

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión”**

**POR**

**M.C. VANESSA PÉREZ SILOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA**

**OCTUBRE, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**“Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión”**

**POR**

**M.C. VANESSA PÉREZ SILOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA**

**DIRECTOR DE TESIS  
DRA. C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA**

**OCTUBRE, 2019**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DE UN IMPLANTE BIFÁSICO BIOACTIVO PARA LA  
REGENERACIÓN SIMULTÁNEA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR Y EL HUESO  
SUBCONDRALE EN LESIONES CONDRALES DE GRAN EXTENSIÓN**

Aprobación de la tesis:



---

**Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera**

Directora de tesis



---

**Dr. C. Alberto Camacho Morales**

Co-director de tesis



---

**Dr. C. Jorge Lara Arias**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. C. Augusto Rojas Martínez**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue llevado a cabo en los laboratorios de Medicina Regenerativa del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, en la Unidad de Terapias Experimentales del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Departamento de Histología, todos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Departamento de Ingeniería Celular y Molecular de la Universidad de Pittsburgh. Bajo la dirección de la Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera y la Co-dirección del Dr. C. Alberto Camacho Morales.

**Vo. Bo.**



---

**Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera**

**Directora de tesis**

## DEDICATORIA

A **mi esposo** por su apoyo durante la elaboración de este proyecto, por pasar conmigo desvelos, por aguantar esos momentos de estrés en los que ni yo misma me aguantaba, por siempre tener una palabra de aliento, por siempre creer en mí. Por tu asesoría en aquellos experimentos que competen a tu área de estudio. Porque me ayudaste más de lo que se puede esperar de un esposo. Gracias Rolando porque realmente hiciste este camino más fácil.

A **mi padre** al que estaré eternamente agradecida por ayudarme a seguir mi sueño de convertirme en Química a pesar de que eso significara irme de casa y alejarme de ustedes, y ahora gracias a ese apoyo puedo cumplir otro sueño de convertirme en Doctora en Ciencias. A **mi madre**, porque sin usted no hubiera llegado hasta aquí. Usted madre es mi ejemplo para seguir, usted es esa mujer fuerte y llena de amor en la que yo me quiero convertir.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir otra meta en mi vida.

A mi esposo Rolando Antonio Silva Pérez por todo su apoyo. Contigo a mi lado, con todo tu apoyo hiciste este camino más llevadero y más fácil.

A mi familia, en especial a mis padres Ignacia Silos Victorino y Juan Antonio Pérez Cobarrubia por siempre apoyarme y creer en mí.

A mi asesora la Dra. Lizeth Alicia Fuentes Mera por su asesoría, apoyo y por siempre tener una palabra para motivarnos.

A mi comisión por toda su asesoría y apoyo a lo largo del proyecto en especial al Dr. Jorge Lara por su apoyo y asesoría durante los ensayos *in vivo* y a la Dra. Herminia Martínez por compartir conmigo sus conocimientos y enseñarme que un Doctor en Ciencias no solo debe saber hacer investigación si no también formar nuevos investigadores.

Al M.C. Víktor Romero y el Dr. Adolfo Soto por su asesoría y compartir conmigo sus conocimientos.

Por su colaboración a la Dra. Ma. Cristina Piña Barba y la Química Catalina Cortez.

Al PhD. Rocky S. Tuan por permitirme hacer una estancia en el Centro para la Ingeniería Celular y Molecular de la Universidad de Pittsburgh.

Al PhD. Lin Hang por su asesoría durante mi estancia. Gracias por todo su apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio de CCME, en especial a Jean y Jihee por su amistad y apoyo durante mi estancia.

A mis compañeros de generación, en especial a Nidia Moncada y Alejandro García por su apoyo y palabras de aliento en momentos complicados.

A CONACYT por su apoyo tanto a mi persona al otorgarme la beca de doctorado como su apoyo al proyecto.

A todas las personas que directa o indirectamente apoyaron en la elaboración y conclusión de este proyecto.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABLAS</b>	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	X
<b>ABREVIATURAS</b>	XI
<b>RESUMEN</b>	XV
<b>CAPITULO I</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Complejo osteocondral	1
1.1.1 Cartílago articular	2
1.1.1.1 Zonas del cartílago articular	2
1.1.1.2 Condrocitos	5
1.1.1.3 Matriz extracelular	5
1.1.2 Hueso subcondral	7
1.1.3 Propiedades mecánicas del complejo osteocondral	8
1.2 Defectos condrales	9
1.2.1 Lesiones grado IV o de espesor completo	11
1.3 Tratamiento de defectos condrales	12
1.4 Ingeniería tisular	14
1.4.1 Células	15
1.4.1.1 Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM-TA)	16
1.4.2 Andamios	17
1.4.2.1 Andamios osteocondrales	18
1.4.2.2 Alginato	19
1.4.2.3 Matriz extracelular descelularizada	20
1.4.2.4 Fibroína de seda	22
1.4.3 Factores de crecimiento	24
1.4.3.1 Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1)	24
1.5 Modelo animal	25
1.5.1 Ensayo de biocompatibilidad	25
1.5.2 Modelo <i>in vivo</i> para la regeneración de lesiones osteocondrales	26

<b>CAPÍTULO II</b>	28
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>HIPÓTESIS</b>	28
<b>CAPÍTULO III</b>	29
<b>OJETIVOS</b>	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
<b>CAPÍTULO IV</b>	30
<b>METODOLOGIA</b>	30
<b>ESTRATEGIA GENERAL</b>	30
4.1 Material de uso general	31
4.2 Equipo de laboratorio de uso general	31
4.3 Material y reactivos para cultivo general	32
4.4 Material y reactivos para ensayo de expresión génica	32
4.5 Lipectomía	33
4.6 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMMs-TA)	33
4.7 Descelularización de matriz de cartílago bovino	34
4.8 Descelularización de hueso bovino	36
4.9 Proliferación y capacidad osteoconductora de los huesos bovinos descelularizados	37
4.10 Construcción de andamios	37
4.11 Ensayo mecánico	40
4.12 Celularización de andamios	40
4.13 Aislamiento de RNA y ensayo de expresión génica	42
4.14 Análisis Bioquímico	43
4.15 Análisis histológico e inmunohistoquímico	44
4.16 Ensayo de biocompatibilidad	46
4.17 Ensayo piloto en el modelo porcino	48
<b>CAPÍTULO V</b>	51
<b>RESULTADOS</b>	51

5.1 Descelularización de hueso bovino	51
5.2 Proliferación y capacidad osteoconductora de los huesos bovinos descelularizados	52
5.3 Construcción de andamios y ensayo mecánico de andamios libres de células	54
5.4 Análisis bioquímico	56
5.5 Ensayo de expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos	57
5.6 Análisis histológico e inmunohistoquímico <i>in vitro</i>	58
5.7 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM-TA)	62
5.8 Ensayo de biocompatibilidad	63
5.9 Ensayo piloto en el modelo porcino	67
5.10 Análisis morfológico	68
<b>CAPÍTULO VI</b>	74
<b>DISCUSIÓN</b>	74
<b>CAPITULO VII</b>	81
<b>CONCLUSIÓN</b>	81
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	82
<b>ANEXOS</b>	95

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Secuencias de primers

**Tabla 2.** Módulo de Young de las diferentes fases condrales.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Articulación de rodilla derecha humana vista anterior
- Figura 2.** Zonas del Cartílago articular
- Figura 3.** Zonas de la Matriz extracelular
- Figura 4.** Sistema de clasificación Outerbridge
- Figura 5.** Defecto condral grado IV o de espesor completo
- Figura 6.** Tratamientos para lesiones condrales y osteocondrales
- Figura 7.** Pilares de la ingeniería tisular
- Figura 8.** Andamio bifásico para regenerar lesiones osteocondrales
- Figura 9.** Estrategia general del proyecto
- Figura 10.** Descelularización de la matriz de cartílago bovino
- Figura 11.** Descelularización de hueso bovino.
- Figura 12.** Fabricación de andamios bifásicos de fibroína de seda y hueso bovino descelularizado
- Figura 13.** Fabricación de andamios bifásicos de alginato y hueso bovino descelularizado
- Figura 14.** Implantación de andamios ensayo de biocompatibilidad
- Figura 15.** Cirugía para implantación de los andamios
- Figura 16.** Tinción de hematoxilina y eosina de los diferentes tratamientos para descelularizar el hueso bovino
- Figura 17.** Proliferación de CMM-TA cultivadas en condiciones 3D
- Figura 18.** Evaluación de osteoconductividad de los huesos bovinos descelularizados
- Figura 19.** Andamios bifásicos

**Figura 20.** Análisis bioquímico de células cultivadas en monocapa y en condiciones 3D después de 28 días de cultivo en medio condrogénico

**Figura 21.** Análisis de expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos en CMM-TA cultivadas en monocapa o 3D en medio condrogénico por 28 días

**Figure 22.** Evaluación histológica de la repuesta in vitro de las CMM-TA cultivadas en monocapa y condiciones 3D con medio condrogénico por 28 días

**Figure 23.** Evaluación inmunohistoquímica de la repuesta in vitro de las CMM-TA cultivadas en monocapa y condiciones 3D con medio condrogénico por 28 días

**Figura 24.** Diferenciación multilinaje de CMM-TA de cerdo

**Figura 25.** Evaluación macroscópica de los diferentes tratamientos después de 8 semanas

**Figura 26.** Análisis histopatológico de la respuesta inflamatoria

**Figura 27.** Evaluación semicuantitativa de la respuesta inflamatoria

**Figura 28.** Evaluación macroscópica de los cóndilos después de 8 semanas

**Figura 29.** Comparación histológica de los andamios celularizados

**Figura 30.** Los andamios de los grupos tratados con los andamios bifásicos inducen una mejor formación y organización de trabéculas óseas

**Figura 31.** El andamio del grupo tratado con el andamio bifásico celularizado solo en la fase condral presenta mayor organización de las fibras de colágeno

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	Alginato
ARN	Ácido ribonucleico
Ba <sup>+2</sup>	Ion bario
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
CMC	Células en monocapa
CMM	Células madre mesenquimales
CMM-TA	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Col I	Colágeno tipo I
Col II	Colágeno tipo II
Col X	Colágeno tipo X
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FC	Fase condral
FO	Fase ósea
FS	Fibroína de seda
G	Ácido L-gulurónico
GAG	Glucosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HAp	Hidroxiapatita
HBD	Hueso bovino descelularizado
HCl	Ácido clorhídrico
HFIP	Hexafluoroisopropanol
H&E	Hematoxilina y eosina
ICA	Implante de condrocitos autólogos
IHQ	Inmunohistoquímica
IMCA	Implante de condrocitos autólogos
KCl	Cloruro de potasio
kg	Kilogramo
kPa	Kilopascal
M	Ácido D-manurónico
MB	Medio basal
MCB	Matriz de cartílago bovino
MEC	Matriz extracelular
Mg <sup>+</sup>	Ion magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MO	Medio osteogénico
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OC	Osteocondral
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Buffer salino de fosfatos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sr <sup>+2</sup>	Ion estroncio
TIF	Tipo inspección federal

## RESUMEN

**M.C. Vanessa Pérez Silos**

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

Título del Estudio: **EVALUACIÓN *IN VIVO* DE UN IMPLANTE BIFÁSICO BIOACTIVO PARA LA REGENERACIÓN SIMULTÁNEA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR Y EL HUESO SUBCONDRALE EN LESIONES CONDRALES DE GRAN EXTENSIÓN**

Área de Estudio: Ingeniería Genética

**INTRODUCCIÓN:** Las lesiones del cartílago articular pueden originarse por diferentes causas, entre las que se encuentran los traumatismos severos. Su reparación representa un reto, principalmente por la pobre capacidad de regeneración del cartílago. Estas lesiones pueden ser de gran extensión, es decir, llegar hasta el hueso subcondral lo cual resulta en una lesión osteocondral (involucra al cartílago articular y hueso subcondral). Se han utilizado diversos acercamientos terapéuticos para reparar este tipo de lesiones, sin embargo, la mayoría resulta en la formación de tejido fibrocartilaginoso; el cual no cuenta con las características mecánicas y biológicas necesarias para cumplir con su función de amortiguamiento. Actualmente se trabaja en el diseño de andamios que logren mimetizar la estructura osteocondral. Uno de los enfoques es el diseño de andamios bifásico, los cuales pueden contener factores de crecimiento y/o células. En el presente estudio se trabajó en el diseño de un andamio que no solo permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular, si no, que además mimetiza las características mecánicas del tejido osteocondral. Asimismo, se evaluó la necesidad de una fase ósea celularizada a fin de mejorar la integración del implante con el tejido del huésped. **OBJETIVO:** Evaluar la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral de rodilla en un modelo *in vivo* de cerdo después del tratamiento con un implante bifásico. **MÉTODOS:** Se generaron 9 grupos de andamios a partir de la combinación de alginato, fibroína de seda (FS), NaCl (S) y/o matriz de cartílago de bovino (MCB); y se evaluó el módulo de Young así como su capacidad de sostener la diferenciación condrogénica de ADSCs. Se seleccionó el andamio con mejores características mecánicas y de condro-inducción a los cuales se evaluó la biocompatibilidad en un modelo murino, así como su capacidad de integración y de reparación luego de ocho semanas de recuperación en lesiones osteocondrales en un modelo porcino. **RESULTADOS:** Los andamios compuestos por FS+S:MCB (tamaño de partícula < 100 µm) en una proporción 1:1, mostraron el módulo de Young más alto respecto a los grupos analizados el cual es similar al reportado para el cartílago hialino humano. Al mismo tiempo, este grupo permitió la diferenciación de las ADSCs hacia linaje condrogénico lo cual se evidenció por la presencia de GAGs y Col II. En el ensayo *in vivo*, este grupo demostró una buena integración con el tejido adyacente al sitio de la lesión, mostrando además un tejido de reparación organizado jerárquicamente y con presencia de GAGs y Col II. Finalmente, se demostró que la celularización de la fase ósea en el contexto de este diseño bifásico no ofrece ninguna ventaja en términos de reparación del tejido condral. **CONCLUSIÓN:** Nuestros hallazgos demostraron la eficacia de un andamio bifásico generado a partir de la combinación de FS/NaCl, MCB, y hueso bovino descelularizado para integrarse y reparar una lesión de gran extensión, lo que representa una alternativa prometedora para su aplicación en el tratamiento de lesiones osteocondrales.



---

Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera

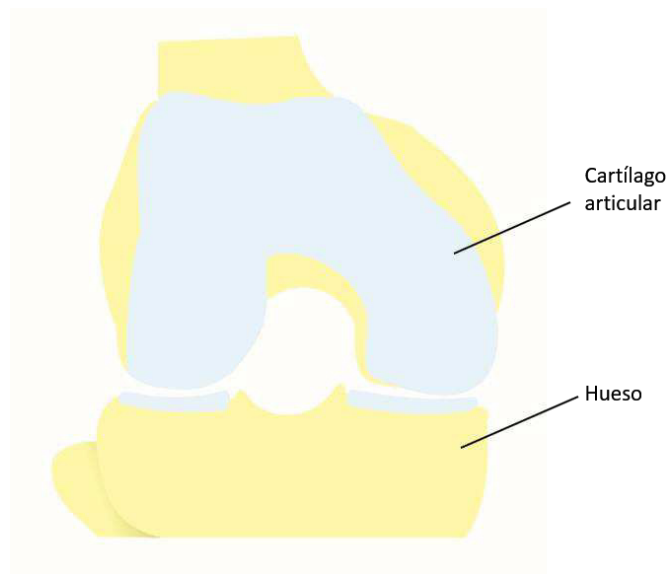
Directora de tesis

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Complejo osteocondral

El complejo osteocondral (OC) está formado por el cartílago articular y el hueso subcondral (figura 1). Además, hay una discreta zona entre ambos tejidos, donde cada zona tiene: una matriz extracelular de composición única, se observa la presencia de colágeno con diferentes orientaciones, los condrocitos varían en su morfología y organización celular, y la biomecánica al cumplir con distintas funciones es zona-específica. La unidad OC cuenta con una compleja estructura y organización, así como propiedades biomecánicas únicas, que permiten una eficiente transmisión de cargas a través de la articulación.



