúmenes de una solución de citrato de sodio 0.8M con NaCl 1.2M a temperatura ambiente. Puede omitirse este paso si el alginato no representa problema después de sonicar.
2. Mezclar por inversión y precipitar toda la noche a -80°C
3. Descongelar y centrifugar a 12000 rcf por 10 min a 4°C.

Fase de lavado

1. Remover sobrenadante por decantación
2. Agregar 1 ml de etanol 100% frío, mezclar suavemente por inversión y precipitar a -80°C por 30 min.
3. Centrifugar a 15000 rcf por 10 min a 4°C.
4. Realizar un lavado con etanol al 70% en agua-DEPC.
5. Centrifugar 12000 rcf por 5 min a 4°C.
6. Eliminar sobrenadante por decantación y secar a temperatura ambiente
7. Resuspender la pastilla en 30 ul de agua-DEPC y cuantificar.
8. Almacenar a -80°C.



Inclusión en parafina

1. Fijar las muestras en formalina 4% por 2 días y lavar con PBS.
2. Solo para los andamios que contenían la fase de MHB se descalcificaron con calci-Rapid por dos días y se lavó con PBS .
3. Colocar las muestras en casetes de inclusión y deshidratar en acetonas graduales 70%, 90%, 90%, 100%, 100%, 20 min en cada una.
4. Colocar en las siguientes soluciones acetona/xilol, xilol 100%, xilol 100% cada una por 20 min.
5. Colocar en dos soluciones de parafina líquida por 30 min en cada una a 60°C.
6. Colocar las muestras en bloques de inclusión y embeber las muestras con parafina, dejar enfriar el bloque para después desmontarlo y proceder a hacer los cortes en microtomo.
7. Para poder realizar las tinciones las laminillas con los cortes se colocan en un horno a 60°C por 15 min para desparafinar, posteriormente se colocan en xilol 5 min, etanol/xilol 5 min, etanol absoluto 2 min, alcohol de 96° por 2 min y enjuagar lentamente en agua destilada. Proceder a realizar las tinciones correspondientes.

Hematoxilina & Eosina

1. Una vez que se desparafinan se coloca en solución de hematoxilina por 2 min. Realizar dos lavados con agua de la llave lentamente.
2. Inmersión rápida en alcohol ácido. Lavar dos veces con agua de la llave lentamente, posteriormente con agua destilada.
3. Realizar dos inmersiones rápidas en agua amoniacal y enjuague lento con agua de la llave y agua destilada.
4. Hacer 6 inmersiones rápidas en eosina.
5. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Tinción tricrómico de Masson

1. Una vez desparafinado colocar en solución de Bouin (Anexo 1) durante toda la noche a temperatura ambiente o de 30 a 60 min a 65°C.
2. Lavar con agua de la llave hasta que pierda el color amarillo y enjuagar con agua destilada.



3. Teñir núcleos con hematoxilina férrica de Weigert por 10 min.
4. Lavar con agua de la llave por 5 min. Enjuagar con agua destilada hasta que deje de salir el color de la hematoxilina.
5. Teñir en solución de fucsina-escarlata por 5 s (el tiempo depende de la muestra). Lavar en agua destilada hasta dejar de teñirse.
6. Colocar solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 min. Enjuague breve en agua destilada.
7. Teñir con azul de anilina por 15 s (el tiempo depende de la muestra). Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.
8. Hacer una inmersión de 15 s en ácido acético acuoso al 1%.
9. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Safranina O/ Verde rápido

1. Una vez desparafinado, teñir núcleos con hematoxilina férrica por 2 min.
2. Lavar con agua de la llave por 8 min.
3. Teñir con verde rápido 0.1% por 6 min.
4. Colocar en ácido acético acuoso al 1% por 10 s.
5. Teñir con Safranina O acuoso al 0.1% por 3 min.
6. Deshidratar en alcoholes 96%, etanol absoluto, alcohol-xilol por 15 s cada uno. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.

Rojo de picosirio

1. Una vez que el tejido es desparafinado y rehidratado, teñir los núcleos con hematoxilina de Weigert's por 8 min y posterior lavado por 10 min en agua corriente.
2. Teñir en una solución de rojo de picosirio por 1 h (0.5 g de rojo sirio F3B o también conocido como "Direct Red 80" en 500 ml de una solución de ácido pícrico acuoso saturado).
3. Lavar en dos cambios de agua acidulada (5 ml de ácido acético glacial en 1 l de H₂O).
4. Proceder a la deshidratación con alcoholes, aclaramiento con xilol y montaje con resina.



Azul de toluidina

5. Una vez que el tejido es desparafinado y rehidratado, colocar el tejido en una solución de azul de toluidina por 3 min (solución stock: 1 g de azul de toluidina en 100 ml de alcohol al 70%; solución de trabajo pH 2-2.5, 5 ml de solución stock de azul de toluidina y 45 ml de unan solución al 1% cloruro de sodio a pH 2.3).
6. Lavar 3 veces en H₂O.
7. Proceder a la deshidratación en alcoholes, aclarado en xilol y montaje en resina.

Inmunohistoquímica con el kit mouse & rabbit specific HRP/DAB detection IHC,

Abcam

1. Las muestras incluidas en parafina se desparafinan y se hidratar con agua destilada por 20 s. Posteriormente se reactivar la antigenicidad del tejido con buffer de citratos pH 6 (anexo 1) a 80-90°C por 20 min.
2. Lavar con PBS-Tritón (3 gotas en 500 ml de PBS) dos veces por 5 min.
3. Añadir peróxido de hidrógeno (3% en agua) para bloquear a la peroxidasa endógena por 20 min.
4. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
5. Añadir bloqueador de proteínas por 40 min.
6. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
7. Añadir el anticuerpo primario a la concentración adecuada e incubar toda la noche a 4°C.
8. Recuperar anticuerpo primario y lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón por 2 min cada una.
9. Añadir el anticuerpo secundario biotinilado e incubar por 20 min.
10. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
11. Añadir la estreptavidina conjugada con peroxidasa e incubar por 20 min.
12. Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
13. Añadir diaminobenzidina (DAB 10%) e incubar de 5 a 10 min.
14. Lavar con PBS y agua destilada.
15. Contrateñir con hematoxilina de Gill por 2 min.
16. Lavar con agua de la llave por 20 s y posteriormente con agua destilada hasta que deje de teñirse.



17. Deshidratar con alcoholes 95%, alcohol absoluto, alcohol/xilol por 15 s.
18. Aclarar con 2 cambios de xilol, cada uno de 15 s y montar con resina.



ANEXO 3

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Hindawi
Stem Cells International
Volume 2019, Article ID 9792369, 15 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/9792369>



Research Article

A Bioactive Cartilage Graft of IGF1-Transduced Adipose Mesenchymal Stem Cells Embedded in an Alginate/Bovine Cartilage Matrix Tridimensional Scaffold

Nidia K. Moncada-Saucedo,¹ Iván A. Marino-Martínez,^{2,3} Jorge Lara-Arias,⁴ Viktor J. Romero-Díaz,⁵ Alberto Camacho,^{1,6} J. A. Valdés-Franco,^{7,8} Vanessa Pérez-Silos,¹ Alejandro García-Ruiz,¹ Hang Lin,⁹ Rocky S. Tuan,^{10,11} Rosalío Ramos-Payán,¹² M. Lara-Banda,¹³ Rocio Ortiz-Lopez,¹⁴ Augusto Rojas-Martínez,¹⁴ and Lizeth Fuentes-Mera¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Monterrey, NL, Mexico

²Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Unidad de Terapias Experimentales, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Monterrey, NL, Mexico

³Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Monterrey, NL, Mexico

⁴Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Servicio de Ortopedia y Traumatología, Hospital Universitario "Dr. José E. González", Monterrey, NL, Mexico

⁵Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Monterrey, NL, Mexico

⁶Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Unidad de Neurometabolismo, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Monterrey, NL, Mexico

⁷Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, Mexico

⁸Plant Breeding and Genetics Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, NY, USA

⁹Department of Orthopaedic Surgery, McGowan Institute for Regenerative Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

¹⁰Center for Cellular and Molecular Engineering, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

¹¹Department of Bioengineering, Swanson School of Engineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

¹²Sciences Faculty, Autonomous University of Culiacan, Culiacan, Sinaloa, Mexico

¹³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Monterrey, NL, Mexico

¹⁴Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, NL, Mexico

Correspondence should be addressed to Augusto Rojas-Martínez; augusto.rojasmtz@tec.mx and Lizeth Fuentes-Mera; lizeth46@hotmail.com