**Figura 1. Articulación de rodilla derecha humana vista anterior.** El cartílago articular se encuentra recubriendo los extremos de los huesos articulares.

### **1.1.1 Cartílago articular**

El cartílago articular es el tipo de cartílago más abundante en el cuerpo humano éste es avascular, aneural y alinfático, y se encuentra en los extremos de los huesos de las articulaciones. Es un tejido conectivo altamente especializado que provee una superficie lubricada, la cual tiene como objetivo facilitar el movimiento de las articulaciones reduciendo la fricción; adicionalmente, absorbe y transmite las cargas sobre la articulación (Sophia Fox, Bedi, & Rodeo, 2009). Su espesor promedio en el humano es de 2 a 4 mm y está compuesto principalmente por agua (65-80%), colágeno, principalmente colágeno tipo II (Col II) y proteoglicanos. Sin embargo, en la matriz extracelular (MEC) se pueden encontrar en pequeñas cantidades otros compuestos como lípidos, fosfolípidos y glicoproteínas. Las células que componen este tejido son los condrocitos, los cuales representan del 2 al 5% del volumen del tejido y tienen como función el mantenimiento y reparación de la MEC (McMahon, O'Brien, & Prendergast, 2008).

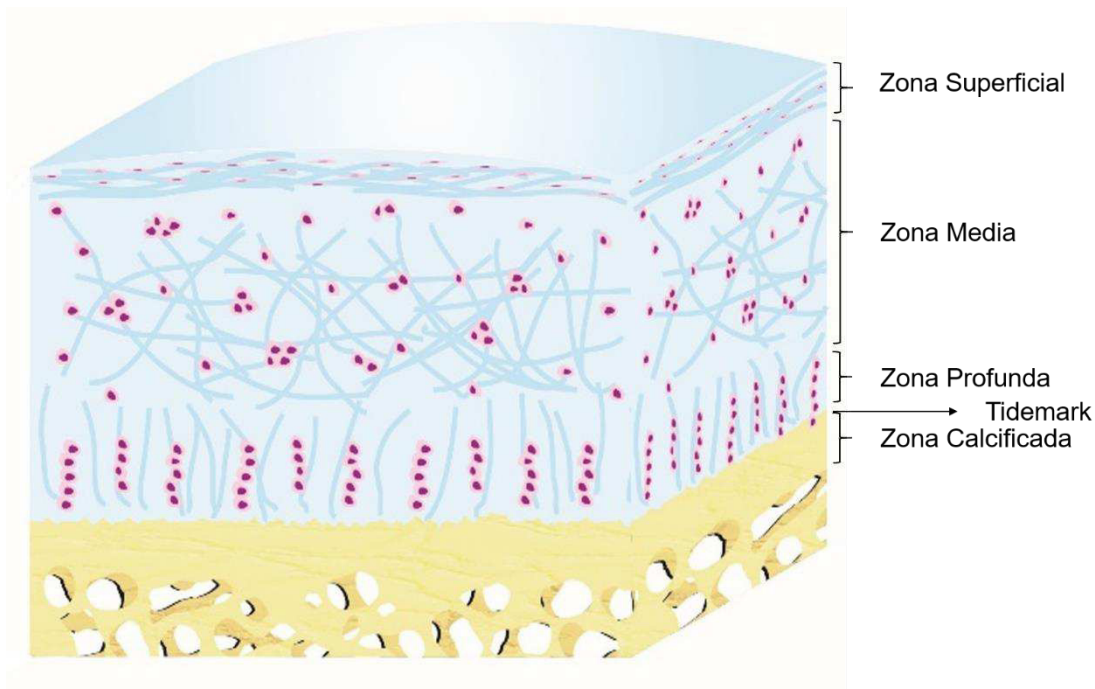
#### **1.1.1.1 Zonas del cartílago articular**

El cartílago articular se divide en 4 zonas: la superficial o tangencial, media, profunda y calcificada. Cada una difiere en la morfología de los condrocitos presentes, así como la densidad celular, la orientación de las fibras de colágeno y la composición bioquímica (figura 2).

- **La zona superficial** está en contacto directo con el líquido sinovial y es responsable de soportar las fuerzas de fricción y la mayoría de las propiedades mecánicas del cartílago. Protege las capas más profundas de las fuerzas ejercidas sobre la articulación. Los condrocitos en esta zona son más planos y pequeños. Las fibras de colágeno están empaquetadas densamente y hay escaso contenido de proteoglicanos, así como una reducida permeabilidad, lo que permite que las fuerzas de compresión se distribuyan radialmente a través del cartílago. Las fibras de colágeno y las células presentes tienen una orientación paralela a la superficie del cartílago.
- **La zona media** representa del 40 al 60% del grosor total. Los condrocitos son menos densos, con una morfología redondeada o esférica; se encuentran solos o en grupos, arreglados al azar, embebidos en la MEC. El contenido de proteoglicanos incrementa, mientras que el colágeno II exhibe una estructura oblicua en donde las fibras son orientadas aleatoriamente. Esta zona resiste fuerzas de compresión y funciona como un puente entre la zona superficial y la profunda.
- **La zona profunda** se caracteriza por la presencia de condrocitos redondeados arreglados en columnas perpendiculares a la superficie articular, esta zona tiene el mayor contenido de proteoglicanos y las fibras de colágeno adquieren una orientación radial que siguen la orientación de las columnas de condrocitos. Esta zona provee la mayor resistencia a las fuerzas de compresión.

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión

- En la **zona calcificada** los condrocitos son más pequeños con un fenotipo hipertrófico. En esta zona predomina el colágeno tipo X (Col X), el cual tiene una función crucial en la transmisión de cargas y la calcificación. Esta zona actúa como un ancla entre el cartílago articular y el hueso subcondral.
- Finalmente, la denominada **“Tidemark”** que es una capa delgada que se localiza en la base de la zona profunda y resiste las fuerzas cortantes, además representa la zona de transición de la zona profunda a la zona calcificada (Poole, 1997)(Sophia Fox et al., 2009)(Athanasίου, Darling, DuRaine, Hu, & Reddi, 2013)



**Figura 2. Zonas del Cartílago articular.** El cartílago articular se divide en 4 zonas: la superficial, media, profunda y calcificada. Las cuales se diferencian entre sí por la morfología de los condrocitos, densidad celular, orientación de las fibras de colágeno y composición bioquímica (Fuentes-Mera et al., 2019)

### 1.1.1.2 Condrocitos

Los condrocitos son el único componente celular del cartílago; representan del 2 al 5% del volumen del tejido, tienen una baja actividad metabólica con poca o nula división celular, lo cual influye en la pobre capacidad de regeneración del cartílago articular.

Los condrocitos pueden trabajar en condiciones de hipoxia donde la tensión del oxígeno en las diferentes zonas del cartílago oscila del 1% al 10%, comparado con el 24% que se encuentra en la atmósfera. Además, son los responsables de mantener la composición y organización de la MEC mediante la síntesis de componentes como el colágeno, las glicoproteínas, los proteoglicanos, el ácido hialurónico, entre otros (Y. et al., 2013)(Brighton & Heppenstall, 1971).

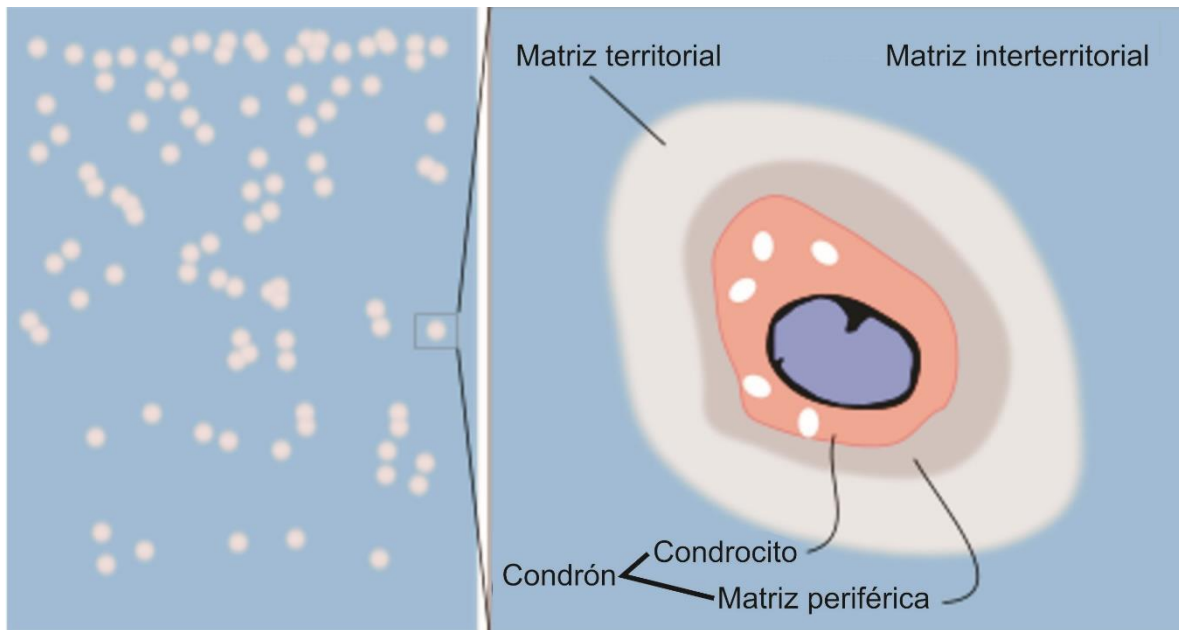
### 1.1.1.3 Matriz extracelular

La MEC representa 95% del peso seco del cartílago articular, se compone principalmente de fibras de colágeno y proteoglicanos. El **colágeno** representa la mayor proporción del peso seco del cartílago (59-90%), donde el colágeno tipo II representa el 90 al 95% del contenido de colágeno en el cartílago. Los colágenos tipo I, IV, V, VI, IX y XI también se encuentran presentes, aunque en una menor proporción.

Los **proteoglicanos** constituyen del 15 al 40% del peso seco del cartílago articular, consisten en un núcleo proteico unido a una o más cadenas de glucoproteínas

altamente glucosiladas (GAGs). El principal proteoglicano presente en el cartílago es el agregano; sus fibras se encuentran atrapadas dentro de los poros de las redes de colágeno, unidas de forma no covalente a otro GAG llamado ácido hialurónico. Esta unión es estabilizada por proteínas de unión, las cuales son pequeñas proteínas globulares sintetizadas por los condrocitos. Otros GAGs presentes en el cartílago articular son el sulfato de condroitina, sulfato de queratán y sulfato de dermatán. Cabe resaltar que la mecánica y estructura del cartílago articular dependen de la integridad de su MEC (March & Little, 2016).

La MEC que rodea a los condrocitos se divide en zonas de acuerdo con la distancia de éstas con respecto a las células. La **matriz periférica** rodea directamente al condrocito, juntos se denominan condrón. Es rica en fibronectina, proteoglicanos y colágenos tipo II, VI y IX, donde predomina la presencia de colágeno tipo IV. La **matriz territorial** se encuentra rodeando a la matriz periférica, formando una red alrededor de las células; en su mayoría contiene colágeno tipo IV. Por otro lado, la **matriz interterritorial** se encuentra más alejada de los condrocitos; está formada de colágeno tipo II, IX y XI. Esta zona tiene una mayor contribución en las propiedades mecánicas del cartílago (figura 3) (Y. et al., 2013)(Gao et al., 2014).



**Figura 3. Zonas de la matriz extracelular.** La matriz extracelular que rodea a los condrocitos se divide en: **matriz periférica** (la cual rodea directamente al condrocito), **la matriz territorial** (rodea a la matriz periférica) y **matriz interterritorial** (se encuentra más alejada de los condrocitos). (Mejía Pacheco, Molist Garcia, & Pomal Diego, 2019)

### 1.1.2 Hueso subcondral

El cartílago articular y el hueso subcondral forman el complejo osteocondral. El hueso subcondral está compuesto principalmente de colágeno tipo I (Col I), hidroxiapatita (HAp) y agua, los cuales en conjunto confieren una estructura más rígida y resistente en comparación con el cartílago (X. Li, Ding, Wang, Zhuang, & Chen, 2015)(Oliveira & Reis, 2017). El hueso subcondral, juega un rol importante en la conducción de las cargas en las articulaciones, además es un soporte para el cartílago articular. Éste provee un microambiente biomecánico adecuado para la diferenciación y desarrollo del tejido cartilaginoso. El hueso subcondral está

formado por la placa de hueso subcondral y el hueso esponjoso subcondral. El primero es una delgada lámina cortical que se encuentra justo debajo de la zona calcificada del cartílago articular; cuenta con conductos que proveen un enlace directo entre el cartílago articular y el hueso esponjoso subcondral. Es metabólicamente más activo, y además posee un gran número de vasos arteriales y venosos, así como nervios; los cuales penetran a través de los canales y envían pequeñas ramificaciones al cartílago calcificado. El hueso esponjoso es más poroso, metabólicamente activo, contiene vasos sanguíneos, nervios sensoriales, y médula ósea. El hueso subcondral exhibe una estructura y una mecánica anisotrópica, mostrando diferentes propiedades mecánicas (G. Li et al., 2013)(Pei, Fan, Zhang, Zhang, & Yu, 2014).

### **1.1.3 Propiedades mecánicas del complejo osteocondral**

Las propiedades mecánicas del cartílago articular se atribuyen a la estructura y composición de su MEC, incluyendo la fase acuosa, la cual consiste de agua con iones disueltos, así como una matriz sólida que presenta fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo II, agregados de proteoglicanos, proteínas, lípidos y células (Haider & Guilak, 2007). Como ya se mencionó, el agua es el principal componente del cartílago, además, influye en las propiedades de lubricación y amortiguación de éste. Cuando se somete a fuerzas de compresión; el agua permite que el cartílago se deforme al fluir dentro y fuera del cartílago articular.

El colágeno, principalmente el colágeno tipo II da al cartílago gran resistencia a la tracción (Landínez-Parra, Garzón-Alvarado, & Vanegas-Acosta, 2012). Por otro lado, los PGs son responsables de la resistencia a la compresión del cartílago.

El cartílago articular, exhibe variaciones en sus propiedades de compresión dentro de las diferentes zonas del cartílago, según su profundidad, debido al contenido bioquímico de cada zona. Esta propiedad también puede variar con la edad, observándose que durante la vejez existe una menor resistencia a la compresión y menor contenido de PGs mientras que el contenido de colágeno permanece estable (E. Han, Chen, Klisch, & Sah, 2011).

Por otro lado, el hueso subcondral provee soporte al cartílago. Además, influye en la capacidad de carga del cartílago articular, al absorber la mayor parte de las cargas sobre las articulación; aproximadamente 30% de las cargas sobre la articulación (Tamaddon, Wang, Liu, & Liu, 2018).

## **1.2 Defectos condrales**

El cartílago articular se puede lesionar como resultado de fuerzas excesivas de compresión sobre el tejido; y cabe resaltar que generalmente las lesiones condrales no sanan espontáneamente. Este tipo de lesiones se pueden clasificar de acuerdo con diversas escalas, siendo la más utilizada la escala de Outerbridge. Esta escala clasifica las lesiones condrales en cinco grados, del grado 0 al grado IV (figura 4).

- **Grado 0:** corresponde al cartílago sano.

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión

---

- **Grado I:** engloba a las lesiones superficiales que se caracterizan por hinchazón y ablandamiento del tejido.
- **Grado II:** corresponde a un defecto de espesor parcial que afecta menos del 50% del espesor del cartílago, donde se puede observar ulceración, fibrilación o fisuras no mayores a 1.2 cm de diámetro.
- **Grado III:** Agrupa a las lesiones donde se observan ulceraciones, fibrilación o fisuras mayores a 1.2 cm de diámetro, afectando 50% o más del espesor del cartílago articular, llegando a exponer el hueso subcondral.
- **Grado IV:** Estas son las lesiones más severas, caracterizadas por ser de espesor completo; en este tipo de lesiones se observa la erosión del cartílago articular con exposición e incluso daño del hueso subcondral (Slattery & Kweon, 2018)(Shah, Naware, Bhatnagar, & Kulkarni, 2014).

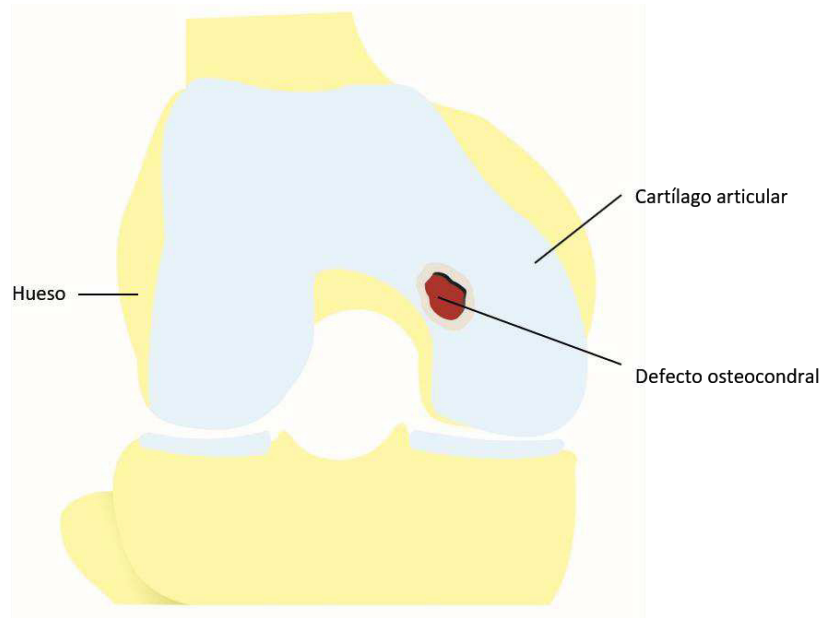


**Figura 4. Sistema de clasificación Outerbridge.** Clasificación de defectos condrales de acuerdo con la dimensión de la lesión. Grado 0: cartílago sano. Grado I: lesiones superficiales. Grado II: lesiones no mayores a 1.2 cm de diámetro. Grado III: lesiones mayores a 1.2 cm de diámetro. Grado IV: involucra la exposición y/o lesión del hueso subcondral.

### **1.2.1 Lesiones grado IV o de espesor completo**

Las causas asociadas a las lesiones de espesor completo varían desde el desgaste natural del tejido hasta lesiones relacionadas con traumatismos. Estos pueden iniciar en el hueso subcondral, el cual se vuelve débil perdiendo su capacidad de soportar adecuadamente las cargas ejercidas sobre la articulación, causando así una degeneración del cartílago articular. Por otro lado, cuando el daño inicia en el cartílago articular, éste comúnmente se debe a traumatismos severos que frecuentemente involucran al hueso subcondral (Sosio et al., 2015).

Los defectos de espesor completo raramente sanan espontáneamente, la distribución anormal de las cargas sobre la articulación y el subsecuente colapso de la superficie articular, se vuelve inevitable, provocando un mayor daño en el tejido. Cuando se empezaron a tratar este tipo de defectos, los tratamientos se enfocaron en el cartílago articular sin considerar el tejido subcondral, el cual debe ser visto como un componente crítico de la unidad OC, por lo que la mayoría de los resultados fueron desalentadores (X. Li et al., 2015).



**Figura 5. Defecto condral grado IV o de espesor completo.** Involucra el daño del cartílago articular llegando hasta el daño total o parcial del hueso subcondral. El cartílago adyacente al daño se observa deteriorado.

### **1.3 Tratamiento de defectos condrales**

Actualmente existe una variedad de tratamientos para los defectos condrales (figura 6). Estos oscilan desde tratamientos meramente paliativos, hasta tratamientos que tienen como objetivo reparar el tejido. La microfractura del hueso subcondral ha sido uno de los tratamientos más utilizados en la clínica, éste se basa en el reclutamiento de células troncales mesenquimales de la médula ósea (CMMs-MO) y de factores de crecimiento hacia el sitio de la lesión, los cuales se espera, ayuden en la reparación del defecto (Smith, 2005). Algunos tratamientos basados en terapia celular son el implante de condrocitos autólogos (ICA) y el implante de matriz de condrocitos autólogos (IMCA).

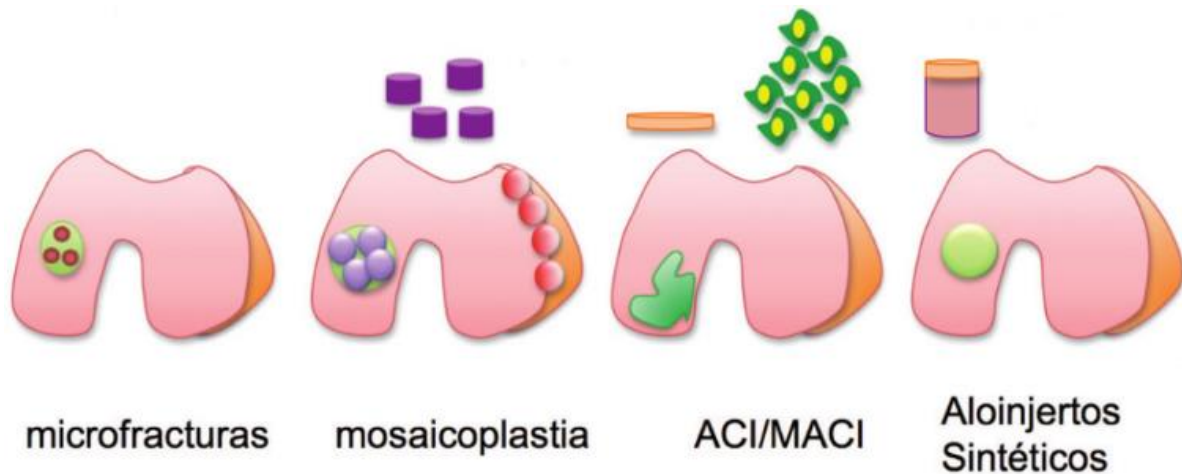
El ICA implica el aislamiento y expansión de condrocitos del paciente, lo cual involucra una primera cirugía para obtener las células. Subsecuentemente éstas son trasplantadas en el sitio del defecto en un colgajo perióstico (Brittberg et al., 1994). De acuerdo con varios autores, la principal desventaja de estos tratamientos es el relleno de la lesión con fibrocartílago en sustitución del cartílago hialino.

Por otro lado, la mosaicoplastia, es un tratamiento basado en el trasplante del tejido “completo” por lo que es necesario tomar cartílago del paciente a partir de una zona que soporte poca carga y para ser implantado en el sitio del defecto. Este acercamiento terapéutico presenta como principales desventajas la complejidad de embonar y suturar el tejido obtenido con el sitio de la lesión, así como la morbilidad causada al sitio donante.

Estos enfoques comprueban que el tratamiento o remplazo de solamente el cartílago articular es complicado, en parte por la dificultad para conectarse con el hueso subcondral.

El hueso subcondral juega un papel importante en la reparación de los defectos OC y ya que es bien sabido que la integración hueso-hueso es más fácil y rápida que la integración cartílago-cartílago; la inclusión de éste, es esencial para facilitar la integración del implante con el tejido circundante. (Pan et al., 2015). Los aloinjertos OC involucran el trasplante de la unidad OC completa, ésta ha demostrado buenos resultados, sin embargo tienen algunas limitaciones como la necesidad de varios injertos para rellenar por completo el sitio de la lesión, pero sobre todo la limitación de donadores cadavéricos (Smith, 2005). Por estas razones, la ingeniería de tejidos

busca resolver estas limitaciones y, uno de los enfoques consiste en el diseño de andamios tridimensionales (3D) y bifásicos con formas y tamaños predefinidos.



**Figura 6. Tratamientos para lesiones condrales y osteocondrales.** Existen diversos tratamientos que tienen como objetivo la reparación de las lesiones osteocondrales. Estos involucran desde el uso de células autólogas hasta el uso de aoinjertos. (Álvarez, Ripoll, Restrepo, & Forriol, 2010)

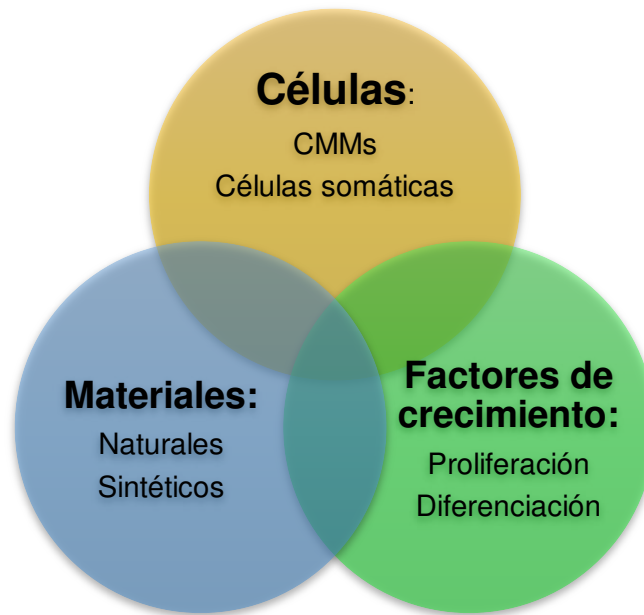
#### 1.4 Ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos combina el uso de células, biomateriales y factores de crecimiento para regenerar y reconstruir tejidos. Estos enfoques permiten diseñar soportes que cubran la necesidad del paciente, produciendo andamios biológica y mecánicamente competentes y similares al tejido nativo, lo cual tiene repercusiones positivas sobre la obtención de resultados reproducibles y una regeneración duradera (Martin, Miot, Barbero, Jakob, & Wendt, 2007).

### 1.4.1 Células

Algunas de las fuentes de células más utilizadas en la regeneración del tejido OC son los condrocitos, fibroblastos, CMMs y células genéticamente modificadas. Los condrocitos autólogos han mostrado resultados relativamente exitosos, sin embargo, presenta ciertas limitaciones como el bajo número de células presentes en el tejido, requiriendo así que éstos sean expandidos *in vitro*; además, existe una desdiferenciación de las células durante su cultivo *in vitro* lo cual resulta en un decremento de la síntesis de proteoglicanos y una mayor expresión de Col I. Adicionalmente, como ya se mencionó antes, es necesario realizar una primer cirugía al paciente para poder coleccionar las células, causando así un nuevo defecto, lo cual puede conducir a futuros problemas (Nukavarapu & Dorcenus, 2013)(Bilgen, Orsini, Aaron, & Ciombor, 2007).

Para resolver las limitaciones que presenta el uso de condrocitos, se han utilizado CMMs, éstas se encuentran en una gran variedad de tejidos humanos, incluyendo la médula ósea, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, dermis, sangre, tejido dental, cordón umbilical, amnios y tejido adiposo (TA) (Kong, Zheng, Qin, & Ho, 2017) (Ng, Bernhard, & Vunjak-Novakovic, 2016).



**Figura 7. Pilares de la ingeniería tisular.** La ingeniería tisular combina el uso de materiales, células y/o factores de crecimiento para la producción de andamios que tienen como objetivo reparar y regenerar tejidos.

#### 1.4.1.1 Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMMs-TA)

El tejido adiposo es un tejido fácil de coleccionar, y las CMMs obtenidas del mismo, se pueden aislar fácilmente mediante métodos enzimáticos conservando la capacidad para ser diferenciadas hacia los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico. Además, debido a que las CMMs-TA constituyen hasta el 2% del material dentro de la fracción estromal del tejido adiposo (TA), el rendimiento de aislamiento es alto en comparación con otras fuentes. El número de células que se pueden obtener a partir del tejido adiposo comparado con un volumen similar de MO es de

aproximadamente 300 veces más. Adicionalmente la cantidad de tejido adiposo que se puede coleccionar de un paciente pueden ser cientos de mililitros (ml), comparado con los pocos ml que se pueden obtener a partir de médula ósea por aspirado. Todo esto hace al tejido adiposo una fuente atractiva para el aislamiento de las CMMs (Ruetze & Richter, 2014)(Dai, Wang, Samanipour, Koo, & Kim, 2016).

Tradicionalmente, las células han sido cultivadas en condiciones 2D, lo cual resulta inapropiado cuando realmente se quieren imitar las interacciones célula-célula y célula-microambiente que existen *in vivo*. Por lo que actualmente el cultivo 3D en andamios es una estrategia prometedora para mimetizar el microambiente celular *in vivo* mejorando así la diferenciación de las CMMs (Cukierman, Pankov, & Yamada, 2002)(Edelman & Keefer, 2005).

#### **1.4.2 Andamios**

La ingeniería de tejidos ha tratado de promover la reparación osteocondral, mediante el uso de substratos artificiales o naturales, que pueden ser usados como andamios que provean el ambiente en el cual las células sean capaces de adherirse, proliferar, diferenciarse, depositar MEC y mantener el fenotipo diferenciado. Por lo que definir la composición bioquímica, arquitectura, porosidad y características mecánicas de los andamios, es indispensable para obtener resultados exitosos. Además el material con el que se fabriquen los andamios debe tener una tasa de degradación y reabsorción controlada y sobre todo sincronizada, con la formación

del tejido *de novo* para evitar el colapso de éste (Ravanetti et al., 2015)(Barron et al., 2015)(Nooeaid, Salih, Beier, & Boccaccini, 2012).

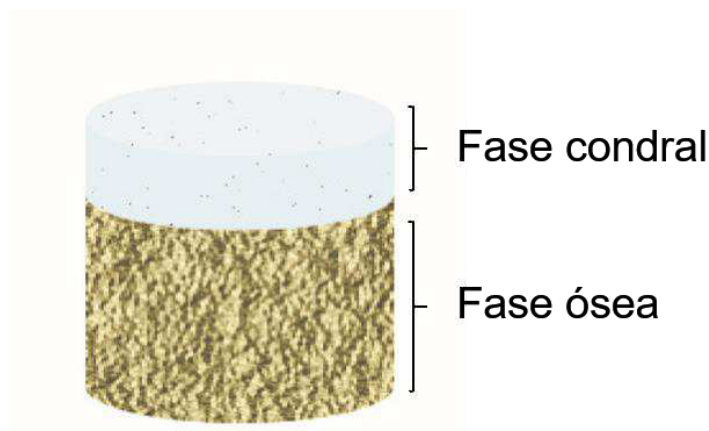
#### **1.4.2.1 Andamios osteocondrales**

La unidad osteocondral está formada por dos tejidos intrínsecamente diferentes, el cartílago articular y el hueso subcondral, por esta razón resulta difícil emplear un andamio monofásico con propiedades homogéneas para su regeneración. Una de las razones de esto, es que éste, no sería capaz de soportar las actividades metabólicas y morfogénicas de los diferentes tipos celulares que componen la unidad osteocondral, así como no podría mimetizar la mecánica de éste. Actualmente se trabaja en el diseño y desarrollo de andamios multifásicos y heterogéneos, que sean capaces de simular al cartílago articular y al hueso subcondral (Pan et al., 2015)(Nooeaid et al., 2012).