Guest Editor: Henning Madry

Copyright © 2019 Nidia K. Moncada-Saucedo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Articular cartilage injuries remain as a therapeutic challenge due to the limited regeneration potential of this tissue. Cartilage engineering grafts combining chondrogenic cells, scaffold materials, and microenvironmental factors are emerging as promissory alternatives. The design of an adequate scaffold resembling the physicochemical features of natural cartilage and able to support chondrogenesis in the implants is a crucial topic to solve. This study reports the development of an implant constructed with IGF1-transduced adipose-derived mesenchymal stem cells (immunophenotypes: CD105⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD14⁺, and CD34⁺) embedded in a scaffold composed of a mix of alginate/milled bovine decellularized knee material which was cultivated *in vitro* for 28 days (3CI). Histological analyses demonstrated the distribution into isogenous groups of chondrocytes



Scaffolds Based on Silk Fibroin for Osteochondral Tissue Engineering

Nidia Moncada-Saucedo^{1,2}, Alberto Camacho-Morales^{1,3}, Lizeth Fuentes-Mera^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México

²Unidad de Terapias Experimentales, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México

³Unidad de Neurociencias, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México

ISSN: 2576-8840



*Corresponding author: Lizeth Fuentes-Mera, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular; Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

Submission:  March 27, 2019

Published:  April 09, 2019

Volume 10 - Issue 3

How to cite this article: Nidia M-S, Alberto C-M, Lizeth F-M. Scaffolds Based on Silk Fibroin for Osteochondral Tissue Engineering. Res Dev Material Sci. 10(3). RDMS.000740.2019. DOI: [10.31031/RDMS.2019.10.000740](https://doi.org/10.31031/RDMS.2019.10.000740)

Copyright© Lizeth Fuentes-Mera, This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract

Silk fibroin protein from the silkworm *Bombyx mori* (*B. mori*) is a natural biopolymer that has extensive structural capabilities for chemical and mechanical modifications for applications in the biomedical field. The SF is versatile in its processing since it can be manufactured into different forms such as gels, films, foams, membranes, scaffolds, and nanofibers; making it an attractive material in a variety of applications that require mechanically superior, biocompatible, and biodegradable biomaterials. In this review, we present an overview of the main chemical and structural features that make silk fibroin a potential biomaterial for its wide application in tissue engineering. We discuss and summarize about different structural designs and methods for the assembly of fibroin-based 3D scaffolds emphasizing the biomedical applications of this biomaterial. Finally, we highlight the most current works in which 3D scaffolds of fibroin are used for cartilage and osteochondral tissue regeneration.

Keywords: Cartilage tissue engineering; Osteochondral tissue; Regenerative medicine; Scaffold; Silk fibroin

Introduction

Silks are polypeptides produced by members of the class Arachnida and several silkworms of the order Lepidoptera [1] that have been used in the textile industry [2], as sutures [3], in cosmetics [4], in enzymatic immobilization [5], to cover lesions [6], as a substrate for cellular growth [7,8], in systems of drug delivery [9-11], as scaffolds for tissue engineering (TE) [12], and in various advanced biomedical applications using transgenic silkworms [13,14]. Finally, silks have been considered for their application as biodegradable adhesives and sealants [15]. The use of silk as a TE biomaterial has been investigated, showing a high biocompatibility, as well as the ability to support cell growth and differentiation, in challenges as demanding as the regeneration of injured articular cartilage. The present review addresses the discoveries in the use of scaffolding systems based on silk fibroin (SF), emphasizing its application for chondral and osteochondral TE.

Physical and chemical features of silk fibroin as a biomaterial

SFs from the cocoons of the silkworm *B. mori* are the most-used and most-studied SFs in TE; South Korea is home to over 300 varieties of this species [16]. Silkworm cocoons primarily consist of 2 bio-macromolecules: fibroin (fibrous protein) and sericin (globular protein). The silk of *B. mori* is synthesized in a group of specialized salivary glands, and fibroin (comprising 60-80% of the silk) is synthesized exclusively in the posterior region of the gland. The fibroin fibres are covered with sericin (15-35%), which is synthesized in the walls of the medial regions of the gland. Between 1 and 5% of the silk consists of non-sericin components, such as pigments, wax, sugars, and other impurities (Figure 1), [1,17,18].