Un andamio osteocondral ideal debe poseer una fase condral (FC) que sea flexible, resiliente y que permita el movimiento entre los huesos de las articulaciones, así como poseer poros pequeños ( $<250 \mu\text{m}$ ) que ayuden a mantener la hipoxia y la característica avascularidad del tejido; y una fase ósea (FO) más rígida, que soporte la capa superior de cartílago y que se integre con el hueso nativo, con poros más grandes (300-600  $\mu\text{m}$ ) que permitan un tejido vascularizado (figura 8). Ambas fases deben ser mecánicamente competentes, que resistan las fuerza de compresión ejercidas sobre la articulación, así como tener la habilidad de unirse entre sí para

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión

formar una sola unidad (J. J. Li et al., 2015). Se han propuesto varios métodos para la fabricación y desarrollo de andamios bifásicos, con la hibridación de dos o más materiales distintos. Para el cartílago articular comúnmente se han utilizado compuestos sintéticos y naturales tales como el alginato (AG), quitosano, la fibroína de seda (FS) y la matriz de cartílago descelularizada (MCD) entre otros; mientras que para el hueso subcondral se han utilizado cerámicas, materiales metálicos así como polímeros o aloinjertos para su fabricación (Shimomura, Moriguchi, Murawski, Yoshikawa, & Nakamura, 2014).



**Figura 8. Andamio bifásico para regenerar lesiones osteocondrales.** Debe contar con una fase condral, la cual debe ser elástica y con poros pequeños; así como una fase ósea, la cual debe ser más rígida y poseer poros grandes, del tamaño que permitan la vascularización del tejido.

### 1.4.2.2 Alginato

El alginato de sodio (AG) es un biopolímero; es la forma de sal sódica del ácido algínico y la goma extraída principalmente de las paredes celulares de las algas pardas o feofíceas, con actividad quelante. En su estado natural se encuentra

formando geles con iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  y  $\text{Ba}^{+2}$  (Haug, 1964). Contienen cantidades variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L gulurónico, unidos por enlaces glucosídicos, agrupados en tres tipos de segmentos: D-manurónico (M), L-gulurónico (G) y un tercer segmento de diadas con ambos ácidos alternado (MM, GG, MM) (Hernandez-Carmona et al., 2012). El AG tiene una gran variedad de usos en diferentes campos, desde la industria de alimentos hasta la biomedicina.

Uno de los usos que se le ha dado al alginato en el campo de la biomedicina es la encapsulación y distribución de biomoléculas o células (Tolle et al., 2018). Además, el AG ha sido ampliamente utilizado en la fabricación de andamios 3D celularizados con condrocitos o con CMMs con el objetivo de regenerar lesiones condrales. Se ha reportado una buena adhesión, proliferación y deposición de MEC por parte de las células cultivadas sobre estos andamios, sin embargo una de las principales desventajas de este biomaterial es la pobre mecánica, lo cual es un punto clave en la regeneración del tejido condral y del complejo osteocondral (Kankala et al., 2018)(Mata et al., 2017).

#### **1.4.2.3 Matriz extracelular descelularizada**

La matriz extracelular es un componente clave del microambiente de los tejidos. Es importante en procesos como la adhesión, migración, proliferación e incluso diferenciación celular. Debido a esto, se tiene gran interés en la MEC como componente de los andamios 3D, la cual puede ayudar a mimetizar el microambiente natural del tejido blanco. La matriz extracelular descelularizada ha

sido ampliamente utilizada en la regeneración de diversos tejidos como tráquea, vejiga, piel, corazón, cartílago, hueso, entre otros, tanto en estudios animales como en humanos. En general, durante su descelularización, se busca que ésta preserve sus características estructurales, bioquímicas y biomecánicas eliminando los componentes celulares que pudieran despertar una respuesta inmune (Crapo, Gilbert, & Badylak, 2011).

Se han fabricado diversos andamios a partir de la MEC descelularizada, sola o en combinación con otros biomateriales, en forma de hidrogeles. Además, se ha demostrado su bioactividad, ya que cuando estos son celularizados con CMMs, las células pueden diferenciarse al linaje que normalmente se encuentra presente en la MEC descelularizada utilizada para fabricar el andamio. Algunos ejemplos son el tejido adiposo descelularizado, la matriz de cartílago descelularizada, así como matriz de hueso descelularizada, los cuales al ser celularizados con CMMs-TA, éstas se han diferenciado a adipocitos, condrocitos y osteoblastos, respectivamente (T. T. Y. Han, Toutounji, Amsden, & Flynn, 2015)(Rothrauff, Yang, & Tuan, 2017).

La matriz de cartílago descelularizada ha sido ampliamente estudiada para la regeneración de lesiones condrales, siendo la más utilizada la matriz de cartílago bovino (MCB). Diversos métodos fisicoquímicos se han probado para su descelularización, y se han cultivado *in vitro* con CMMs-MO o CMMs-TA, logrando que estas se diferencien a un linaje condrogénico. Sin embargo, la principal desventaja del uso de este biomaterial es que, al someterse al proceso de descelularización, pierde capacidad mecánica (Benders et al., 2014)(Rothrauff et al., 2017).

Por otro lado, el estándar de oro para la regeneración ósea sigue siendo el uso de hueso autólogo, sin embargo, esto representa la necesidad de realizar una primera cirugía y lesión en el paciente para poder obtener el injerto. Los implantes alogénicos de hueso también son frecuentemente utilizados, y estos han demostrado buenos resultados, lo que puede indicar un papel crucial de la MEC del hueso en la regeneración ósea (A. Mansour, Mezour, Badran, & Tamimi, 2017). No obstante, los implantes alogénicos tienen un alto costo, así como poca disponibilidad de donadores, por lo que se ha buscado utilizar la MEC de origen animal. Existen diversos trabajos en los que se han analizado la estructura y propiedades bioquímicas del hueso bovino descelularizado (HBD) comparado con el hueso humano, demostrando que si bien existen algunas diferencias en la arquitectura y composición de la MEC de hueso humano y bovino, ambas permiten la adhesión y proliferación celular, donde éstas son capaces de secretar MEC mineralizada (Sladkova et al., 2018).

#### **1.4.2.4 Fibroína de seda**

La fibroína de seda (FS) se ha utilizado ampliamente en la industria textil y recientemente como biomaterial. La seda puede obtenerse de miembros de la clase Arácnida, así como algunos gusanos Lepidópteros. Las fibras de la seda del gusano *Bombyx mori* han sido utilizadas con éxito por siglos como material de sutura, esta es una de las razones por las cuales se ha investigado su uso como biomaterial. La FS constituye del 72 al 81% de los capullos de seda, y es purificada al hervir los capullos en una solución alcalina, en donde la sericina de la seda es removida

durante el proceso de desengomado (Vepari & Kaplan, 2007)(Caballero Mendez, Rivera Cano, Gaviria Arias, & Arias, 2016). El uso de este biomaterial ha ganado prestigio en la ingeniería de tejidos principalmente por su biocompatibilidad, su capacidad de soportar la adhesión y proliferación celular, sus excelentes propiedades mecánicas, degradación controlada y su versátil procesabilidad; por lo que se ha empleado para la regeneración de una gran variedad de órganos.

La FS se ha utilizado ampliamente en diversas formas tales como geles, películas, esponjas y polvo (Rockwood et al., 2011). Estos andamios se pueden fabricar a partir de soluciones acuosas o bien mediante el uso de solventes tales como el hexafluoroisopropanol (HFIP). Además, se ha reportado que el solvente en el que se disuelve la FS tiene efecto sobre la estructura del andamio, así como sobre su tiempo de degradación, en donde los andamios fabricados con fibroína acuosa tienen un tiempo de vida promedio de 2 a 6 meses, mientras aquellos fabricados con FS disuelta en HFIP llegan a tener un tiempo de vida de hasta 1 año (Wang et al., 2008). Ambos tipos de andamios se han empleado para tratar lesiones condrales e incluso del complejo osteocondral. Como anteriormente se mencionó el cartílago es un tejido avascular y las únicas células que forman parte de éste son los condrocitos, lo cuales tienen poca capacidad de migración, por lo que estas características hacen que las lesiones que llegan a ocurrir en el cartílago se reparen lentamente e incluso no se reparen de forma espontánea. Por lo que tener un andamio con un tiempo de degradación largo podría mejorar el tratamiento de este tipo de lesiones. Sumando a esto, las buenas propiedades mecánicas de la FS, lo hace un biomaterial de interés para la fabricación de andamios osteocondrales.

### **1.4.3 Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que dirigen el desarrollo de las células mediante señales bioquímicas que estimulen la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación celular. Los factores de crecimiento tienen un tiempo de vida corto y actúan localmente debido a su poca capacidad de difusión a través de la MEC. El mecanismo de señalización inicia con la secreción del factor de crecimiento por la célula productora, éste se une a un receptor específico de membrana de las células blanco estimulando una respuesta (Subbiah & Guldberg, 2018).

Debido al efecto de los factores de crecimiento sobre las funciones celulares como la diferenciación, estos están siendo evaluados en la regeneración de tejidos incluyendo la del cartílago, en donde uno de los factores de crecimiento más estudiado es el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF $\beta$ 1) (Lee, Silva, & Mooney, 2011).

#### **1.4.3.1 Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF $\beta$ 1)**

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF $\beta$ 1) es un factor capaz de inducir la condrogénesis. Diversos estudios han reportado que el uso de TGF $\beta$ 1 puede inducir la diferenciación condrogénica sobre las CMMs aisladas de diversas fuentes como la médula ósea o el tejido adiposo (Mehlhorn et al., 2007)(Deepthi & Jayakumar, 2016). Además, puede inducir la proliferación y maduración de los condrocitos, y mejorar la producción y secreción de Col II y proteoglicanos, lo que

repercute de forma positiva sobre las propiedades biomecánicas del neocartílago (Liu et al., 2015)(Zhou et al., 2017). El TGF $\beta$ 1 ha sido utilizado ampliamente para inducir la diferenciación condrogénica de las CMMs-TA *in vitro* e incluso ha sido integrado en andamios para mejorar la regeneración de defectos condrales *in vivo*.

## **1.5 Modelo animal**

El uso de modelos *in vivo* es requerido para analizar la eficacia en la aplicación de la Ingeniería de Tejidos en humanos. Entre muchos aspectos, la selección del modelo *in vivo*, es de vital importancia ya que éste proveerá de información útil acerca de la respuesta biológica del tratamiento en el hospedero. Para elegir el modelo animal es necesario tomar en cuenta factores como el costo, la técnica de operación así como los cuidados postoperatorios (Reinholz, Lu, Saris, Yaszemski, & O'Driscoll, 2004) . Además, el modelo animal elegido debe ser capaz de responder a la pregunta de investigación. Existen dos puntos importantes a evaluar en un tratamiento con Ingeniería de Tejidos; la biocompatibilidad de éste, así como la eficacia con la que cumple el efecto para el cual fue diseñado (W. J. Li et al., 2009).

### **1.5.1 Ensayo de biocompatibilidad**

La necesidad de producir andamios para regenerar un tejido ha llevado a estudiar diversos biomateriales para su fabricación. Al seleccionar el material con el cual se va a fabricar un andamio es importante que no despierte una reacción inmune en el

cuerpo o bien que esta reacción sea mínima. La clave para entender la biocompatibilidad es comprender cual mecanismo químico, bioquímico, fisiológico, físico u otro, ha sido activado por el contacto del biomaterial con el cuerpo y además entender las consecuencias de estas interacciones (Williams, 2008). Las principales respuestas que deben ser tomadas en cuenta son: inflamación, cicatrización de la herida y la reacción inmunológica (Anderson, 2011).

Evaluar la biocompatibilidad de un andamio *in vivo* tiene como objetivo predecir la posible reacción inmunológica y peligros tóxicos que se puedan presentar en humanos y para cerrar la brecha entre el laboratorio y la clínica. El método más utilizado para evaluar la biocompatibilidad en la clínica, es la implantación subcutánea, la cual puede dar mucha información, aunque ésta debe ser complementada con una evaluación de la implantación en la zona en la que será utilizado el andamio; en donde el modelo *in vivo* más recomendado es el de cerdo debido a que sus parámetros fisiológicos, tales como el conteo sanguíneo, coagulación sanguínea, electrolitos y enzimas hepáticas son similares a los valores humanos (Hussein, Park, Kang, & Woo, 2016).

### **1.5.2 Modelo *in vivo* para la regeneración de lesiones osteocondrales**

Para elegir un modelo animal para la evaluación de la regeneración de lesiones osteocondrales hay que tomar en cuenta factores adicionales al costo, técnica operatoria y cuidado postoperatorio. Uno de los factores más importantes a considerar, es la similitud anatómica del tejido a evaluar con el tejido humano, ya

que los resultados deben de ser extrapolados. El grosor del cartílago es uno de los factores anatómicos a tomar en cuenta, en humanos este tiene un promedio de 2.2-2.5 mm. Uno de los modelos animales más ampliamente usados para evaluar la regeneración de lesiones osteocondrales es el conejo, principalmente por su bajo costo, además de su fácil manejo. Sin embargo, el principal problema de este modelo es que el espesor de su cartílago es de apenas 0.3 mm y el tamaño de la articulación de la rodilla no permiten reproducir las lesiones osteocondrales que se pueden presentar en el humano. El caballo es el modelo animal que más similitud tiene con respecto al espesor del cartílago, el cual es de 1.5-2 mm, sin embargo, algunas de las desventajas de este modelo es el alto costo de la especie y de su mantenimiento, el complejo cuidado postoperatorio, así como la dificultad para que sea aprobado el uso de estos animales por el comité de ética, principalmente por la relación cercana que tiene el ser humano con el caballo. Otras especies comúnmente usadas como modelos animales son la cabra, el borrego y el cerdo, de los cuales el grosor de su cartílago es de 0.7-1.5 mm, 0.4-0.5 mm y 1.5 mm respectivamente (Frisbie, Cross, & McIlwraith, 2006) (W. J. Li et al., 2009).

Cerdos domésticos y mini-pigs han sido utilizados como modelos animales debido al espesor de su cartílago, por otro lado, la anatomía intraarticular es similar a la observada en la rodilla humana y a las dimensiones en la articulación, que permiten reproducir lesiones que se pueden presentar en el humano (Hurtig et al., 2011). Por estas razones el modelo de cerdo resulta atractivo para evaluar la regeneración de lesiones osteocondrales *in vivo*.

## **CAPÍTULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

Admitidas las dificultades de la reparación del tejido condral y las limitaciones de la mayoría de las técnicas terapéuticas disponibles en la actualidad para este fin, las investigaciones actuales se centran en la terapia celular y en técnicas de ingeniería de tejidos.

La regeneración de tejidos complejos como la unidad osteocondral, a través de la combinación de andamios bifásicos y diferenciación multilínea de las células troncales representa una estrategia prometedora. Sin embargo, es necesario evaluar el éxito de las terapias en modelos animales para valorar el proceso reparativo del complejo osteocondral en lesiones de cartílago de espesor completo (grado III y IV) como requisito para su aplicación en ensayos clínicos.

### **HIPÓTESIS**

Un implante bifásico celularizado constituido por fibroína, MCB y MHB, se integra de manera eficiente con el tejido circundante al sitio de la lesión y presenta características biomecánicas e histológicas propias del cartílago hialino; propiedades útiles en el tratamiento de lesiones de cartílago articular de espesor completo.

## CAPÍTULO III

### OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral de rodilla en un modelo *in vivo* de cerdo después del tratamiento con un implante bifásico.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Generar andamios bifásicos a partir de matriz de cartílago bovino-fibroína de seda/matriz de hueso bovino (MCB-FS/MHB) y MCB-alginato/matriz de hueso bovino (MCB-ALG/MHB); y evaluar sus propiedades elásticas mediante el módulo de Young.
2. Evaluar la biocompatibilidad de los andamios con mejores propiedades elásticas, en un modelo subcutáneo de rata.
3. Evaluar la integración, así como la capacidad reparativa en un modelo de daño articular en rodilla de cerdo, de aquellos andamios con mejores propiedades elásticas.

## CAPITULO IV

### METODOLOGÍA

#### ESTRATEGÍA GENERAL

Para llevar a cabo los objetivos planeados en el presente proyecto de tesis, se realizó la siguiente estrategia experimental.

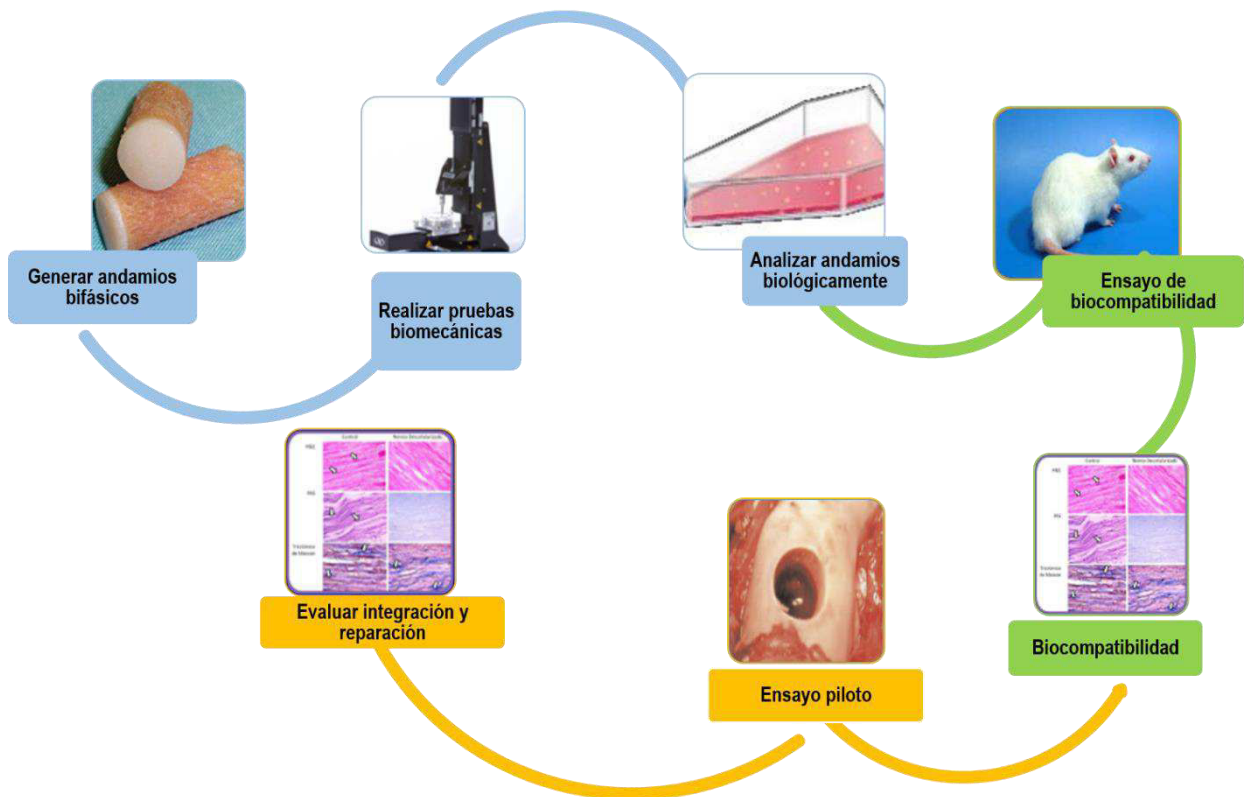


Figura 9. Estrategia general del proyecto.

## **Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Así como en el Centro de Ingeniería Celular y Molecular del departamento de Cirugía Ortopedia, Escuela de Medicina de la Universidad de Pittsburgh.

### **4.1 Material de uso general**

Tubos de microcentrífuga de 0.2, 1, 1.5 y 2 ml (Fisher Scientific, New Hampshire, USA), tubos cónicos de 15 y 50 ml (Corning, New York, USA), puntillas desechables para micropipeta de 10, 200 y 1000  $\mu$ l (Corning, New York, USA), puntillas desechables con filtro para micropipeta de 10, 200 y 1000  $\mu$ l (Fisher Scientific, Hampshire, USA) y material de vidrio (Corning, New York, USA).

### **4.2 Equipo de laboratorio de uso general**

Centrífuga 5804R (Eppendorf, Hamburg, Germany), plancha de calentamiento (VWR International, Pennsylvania, USA), Vortex marca Vortex-genie (Scientific Industries Inc, New York, USA), Minispin (Qualitron Inc, Pakistan), y Congelador vertical -80°C (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

### **4.3 Material y reactivos para cultivo celular.**

Para el cultivo celular se utilizó material plástico adquirido de la compañía tecnológica Corning (New York, USA). Entre los materiales plásticos utilizados se encuentran pipetas serológicas de 2, 5, 10, 25 y 50 ml, botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150cm<sup>2</sup>, 225 cm<sup>2</sup> y 525 cm<sup>2</sup>, raspador celular, placas de cultivo fondo plano de 6, 12, 24 y 48 pozos, placas de baja adherencia de 48 pozos, tubos para microcentrífuga de 1.5 y 2 ml, criotubos de 2 ml, tubos plásticos de 15 y 59 ml, puntas para micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 µl, unidades de filtración de 50, 250, 500 y 1000 ml.

Los reactivos utilizados para el cultivo celular fueron DMEM alto en glucosa (Gibco, Maryland, USA), suero bovino fetal (SBF) (Corning, New York, USA), antibiótico-antimicótico y tripsina 0.25% (Gibco, Maryland, USA).

### **4.4 Material y reactivos para el ensayo de expresión génica**

Para el aislamiento de RNA se utilizó TRIzol® (Invitrogen, California, USA), el RNEasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) isopropanol, etanol al 70% y 100% (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) cloroformo (Cambridge Isotope Laboratory, Inc, Massachusetts, USA), agua estéril libre de DNAsas y RNAsas (Fisher Scientific, New Hampshire, USA). Para su cuantificación se utilizó el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Para la síntesis de ADNc se utilizó SuperScript™ IV VILLO™ Master Mix (Invitrogen, California, USA). Para el ensayo de expresión génica se utilizó el reactivo PowerUp SYBR Green Master Mix

(Applied Biosystems, California, USA), microplacas de 96 pozos MicroAmp™ Fast Optical (Applied Biosystems®, California, USA). Los primers utilizados aparecen en la tabla 2, se usó como genes normalizadores a GAPDH y RPL13a. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo en el termociclador qPCR Step One Plus (Applied Biosystems, California, USA).

#### **4.5 Lipectomía**

Cerdos de la raza Yorkshire de 70 kg se prepararon para el procedimiento quirúrgico con azaperona (Sural) y xilacina (Procin), posteriormente el sitio quirúrgico se rasuró y desinfectó con yodopovidona sódica. Se utilizó zolacepam/tiletamina (Zoletil) para inducir el plano quirúrgico. Se realizó una incisión de 4 cm de largo con ayuda de un bisturí No. 24 y se colectó grasa subcutánea en PBS, ésta se almacenó a 4°C hasta su procesamiento. La lesión fue suturada con suturas de 1-0 de ácido poliglicólico (COVIDIEN™) y los cerdos se colocaron en jaulas hasta que pasó el efecto de la anestesia.

#### **4.6 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMMs-TA)**

El aislamiento de las CMMs-TA se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad. La grasa subcutánea obtenida de las lipectomías fue cortada en pequeños fragmentos con ayuda de un bisturí No. 24. La digestión del tejido se llevó a cabo en un recipiente estéril, la grasa se mezcló con colagenasa I 0.1% (Gibco, Maryland, USA) en una relación de 1:1 y se incubó a 37°C por 2 h en agitación. Se dejó reposar 5

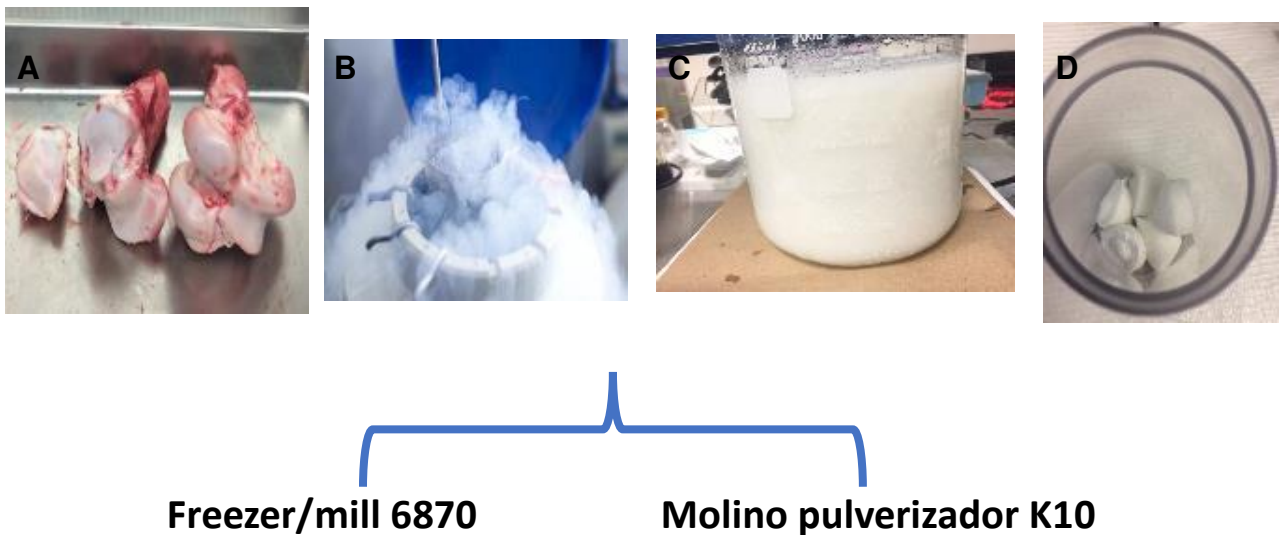
min para separar las fases, con ayuda de una pipeta serológica se colectó la fase estromal (infranadante) y se colocó en tubos cónicos estériles para centrifugar a 1,600 rpm por 6 min, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular 2 veces con PBS. El pelet celular se resuspendió en 1 ml de medio basal formulado con DMEM alto en glucosa, 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico, posteriormente se sembró en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, las cuales se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 5 días de cultivo se retiró el medio y las células se lavaron con PBS para retirar eritrocitos y las células que no se hubieran adherido a la placa. Las células se mantuvieron en cultivo con medio basal hasta el pasaje 2.

#### **4.7 Descelularización de matriz de cartílago bovino**

Para la descelularización de la matriz de cartílago bovino se utilizaron los siguientes reactivos. PBS (Invitrogen, California, USA), Tris-HCl, EDTA, MgCl<sub>2</sub>, KCl y SDS; todos de la marca Sigma Aldrich (Missouri, USA). Se utilizaron rodillas de res obtenidas de un rastro TIF. El cartílago se colectó del área de los cóndilos, rótula, y tróclea con ayuda de un bisturí No. 24 (Sensi Medical Corporation, Florida, USA). La descelularización fisicoquímica inició con cinco ciclos de choque térmico en nitrógeno líquido durante 5 min seguido de un lavado en PBS por 10 min. Posteriormente la matriz se trituró con ayuda de una licuadora. Una vez triturada, la matriz se lavó durante 24 h en buffer hipotónico (TRIS-HCL 10mM, EDTA 2mM, pH 8) suplementado con KCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM (anexo 2). A continuación, se agregó buffer hipotónico suplementado con KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> y 0.5% de SDS (anexo 3) por 18 h. El último paso de la descelularización constó de un lavado con

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

buffer hipotónico con 0.5% de SDS (anexo 4) por 36 h. Todos los lavados se realizaron en agitación constante a 30°C en una plancha de calentamiento, cada buffer se agregó en una relación de 2:1 (Buffer:cartílago); antes de cada cambio de buffer, la matriz se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para decantar el sobrenadante. Después del lavado con el buffer hipotónico con 0.5% de SDS, el cartílago se lavó con PBS con el objetivo de remover el SDS. Los lavados se realizaron hasta que no se observaron más burbujas. El cartílago se centrifugó y decantó el sobrenadante. Finalmente, el cartílago se colocó en agua desionizada durante 6h a 4°C. Se congeló a -80 °C y se liofilizó para proceder a una molienda fina. Para esto se trabajó con dos alícuotas, una se pulverizó en un molino pulverizador K10 (Micron maquinaria, Ciudad de México, México), y la otra en un Freezer/mill 6870 (Spex®SamplePrep®, New Jersey, USA).



**Figura 10. Descelularización de la matriz de cartílago bovino.** A) Colección de cartílago de rodilla bovina. B) Ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. C) Ciclos de lavado en SDS, buffer hipotónico y PBS. D) Liofilización.

#### 4.8 Descelularización de hueso bovino

Para la descelularización del hueso bovino subcondral se utilizó SDS (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (CTR Scientific, Nuevo León, México). Se colectó hueso subcondral de las rodillas de res con ayuda de una trefina de 6 mm de diámetro. Para definir el tratamiento de descelularización se probaron 5 tratamientos, los cuales constaron de 5 ciclos de un lavado en SDS al 0.1% a 100 °C seguido de ciclos de lavado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, los tratamientos variaron en el tiempo de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente los huesos se lavaron con agua desionizada con el objetivo de remover los restos de SDS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, los huesos descelularizados se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron hasta su uso. Se obtuvieron 5 grupos: grupo 1: 2.5 h, grupo 2: 5 h, Grupo 3: 7.5 h, grupo 4: 12 h, grupo 5: 24 h a los cuales se les evaluó la descelularización por hematoxilina y eosina.



Rodillas de res



SDS 1% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por  
2, 5, 7.5, 12 o 24 h

**Figura 11. Descelularización de hueso bovino.** **A.** Se colectaron chips de hueso del hueso subcondral de rodillas de res. **B.** Para su descelularización los huesos se sometieron a lavados con SDS al 1% y posterior lavado en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por 2, 5, 7.5, 12 o 24 h.

#### 4.9 Proliferación y capacidad osteoconductora de los huesos bovinos descelularizados

Para elegir el mejor tratamiento de descelularización para los huesos se evaluó la proliferación de CMM-TA sobre los andamios por el método de azul alamar (Life Technologies, California USA) (anexo 5). Para esto los andamios fueron celularizados con  $1 \times 10^5$  de CMM-TA por andamio, y se cultivaron en cajas de 48 pozos de baja adherencia con medio basal y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Como control se utilizó la matriz ósea, anorgánica del hueso bovino Nukbone®, el cual fue donado por la Dra. C. María Cristina Barba de la UNAM.

Posteriormente se evaluó la capacidad osteoconductora de los huesos descelularizados, para esto los andamios se celularizaron con  $1 \times 10^5$  CMM-TA y se cultivaron en medio basal o medio osteogénico formulado con DMEM, 10% de SBF, 100 nM de dexametasona, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato y 0.05 mM de ácido ascórbico. A los 7 días de cultivo se aisló el ARN, se sintetizó el ADNc y se evaluaron los marcadores osteogénicos RUNX2 y COL 1 (Tabla 2).