Most lepidopterans produce fibroin that consists of 3 protein components arranged as a single element of silk: heavy-chain (~391kDa) and light-chain fibroins (~25kDa), which are linked by a disulphide bridge, and P25 (~25kDa), also known as fibrohexamerin (Phx). These components are present at a 6:6:1 ratio, respectively [19-21].



Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering

Lizeth Fuentes-Mera, Alberto Camacho,
Nidia K. Moncada-Saucedo and
Víctor Peña-Martínez

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68172>

Abstract

Articular cartilage injuries caused by traumatic/mechanical progressive degeneration result in joint pain, swelling, the consequent loss of joint function, and eventually osteoarthritis. Articular tissue possesses a poor ability to regenerate that further complicates the therapeutic approaches. Mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a promising alternative treatment. Recently, it has been reported that a wide variety of strategies ranging from merely using cells in the injured area to employ biofunctional substitutes in which cells are harmonizing with scaffolding and growth factors to create an engineered cartilage tissue.

This chapter reviews the state-of-the-art in cartilage tissue engineering focused on tissue engineering approaches designed to recapitulate the native development of cartilage and its tridimensional structure as an osteochondral unit. Since the production of hypertrophied tissue is one of the most critical challenges to overcome in chondral tissue regeneration, here we show new strategies to minimize hypertrophy in cartilage. Finally, the efficacy and safety of different treatments of cartilage in current clinical trials will be discussed.

While the framework provides new features and benefits concerning the strategies for articular tissue regeneration, this chapter presents a set of tools to improve approaches to orthopedic regenerative medicine based on the use of MSCs.

Keywords: MSCs, MSCs-subpopulations, cartilage regeneration, cartilage tissue engineering, hypertrophy



Differential Expression of Adhesion-Related Proteins and MAPK Pathways Lead to Suitable Osteoblast Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Subpopulations

Margarita Leyva-Leyva,^{1,*} Annia López-Díaz,^{1,*} Lourdes Barrera,² Alberto Camacho-Morales,^{3,4} Felipe Hernandez-Aguilar,¹ Erika M. Carrillo-Casas,¹ Lourdes Arriaga-Pizano,⁵ Jaime Calderón-Pérez,⁶ Jorge García-Álvarez,⁷ Gabriel Orozco-Hoyuela,⁸ Cristina Piña-Barba,⁹ Augusto Rojas-Martínez,^{3,10} Viktor Romero-Díaz,^{11,12} Jorge Lara-Arias,¹³ Nancy Rivera-Bolaños,^{3,10} César López-Camarillo,¹⁴ Nidia Moncada-Saucedo,^{3,10} Alejandra Galván-De los Santos,^{3,10} Fátima Meza-Urzúa,¹ Luis Villarreal-Gómez,¹⁵ and Lizeth Fuentes-Mera^{3,10}

Cellular adhesion enables communication between cells and their environment. Adhesion can be achieved throughout focal adhesions and its components influence osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). Because cell adhesion and osteoblast differentiation are closely related, this article aimed to analyze the expression profiles of adhesion-related proteins during osteoblastic differentiation of two hMSCs subpopulations (CD105⁺ and CD105⁻) and propose a strategy for assembling bone grafts based on its adhesion ability. In vitro experiments of osteogenic differentiation in CD105⁻ cells showed superior adhesion efficiency and 2-fold increase of α -actinin expression compared with CD105⁺ cells at the maturation stage. Interestingly, levels of activated β 1-integrin increased in CD105⁻ cells during the process. Additionally, the CD105⁻ subpopulation showed 3-fold increase of phosphorylated FAK^{Y397} compared to CD105⁺ cells. Results also indicate that ERK1/2 was activated during CD105⁻ bone differentiation and participation of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-p38 in CD105⁺ differentiation through a focal adhesion kinase (FAK)-independent pathway. In vivo trial demonstrated that grafts containing CD105⁻ showed osteocytes embedded in a mineralized matrix, promoted adequate graft integration, increased host vascular infiltration, and efficient intramembranous repairing. In contrast, grafts containing CD105⁺ showed deficient endochondral ossification and fibrocartilaginous tissue. Based on the expression of α -actinin, FAK^{Y397} and ERK1/2 activation, we define maturation stage as critical for bone graft assembling. By in vitro assays, CD105⁻ subpopulation showed superior adhesion efficiency compared to CD105⁺ cells. Considering in vitro and in vivo assays, this study suggests that integration of a scaffold with CD105⁻ subpopulation at the maturation stage represents an attractive strategy for clinical use in orthopedic bioengineering.