#### 4.10 Construcción de andamios

Para la fabricación de los andamios se utilizó FS al 5% (Advanced BioMatrix, California, USA), metanol (CTR Scientific, Nuevo León, México), NaCl, HFIP, alginato y  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Se fabricaron andamios bifásicos formados por una fase condral (FC) y una fase ósea (FO). **Andamios de Fibroína (FS).** - FS al 5% se liofilizó durante 24 h para remover el agua. Posteriormente ésta

## **Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

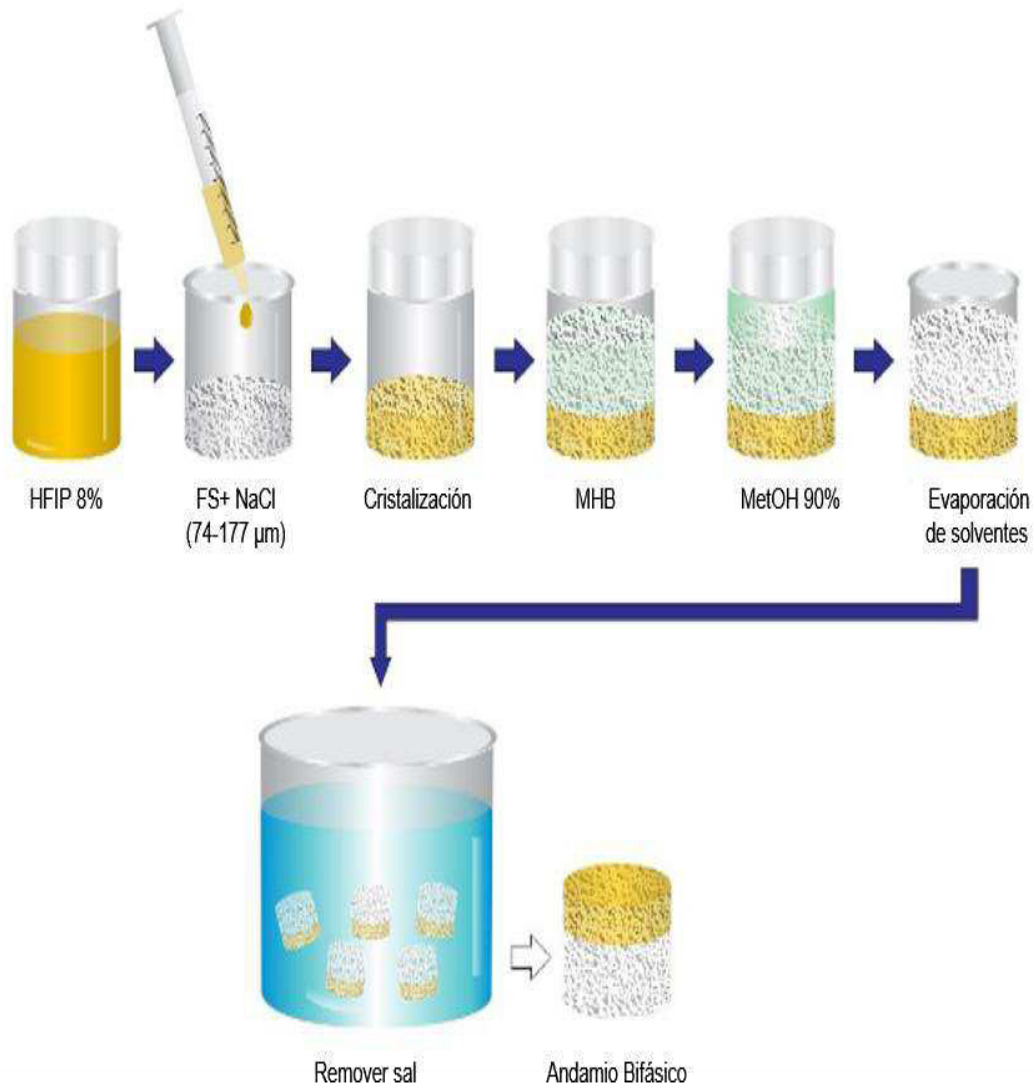
---

se disolvió en HFIP para obtener una solución de FS al 8%. La FC se fabricó con FS y sal (NaCl) con o sin MCB (pulverizada con el molino K10 o el Freezer/mil 6870) a diferentes proporciones (S:MCB 1:1, 2:1 y 3:1). La sal con o sin MCB se colocó en moldes de teflón cilíndricos y se adicionaron 140  $\mu$ l de FS por andamio. Los moldes se cubrieron para reducir la evaporación del solvente y permitir que la FS penetrara a través de las partículas de sal. Posteriormente se colocó el hueso bovino descelularizado, prehidratado con metanol al 90% para formar la fase ósea y se adicionó metanol al 90% para inducir la cristalización de la FS. Los moldes se cubrieron nuevamente y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente. Subsecuentemente, los moldes se destaparon para permitir la evaporación de los solventes durante tres días. Para remover la sal, los andamios se lavaron en agua ultrapura durante 3 días, esto con el objetivo de evitar un impacto negativo sobre las células (figura 12). Finalmente, los andamios se congelaron a  $-80$  °C y se liofilizaron durante 24 h. La esterilización se realizó con óxido de etileno. **Andamios de Alginato (AG).** - La FC estuvo formada por alginato al 1.5% con o sin MCB pulverizada con el molino K10 en una relación de 8:1 (AG:MCB). Estos se colocaron en moldes de teflón cilíndricos y se adicionó  $\text{CaCl}_2$  0.102 M para permitir la polimerización del AG. Posteriormente se colocó el HBD prehidratado en la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.102 M para formar la FO y se continuó la polimerización por 30 min para permitir que el HBD se uniera a la FC (figura 13).

Se obtuvieron 8 grupos de andamios, los grupos B, C y D fueron fabricados con la matriz pulverizada con el Freezer/mil 6870 mientras el grupo E, F, G y H se fabricaron con la matriz pulverizada en el molino K10. Grupo A: FS, Grupo B:

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

FS+S:MCB 1:1, Grupo C: FS+S:MCB 2:1, Grupo D: FS+S:MCB 3:1, Grupo E: FS+S:MCB 1:1, Grupo F: FS+S:MCB 2:1, Grupo G: FS+S:MCB 3:1, Grupo H: AG, Grupo I: AG-MCB.



**Figura 12. Fabricación de andamios bifásicos de fibroína de seda y hueso bovino descelularizado.**

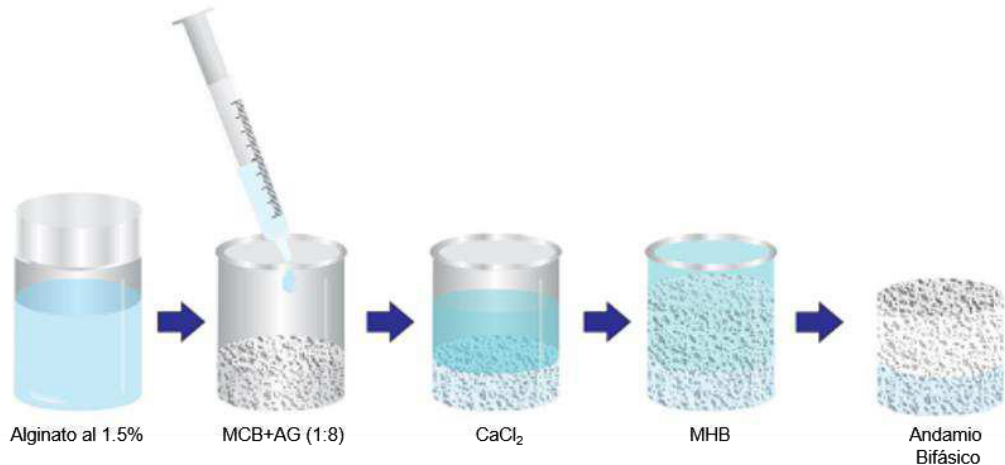


Figura 13. Fabricación de andamios bifásicos de alginato y hueso bovino descelularizado.

#### 4.11 Ensayo mecánico

Ocho grupos experimentales fueron analizados. Los andamios libres de células se hidrataron previamente en PBS por 24 horas. El ensayo mecánico se realizó en un instrumento de prueba Bose Electroforce modelo 3230 Serie II (TA instruments, Delaware, USA). Los andamios se colocaron entre el motor de compresión y la celda de carga y se sometieron a 10% de compresión (0.2mm) a una velocidad de 0.01 mm/s. Se graficó la fuerza sobre el desplazamiento. El módulo de Young se calculó a partir de la pendiente de la recta.

#### 4.12 Celularización de andamios

**Ensayo *in vitro*.** Se trabajó con andamios de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura. 4 grupos experimentales fueron analizados. CMM-TA en pasaje 3 fueron cultivados en monocapa en botellas de cultivo de 525 cm<sup>2</sup> con MB a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el 90% de confluencia, posteriormente las células se

## **Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

prediferenciaron en medio condrogénico formulado con DMEM, 0.010 mg/ml de ITS, 100 nM de dexametasona, 0.001 mg/ml de ácido ascórbico y 10 ng/ml de TGF $\beta$ 1. Al día 5 de prediferenciación en monocapa las células se tripsinizaron con tripsina 0.25%. Los andamios fueron prehidratados con medio basal durante 2 h, la fase condral se celularizó por inyección con  $0.5 \times 10^6$  células en 20  $\mu$ l de medio condrogénico. Los andamios se colocaron en cajas de 48 pozos de baja adherencia, y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 2 h para permitir que las células se adhirieran al andamio. Finalmente se agregó medio condrogénico y se cultivaron bajo las mismas condiciones por 28 días.

**Ensayo piloto.** CMM-TA en pasaje 3 fueron cultivadas en monocapa en botellas de 225 cm<sup>2</sup> con medio basal a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar el 90% de confluencia. Posteriormente las células se prediferenciaron a linaje condrogénico u osteogénico con medio condrogénico y medio osteogénico respectivamente.

Se trabajó con andamios de 3 mm de diámetro por 9 mm de altura. 3 grupos experimentales fueron analizados. Grupo 1: andamio monofásico formado solo por la fase condral, grupo 2: andamio bifásico celularizado solo en la fase condral, grupo 3: andamio bifásico celularizado en la fase condral y fase ósea. Para su celularización las células fueron tripsinizadas a los 5 días de prediferenciación y los andamios fueron prehidratados con medio basal durante 2 h. La fase condral de los andamios se celularizó con  $0.5 \times 10^6$  células en 10  $\mu$ l de medio condrogénico, se colocaron en cajas de 48 pozos de baja adherencia, y se incubaron durante 2 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. La fase ósea del grupo 3 se celularizó con  $2.25 \times 10^6$  células

en 20 µl de medio osteogénico y se incubó durante 2 h más para permitir que las células se adhirieran al andamio. Finalmente, el grupo 1 y 2 se cultivó en cajas de 48 pozos de baja adherencia en medio condrogénico. Por otro lado, el grupo 3 se incubó en un biorreactor de dos cámaras, el cual permitió que la fase condral se cultivara en medio condrogénico y la fase ósea en medio osteogénico evitando que los medios se mezclaran. Todos los grupos se cultivaron durante 12 días a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> antes de ser implantados.

#### **4.13 Aislamiento de RNA y ensayo de expresión génica**

El RNA total se aisló utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen) y el RNeasy Mini Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc se utilizó el Master Mix Super Script® IV VILLO® (Invitrogen). La qPCR se realizó en el sistema Applied Biosystem (Life Technologies). Para esto se utilizó Power Up SYBER Green PCR Master Mix (Invitrogen). Como marcadores condrogénicos se analizaron SOX9, ACAN, COL2A1, así como los marcadores de hipertrofia COL10A1 y MMP13. Los genes endógenos utilizados fueron GAPDH y RPL13a.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

**Tabla 1. Secuencias de primers.** Secuencia de primers para analizar la expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos.

SOX 9	FW 5'AACGGCTCCAGCAAGAACAAG3' RV 5'GCTCCGCCTCCTCCACGAAG3'
COL2A1	FW5'TCATCCAGGGCTCCAATGACGTG3' RV5'AACAGTCTTGCCCCACTTACCG3'
ACAN	FW5'CAACAATGCCCAAGACTACCAG3' RV5'TTCCACTCGCCCTTCTCGTG3'
COL10A1	FW5'CAGGAACTCCCAGCACGCAGA3' RV5'CAGCGTAAAACACTCCATGAACCA3'
MMP13	FW5'CGCCAGACAAATGTGACCCTT3' RV5'AAAACAGCTCCGCATCAACC3'
RUNX2	FW5'GAACTCGTCCGCACCGACAG3' RV5'ATCGTTACCCGCCATGACAGT3'
COL1A2	FW5'TAGAAAGAACCCAGCTCGCACA3' RV5'GGTTTCGCCAGTAGAGAAATCACA3'

#### 4.14 Análisis Bioquímico

Se utilizó papaína de papaya latex (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), L-Cysteina-HCl (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), acetato de sodio (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y EDTA (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). El contenido de GAGs sulfatados se midió

con el kit Blyscan™ (Biocolor, Carrickfergus, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de ADN se utilizó el Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, la fluorescencia se leyó en un lector de placas (Bio Tek Instruments, Vermont, USA) a una longitud de excitación de 485 nm y de emisión de 520nm.

#### **4.15 Análisis histológico e inmunohistoquímico**

**Ensayo *in vitro*.**- Una vez fijadas y descalcificadas las muestras se deshidrataron con acetona (CTR Scientific, Nuevo León, México), se aclaró en xilol (CTR Scientific, Nuevo León, México) y se incluyeron en parafina (McCormick Scientific, Missouri, USA), para posteriormente realizar cortes histológicos de 5µm con ayuda del microtomo (TBS Inc., North Carolina, USA), se montaron las laminillas, se desparafinaron (anexo 7) y se procedió a su tinción. Las tinciones que se realizaron fueron las siguientes:

**Hematoxilina y eosina (H&E).** Las laminillas se sumergieron en hematoxilina (ANALYTIKA INC) por 2 min, y se lavaron dos veces con agua de la llave, se realizó una inmersión rápida en alcohol-ácido, se lavó nuevamente en agua de la llave y posteriormente en agua destilada. Se realizaron dos inmersiones en agua amoniacal y se procedió a enjuagar lentamente con agua de la llave y agua destilada. Se realizaron 6 inmersiones rápidas en eosina para finalmente deshidratar en alcoholes, aclarar con Xilol y montar con resina.

**Tricrómico de Masson.** Las laminillas se colocaron en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente o 60 min a 65°C. Se lavaron las laminillas con agua de la llave hasta que se perdió el color amarillo por completo y se enjuagó en agua destilada. Se procedió a teñir los núcleos con hematoxilina férrica de Weigert (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) por 10 min. Se lavó con agua de la llave por 5 min y un enjuague con agua destilada hasta que dejó de salir color. Se tiñó con fucsina-escarlata por 5 s y se enjuagó con agua destilada hasta que quedara limpia. Se colocaron las laminillas en ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 min y enjuagaron brevemente con agua destilada. Se tiñó con azul de anilina por 15 s y se enjuagó nuevamente con agua destilada. Una vez que se eliminó el exceso de colorante las laminillas se pasaron por ácido acético al 1% por 15 s. Se deshidrató, aclaró y montó con resina.

**Safranina O.** Las laminillas se colocaron en hematoxilina férrica por 2 min para teñir los núcleos. Se lavaron con agua de la llave por 8 min y se procedió a su tinción con Safranina O al 0.1% por 3 min. Finalmente, las laminillas se deshidrataron, aclararon y montaron con resina.