¹Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad, Dirección de Investigación Hospital General "Dr. Manuel Gea González," México City, México.

²Laboratorio de Inmunología Integrativa, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas," México City, México.

³Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

⁴Unidad de Neurociencias, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

⁵Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México City, México.

⁶División de Ginecología y Obstetricia, Hospital General "Dr. Manuel Gea González," México City, México.

⁷Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México.

⁸Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México.

⁹Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México.

¹⁰Unidad de Terapias Experimentales, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

¹¹Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, México.

¹²Unidad de Bioimagen, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México.

¹³Laboratorio de Ingeniería Tisular-Banco de Hueso y Tejidos, Servicio de Ortopedia y Traumatología, Hospital Universitario "Dr. José E. González," Monterrey, México.

¹⁴Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México City, México.

¹⁵Centro de Ingeniería y Tecnología (CITEC), Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, Tijuana, México.

*These authors contributed equally to this work.



Biomedical Materials



PAPER

OPEN ACCESS

RECEIVED
27 June 2017REVISED
5 December 2017ACCEPTED FOR PUBLICATION
22 December 2017PUBLISHED
20 February 2018

Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 licence](#).

Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.

Effect on growth and osteoblast mineralization of hydroxyapatite-zirconia (HA-ZrO₂) obtained by a new low temperature system

Bárbara Bermúdez-Reyes¹, María del Refugio Lara-Banda¹, Elizabeth Reyes-Zarate², Augusto Rojas-Martínez^{3,4}, Alberto Camacho^{3,5}, Nidia Moncada-Saucedo⁵, Vanessa Pérez-Silos⁵, Alejandro García-Ruiz², Abel Guzmán-López⁵, Víctor Peña-Martínez⁵, Jorge Lara-Arias⁵, Selem Torres-Méndez³ and Lizeth Fuentes-Mera⁵

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Monterrey, NL, México

² Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Laboratorio de Fisiología Celular, Distrito Federal, México

³ Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, NL, México

⁴ Tecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences, Monterrey, NL, México

⁵ Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario, Monterrey, NL, México

E-mail: lizeth46@hotmail.com

Keywords: HA-ZrO₂, bioceramics, adhesion, osteogenesis, mineralization

Abstract

Ceramics and bioceramics, such as hydroxyapatite and zirconium, are used in bone tissue engineering. Hydroxyapatite has chemical properties similar to bone while zirconium offers suitable mechanical properties. The aim of this article is to evaluate the ability to support cell growth and osteoblastic mineralization of hydroxyapatite-zirconium obtained by a new system based on different low temperatures, such as 873 K (HZ600), 923 K (HZ650) and 973 K (HZ700). Hydroxyapatite-zirconia obtained by this new system was examined in terms of thermogravimetric features and x-ray diffractograms. Furthermore, the ability for supporting osteoblast growth and mineralization were analyzed. By x-ray diffraction analysis, we clearly demonstrated that no high-temperature processing was required. Moreover, it is possible to form tetragonal-zirconium at 923 K. Proliferation assays showed that osteoblast growth was not influenced by any of the composite evaluated. Regarding the osteogenic marker Coll1, a 2-fold increase in expression was observed for HZ650 compared to HZ600 and HZ700. Interestingly, osteoblasts grown on HZ650 showed globular accretions covered with collagen bundles and calcium-rich extracellular matrix whereas HZ600 and HZ700 showed no phosphate or calcium deposits. This study demonstrated that at 923 K it is possible to generate stable tetragonal-zirconium and the resulting HZ650 composite is able to promote a suitable osteoblast mineralization process.

Introduction

Scaffolds play an important role in cell attachment, proliferation and guidance of new bone tissue formation in bone tissue engineering [1, 2]. Scaffolds from several materials, including biopolymers [3], bioactive ceramics [4] and high-strength composites [5], have been used. Bioceramic scaffold materials have been developed from various natural sources, including coral [6] and bone [7], wherein the main inorganic component is calcium phosphate, which binds closely with the structure of hydroxyapatite (HA).

HA has attracted interest as a biomaterial for use in orthopedic applications due to the coincidence of its crystallography and chemical composition to that of

human bones [8–12]. However, its major weakness of HA lies in its low mechanical strength which makes it inadequate for load-bearing applications.

An alternative way of producing tougher HA is to use composites of stabilized tetragonal zirconium and HA, where the bioactivity comes from the apatite phase and the high strength is derived from the zirconium oxide (ZrO₂) phase [13–16]. Nonetheless, HA may release calcium which interacts with zirconium, promoting the formation of cubic zirconium (calcium zirconate), which restrains the toughening mechanism [17–19].

Based on temperature, zirconia exists in three phases, monoclinic (M), cubic (C) and tetragonal (T). Tetragonal zirconia has high strength, toughness, and



Hindawi
BioMed Research International
Volume 2019, Article ID 8987268, 13 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/8987268>



Research Article

A Novel OsteomiRs Expression Signature for Osteoblast Differentiation of Human Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells

Mariana Avendaño-Félix,¹ Lizeth Fuentes-Mera ,² Rosalío Ramos-Payan ,¹ Maribel Aguilar-Medina ,¹ Vanessa Pérez-Silos ,² Nidia Moncada-Saucedo,² Laurence A. Marchat ,³ Juan Antonio González-Barrios,⁴ Erika Ruiz-García ,⁵ Horacio Astudillo-de la Vega,⁶ José L. Cruz-Colin,⁷ and César López-Camarillo ⁸

¹Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Sinaloa, Mexico

²Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, Mexico

³Programa en Biomedicina Molecular y Red de Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, Mexico

⁴Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1 de Octubre ISSSTE, Ciudad de México, Mexico

⁵Laboratorio de Medicina Traslacional, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México, Mexico

⁶Laboratorio de Investigación Traslacional en Cáncer y Terapia Celular, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México, Mexico

⁷Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico

⁸Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to César López-Camarillo; genomicas@yahoo.com.mx

Academic Editor: Diego Franco

Copyright © 2019 Mariana Avendaño-Félix et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells (hAM-MSCs) are a potential source of cells for therapeutic applications in bone regeneration. Recent evidence reveals a role for microRNAs (miRNAs) in the fine-tuning regulation of osteogenesis (osteomiRs) suggesting that they can be potential targets for skeleton diseases treatment. However, the functions of osteomiRs during differentiation of hAM-MSCs to osteogenic lineage are poorly understood. In this investigation, we discovered a novel miRNAs expression signature corresponding to the matrix maturation (preosteoblast) and mineralization (mature osteoblast) stages of dexamethasone-induced osteoblastic differentiation of hAM-MSCs. Comprehensive miRNAs profiling using TaqMan Low Density Arrays showed that 18 miRNAs were significantly downregulated, whereas 3 were upregulated in the matrix maturation stage (7 days after osteogenic induction) in comparison to undifferentiated cells used as control. Likewise, 47 miRNAs were suppressed and 25 were overexpressed at mineralization stage (14 days after osteogenic induction) in comparison to osteoprogenitors cells. Five out 93 miRNAs (miR-19b-3p, miR-335-3p, miR-197-3p, miR-34b-39, and miR-576-3p) were regulated at both 7 and 14 days suggesting a role in coordinated guidance of osteoblastic differentiation. Exhaustive bioinformatic predictions showed that the set of modulated miRNAs may target multiple genes involved in regulatory networks driving osteogenesis including key members of BMP, TGF- β , and WNT/ β -catenin signaling pathways. Of these miRNAs, we selected miR-204, a noncoding small RNA that was expressed at matrix maturation phase and downregulated at maturation stage, for further functional studies. Interestingly, gain-of-function analysis showed that restoration of miR-204 using RNA mimics at the onset of mineralization stage dramatically inhibited deposition of calcium and osteogenic maturation of hAM-MSCs. Moreover *in silico* analysis detected a conserved miR-204 binding site at the 3' UTR of TGF- β R2 receptor gene. Using luciferase assays we confirmed that TGF- β R2 is a downstream effector of miR-204. In conclusion, we have identified a miRNAs signature for osteoblast differentiation of hAM-MSCs. The results from this study suggested that these miRNAs may act as potential inhibitors or activators of osteogenesis. Our findings also points towards the idea that miR-204/TGF- β R2 axis has a regulatory role in differentiation of hAM-MSCs committed to osteoblastic lineage.