**Inmunohistoquímica.** Los cortes para las inmunohistoquímicas se realizaron en laminillas silanizadas (anexo 8). Después de desparafinar e hidratar las muestras, estas se colocaron en buffer de citratos pH 6 a 80-90°C por 20 min para la recuperación antigénica. Se lavó con PBS dos veces por 5 min. Se utilizó el Mouse and rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (Abcam, Cambridge, UK). Se emplearon anticuerpos primarios para detectar colágeno I y II. Después de la recuperación antigénica (anexo 9) se añadió peróxido de hidrógeno por 10 min para

bloquear la peroxidasa endógena y se lavó 2 veces con PBS. Se añadió el bloqueador de proteínas por 10 min a temperatura ambiente para bloquear tinciones no específicas y se lavó una vez con PBS. Se aplicó el anticuerpo primario a una dilución de 1:100 y se incubó a 4°C por toda la noche. Se lavó 4 veces con PBS y se añadió el anticuerpo secundario biotinilado el cual se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces con PBS, se aplicó la estreptavidina peroxidasa y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se enjuagó 4 veces con PBS. Se añadió diaminobenzidina (DAB) al 2% y se incubó de 1 a 10 min. Se enjuagó con PBS 4 veces y se contratiñó con hematoxilina de Gill por 2 min. Se enjuagó con agua de la llave por 20 s y con agua destilada hasta que dejó de salir color. Se deshidrató, aclaró y montó con resina.

#### **4.16 Ensayo de biocompatibilidad**

Se analizaron 4 grupos experimentales. FS: Fase condral fabricada solamente con FS, FS+S:MCB 1:1: Fase condral fabricada con FS+S:MCB, HBD: Fase ósea fabricada con hueso bovino descelularizado, Andamio bifásico: andamio bifásico fabricado por la fase condral y fase ósea. Los andamios fueron prehidratados en PBS 12 h antes de ser implantados.

**Intervención quirúrgica.** 8 Ratas Wistar se anestesiaron con xilacina, Zoletil e isoflurano. A cada una se le implantó un andamio de cada grupo. El sitio de la lesión fue rasurado y se desinfectó con yodopovidona sódica. Para implantar los andamios, se realizaron 4 incisiones por rata en la zona dorsal, las lesiones fueron

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

de 1 cm con ayuda de un bisturí No. 24. En cada lesión se implantó subcutáneamente un andamio de cada grupo. La incisión fue suturada con suturas de 2-0 de ácido poliglicólico. Se aplicó Cothivet (vetoquinol) como antiséptico y promotor de cicatrización.



**Figura 14. Implantación de andamios para el ensayo de biocompatibilidad.** Los andamios se implantaron de manera subcutánea en un modelo murino. **A)** Asepsia del sitio de la cirugía. **B)** Implantación subcutánea del andamio. **C)** Sutura de la lesión

Todos los animales fueron monitoreados durante seis días y se administraron 15mg/kg de ceftriaxona (Ceftria-jet, Norvet) como antibiótico y 4mg/kg del antiinflamatorio carprofeno (Rimadyl, Pfizer) por 5 días. El tiempo de recuperación constó de ocho semanas, los animales se mantuvieron en jaulas con alimentación e ingesta de agua *ad libitum*. Durante este tiempo se monitoreó la recuperación de la lesión a nivel macroscópico. Una vez que se cumplió el tiempo de recuperación las ratas se sacrificaron con sobredosis de barbitúricos. Se indujeron con 2mg/kg de Xilacina y 50 mg/kg de Zoletil para posteriormente administrar una sobredosis (63 mg por animal) de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer). Se realizó un análisis macroscópico del sitio de la lesión, así como un análisis microscópico para

evaluar la presencia de células inflamatorias (células polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, y células gigantes multinucleadas). La intensidad de la inflamación se evaluó de forma semicuantitativa, usando una escala de cero a cuatro de acuerdo con el número de células observadas por campo (0=0 células, 1= 1-5 células, 2= 5-10 células, 3= infiltrado abundante, 4= infiltrado densamente empaquetado). Se seleccionaron tres secciones de cada muestra al azar para ser evaluadas. El valor promedio de cada parámetro fue usado para su comparación.

#### **4.17 Ensayo piloto en el modelo porcino**

Cerdos de la raza Yorkshire de 100 kg se prepararon para el procedimiento quirúrgico con azaperona (Sural) y xilacina (Procin), posteriormente el sitio quirúrgico se rasuró y desinfectó con yodopovidona sódica y se colocó un campo estéril. Se utilizó zolacepam/tiletamina (Zoletil) para inducir el plano quirúrgico. Para reducir el número de animales usados en el estudio y comparar los diferentes tratamientos en el mismo animal, se realizaron 3 lesiones en la misma rodilla, cada lesión tuvo 3 mm de diámetro por 9 mm de longitud alcanzando el hueso subcondral. Se aplicaron 3 tratamientos por individuo: Andamio monofásico: andamio monofásico celularizado, fabricado con FS+S:MCB 1:1, Andamio bifásico celularizado FC: andamio bifásico celularizado solo en la fase condral, Andamio bifásico celularizado FC y FO: andamio bifásico celularizado en la fase condral y en la fase ósea.. Para esto se realizó una incisión de aproximadamente 10 cm en la parte medial de la rodilla, y se expuso la cápsula articular, se luxó la rótula o patela para exponer la cara distal del cóndilo medial del fémur. Con la ayuda de un taladro

## **Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

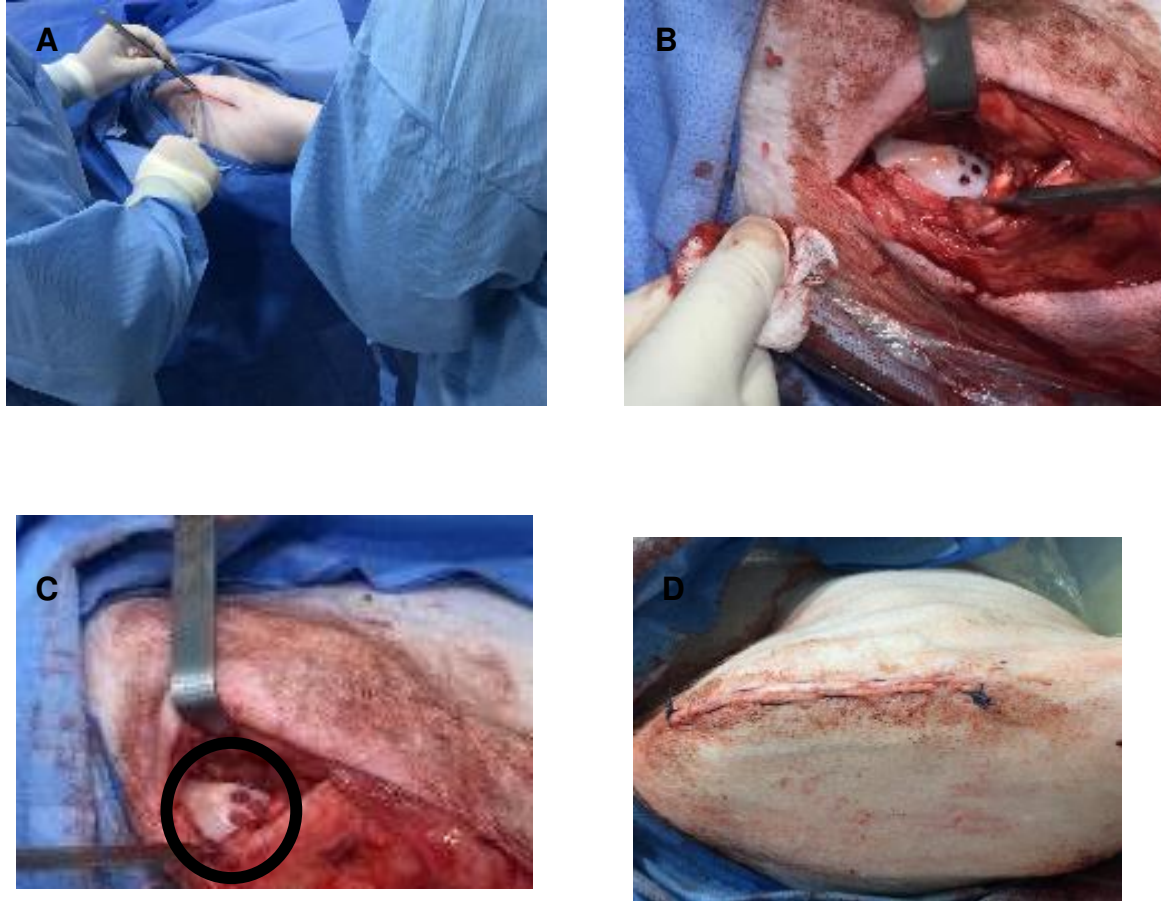
---

quirúrgico se realizaron las 3 lesiones, una en el lado medial, otra en el lateral y una tercera en el caudal del cóndilo. Los andamios se colocaron en el siguiente orden: el andamio bifásico celularizado solo en la fase condral se colocó en la lesión medial, el andamio monofásico en la lesión lateral y el andamio bifásico celularizado en ambas fases en el caudal (figura 15B). Después de alinear la rótula, se suturó la cápsula articular, los planos musculares y subcutáneos con suturas 2-0 de ácido poliglicólico (COVIDIEN) y la piel con suturas de 0 de ácido poliglicólico. Los siete días posteriores a la cirugía los animales se trataron con 6 mg/kg de tramadol (Tramadol-Jet, Norvet) y 0.4 mg/kg de meloxicam (Flaxol Mx, BioCHEM) para tratar el dolor. Como antibiótico se administró 15mg/kg de cefalotina sódica (AMSA laboratorios) cada 12 h por 7 días. Además, se realizaron curaciones diarias con yodopovidona sódica para evitar contaminación de las heridas y se administró Aluspray® para estimular la cicatrización.

El tiempo de recuperación fue de ocho semanas, en este periodo los cerdos se mantuvieron en corrales con alimentación e ingesta de agua *ad libitum*. Semanalmente se analizó el grado de claudicación de cada uno. Una vez concluido este periodo se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg). Se fotografiaron las lesiones tratadas para análisis macroscópico. Con un serrucho se removió el cóndilo tratado, se tomaron radiografías y se procedió a fijar los tejidos. Para esto los tejidos se colocaron en un fijador constituido por formalina al 10% y glutaraldehído al 2.5% en una relación de 1:1. Se mantuvieron en la solución fijadora por 48 h y posteriormente se procedió a su descalcificación con

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

ácido fórmico al 10%. Posteriormente las piezas fueron deshidratadas e incluidas en parafina para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico.



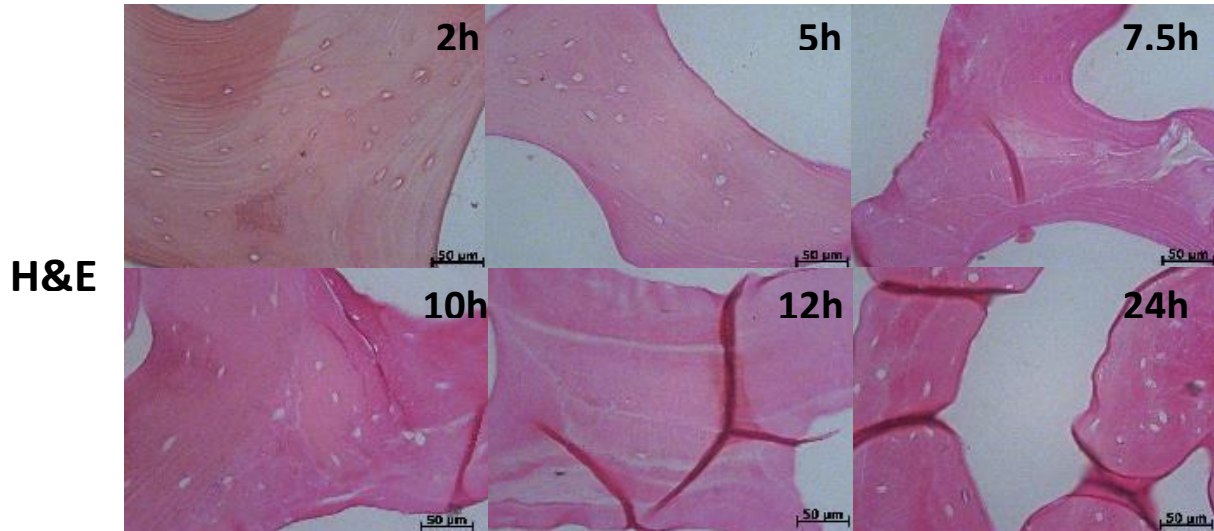
**Figura 15. Cirugía para implantación de los andamios.** A) se diseccionó la articulación de la rodilla hasta exponer el cóndilo medial. B) Se realizaron 3 lesiones por cóndilo de 3 mm de diámetro por 9 mm de profundidad cada una. C) Cada uno de los tratamientos se colocaron en las lesiones. D) Sutura.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS

#### 5.1 Descelularización de hueso bovino

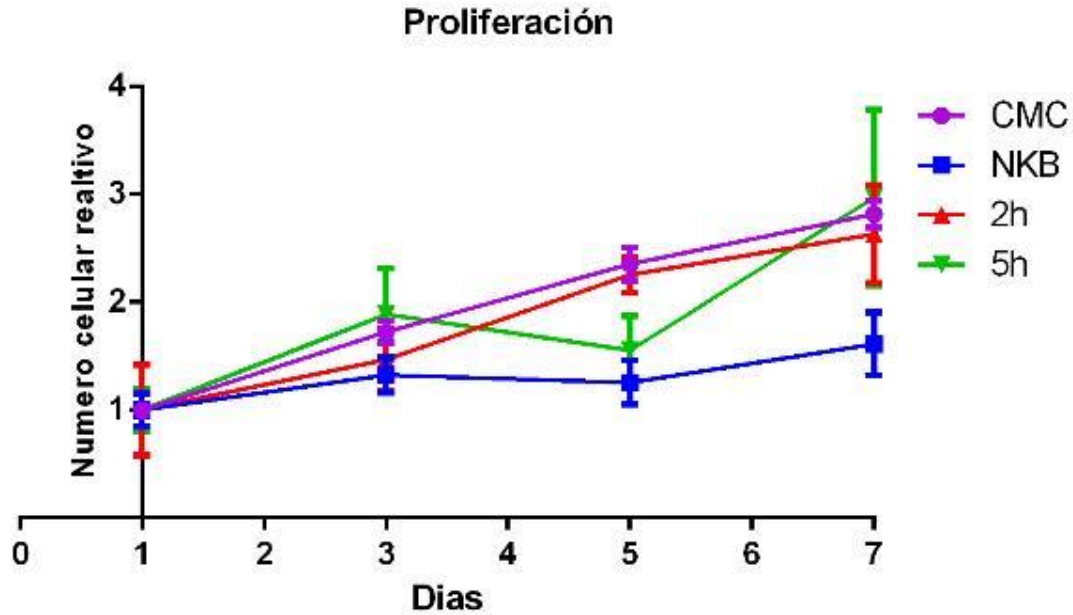
El hueso bovino se sometió a un proceso de descelularización mediante lavados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos. Cuando el hueso bovino se expuso al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por un tiempo  $\geq 7.5$  h la integridad de la matriz extracelular se vio comprometida, lo cual se puede observar por la fragmentación de ésta (figura 16), donde el compromiso de la MEC fue más evidente conforme aumentaba el tiempo de exposición. Por otro lado, los tratamientos de 2 y 5 h mostraron una mejor conservación de la matriz y una descelularización del 70 y 90% respectivamente. Por lo que el ensayo de proliferación y evaluación de osteoconductividad se realizó solo en estos dos tratamientos.



**Figura 16. Tinción de hematoxilina y eosina de los diferentes tratamientos para descelularizar el hueso bovino.** Los huesos se sometieron a un proceso de descelularización mediante lavados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes tiempos. Las horas indican el tiempo de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los tratamientos de 2 y 5 h mostraron una mejor conservación de la matriz extracelular y una descelularización del 70 y 90% respectivamente.

## 5.2 Proliferación y capacidad osteoconductora de los huesos bovinos descelularizados

Los huesos fueron celularizados y cultivados con medio basal durante 7 días. La proliferación se midió cada 24 h por el método de azul alamar. Los resultados no mostraron una diferencia significativa entre los tratamientos y los controles, por lo que tanto el tratamiento de 2 h como el de 5 h permiten una buena adhesión y proliferación de las CMMs-TA (figura 17).

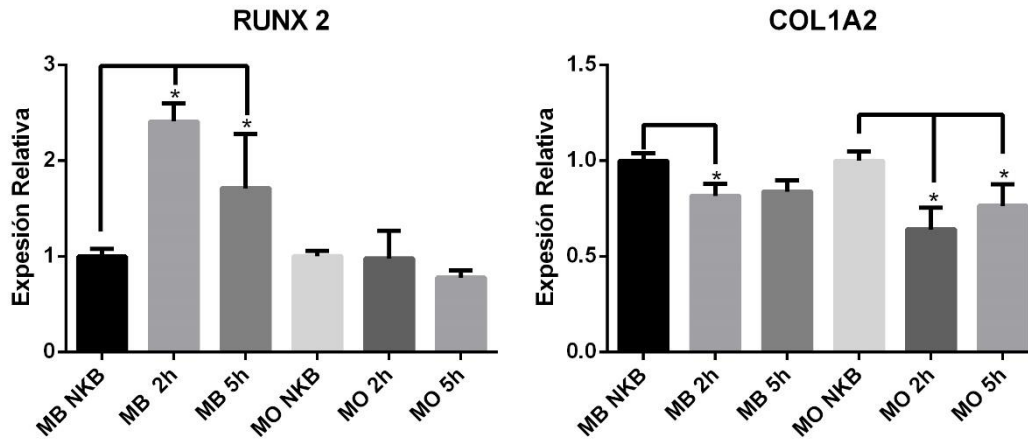


**Figura 17. Proliferación de CMMs-TA cultivadas en condiciones 3D.** CMC: células en monocapa. NKB: Nukbone®. 2h: HBD expuesto durante 2h a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 5 h: HBD expuesto durante 5h a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No se observó una diferencia significativa en la proliferación celular en los tratamientos al comparar contra el Nukbone®.

Por otro lado, se evaluó la osteoconductividad de los huesos descelularizados. Para esto, los huesos fueron celularizados y cultivados en medio basal o medio osteogénico durante 7 días para posteriormente medir los marcadores osteogénicos RUNX2 y COL1A2 por qPCR. La expresión de RUNX2 de ambos tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor al compararse con el Nukbone®, esto al ser cultivados en medio basal, mientras que al cultivarse en medio osteogénico no se observó diferencia. Sin embargo, la expresión de COL1A2 fue menor en el tratamiento de 2 h al compararse con el Nukbone® tanto en el cultivo con medio basal como con el medio osteogénico. No se observó diferencia con el tratamiento de 5 h al ser cultivado con

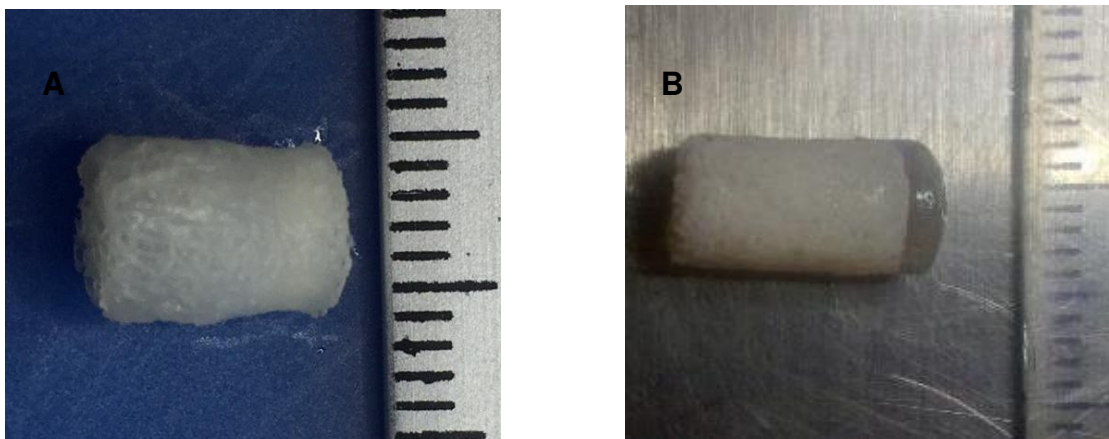
## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión

medio basal (figura 18). Con base en los resultados anteriores se eligió al tratamiento de 5 h para la construcción de los andamios bifásicos.



**Figura 18. Evaluación de osteoconductividad de los huesos bovinos descelularizados.** No se observó diferencia significativa entre los tratamientos y el control. NKB: nukbone, 2h: HBD expuesto durante 2h a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5h: HBD expuesto durante 5h a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MB: medio basal, MO: medio osteogénico.

### 5.3 Construcción de andamios y ensayo mecánico de andamios libres de células



**Figura 19. Andamios bifásicos.** **A:** andamio bifásico de fibroína de seda. **B:** andamio bifásico de alginato.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

En la figura 19 se muestran los andamios bifásicos formados por HBD y fibroína de seda (A) así como el de alginato y HBD (B). Se obtuvieron nueve grupos, a los cuales se evaluó el módulo de Young para definir los grupos con mejores propiedades mecánicas. Los resultados se muestran en la tabla 2. En donde se puede observar que los grupos A al D mostraron el módulo de Young más altos. Mientras los grupos fabricados a base de AG y HBD (H e I) registraron el módulo de Young más bajo comparado incluso contra el valor del cartílago hialino. A partir de estos resultados se determinó continuar el análisis bioquímico con los grupos A-B, los cuales se fabricaron a base de HBD, FS y la MCB con un tamaño de partícula <100.

**Tabla 2.** Módulo de Young de las diferentes fases condrales.

Grupo	Fase Condral	Modulo de Young (kPa)
A	FS+S	214.59
B	FS+S:MCB (1:1) <100 µm	<b>805.01</b>
C	FS+S:MCB (2:1) <100 µm	<b>474.19</b>
D	FS+S:MCB (3:1) <100 µm	<b>554.14</b>
E	FS+S:MCB (1:1) 10-20 µm	476.96
F	FS+S:MCB (2:1) 10-20 µm	301.59
G	FS+S:MCB (3:1) 10-20 µm	385.23
H	Alginato	5.2
I	Alginato+MCB<100 µm	10.2

---

FS: Fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino

## 5.4 Análisis bioquímico

Los diferentes grupos fueron celularizados con  $0.5 \times 10^6$  células, solo en la FC. Estos se cultivaron con medio condrogénico a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 28 días de cultivo el contenido de ADN fue significativamente mayor en los grupos cultivados en monocapa con medio basal y medio condrogénico, mientras el contenido de GAGs en los grupos B y C fue significativamente mayor al compararse con el grupo en monocapa (figura 20).

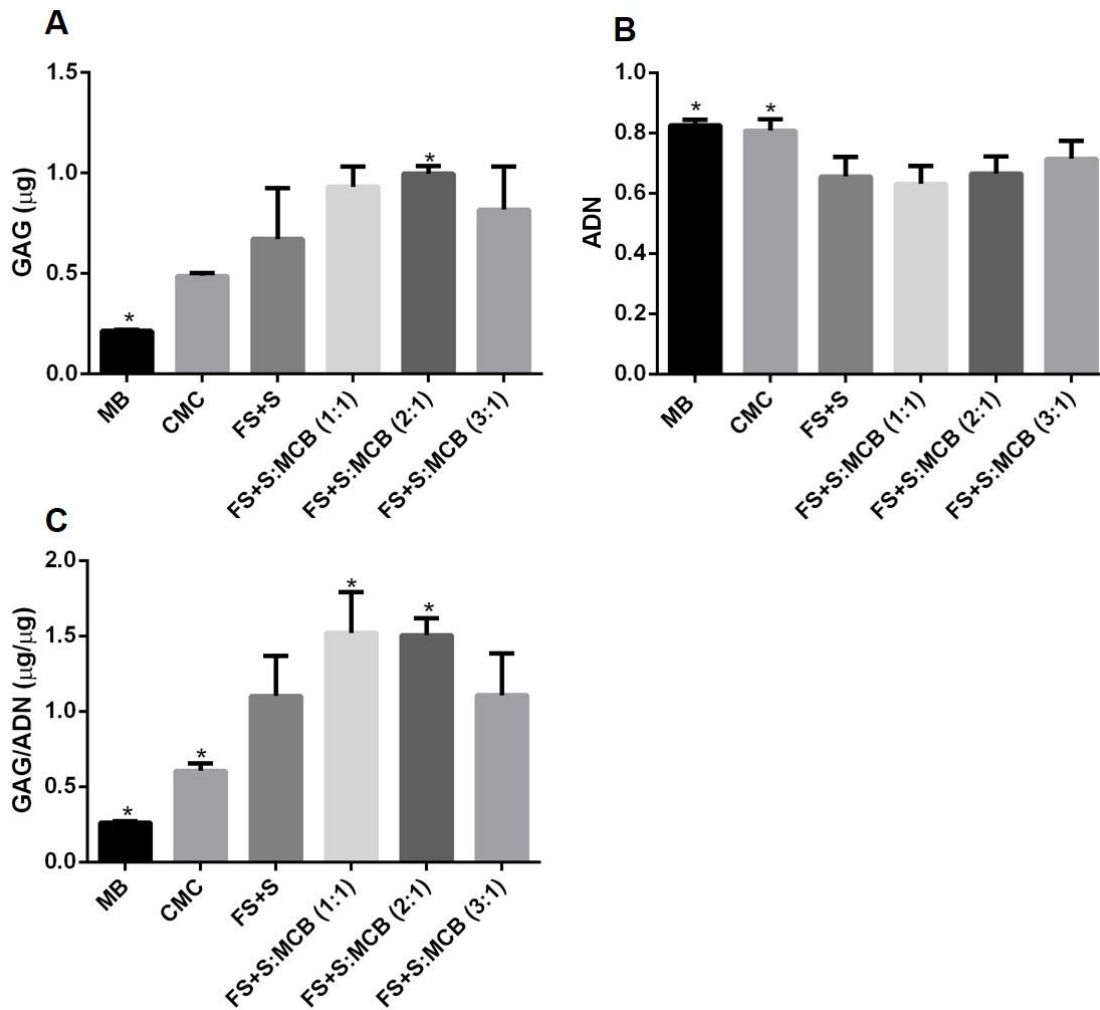


Figura 20. Análisis bioquímico de células cultivadas en monocapa y en condiciones 3D después de 28 días de cultivo en medio condrogénico. **A.** Contenido total de GAGs. **B.** Contenido

## **Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

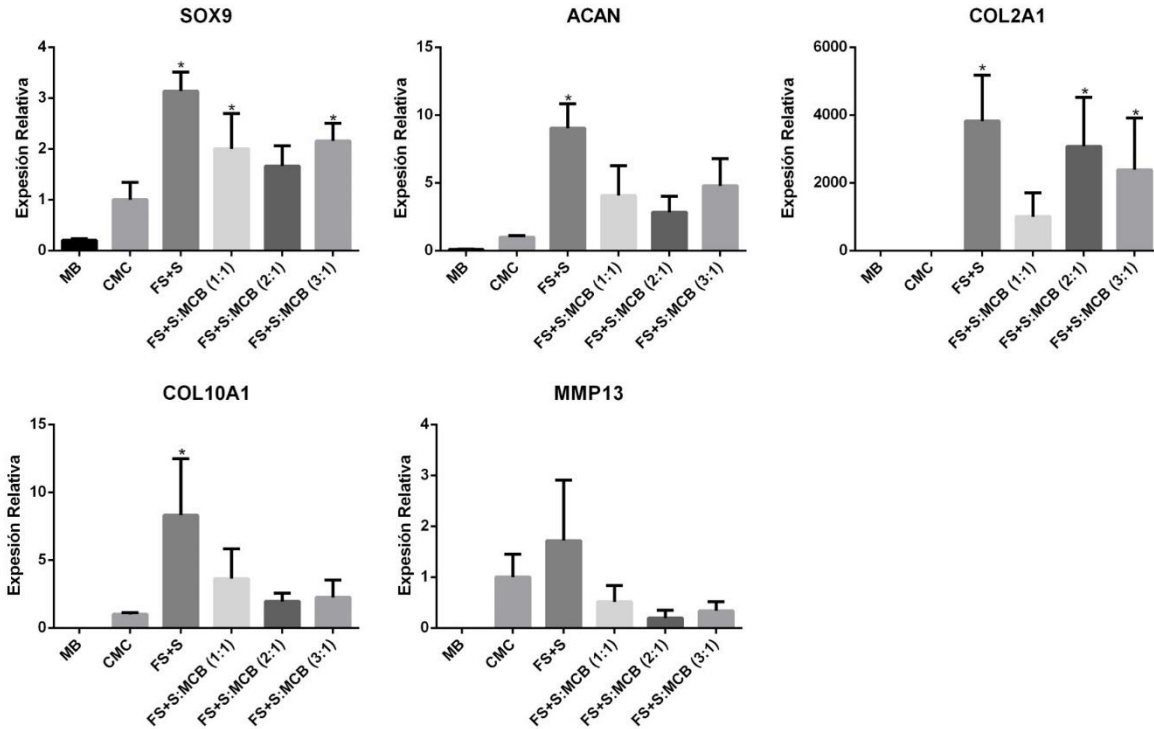
---

total de ADN. **C.** Contenido de GAGs normalizados con el contenido de ADN. El grupo de FS+S:MCB (1:1) tuvo una relación de glucosaminoglicanos y ADN significativamente mayor a los andamios fabricados solamente con fibroína. \*  $p < 0.05$ . MB: medio basal, CMC: células en monocapa, FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino.

### **5.5 Ensayo de expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos**

Después de 28 días en cultivo, se analizó la expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos en las células cultivadas en monocapa y 3D (figura 21). La expresión de SOX9 en las células cultivadas en los andamios fue significativamente mayor comparadas con las células en monocapa, excepto en el grupo FS+S:MCB (2:1). Para ACAN solo se observó una expresión significativamente mayor en el grupo FS+S, mientras COL2A1 su expresión fue significativamente mayor en las células cultivadas en los andamios, excepto en el grupo FS+S:MCB 1:1. No se observó diferencia significativa en la expresión de los marcadores hipertróficos COL10A1 y MMP13.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**



**Figura 21. Análisis de expresión de marcadores condrogénicos e hipertróficos en CMMs-TA cultivadas en monocapa o 3D en medio condrogénico por 28 días.** \* $p < 0.05$ . se observó una mayor expresión de SOX9 en las células cultivadas en los andamios excepto en el grupo FS+S:MCB (2:1), ACAN solo se observó con una expresión significativamente mayor en el grupo FS+S, mientras COL2A1 su expresión fue significativamente mayor en los cultivos 3D, excepto en el grupo FS+S:MCB 1:1. No se observó diferencia significativa en la expresión de los marcadores hipertróficos COL10A1 y MMP13. La expresión se comparó con las células cultivadas en monocapa. MB: medio basal, CMC: células en monocapa, FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino.

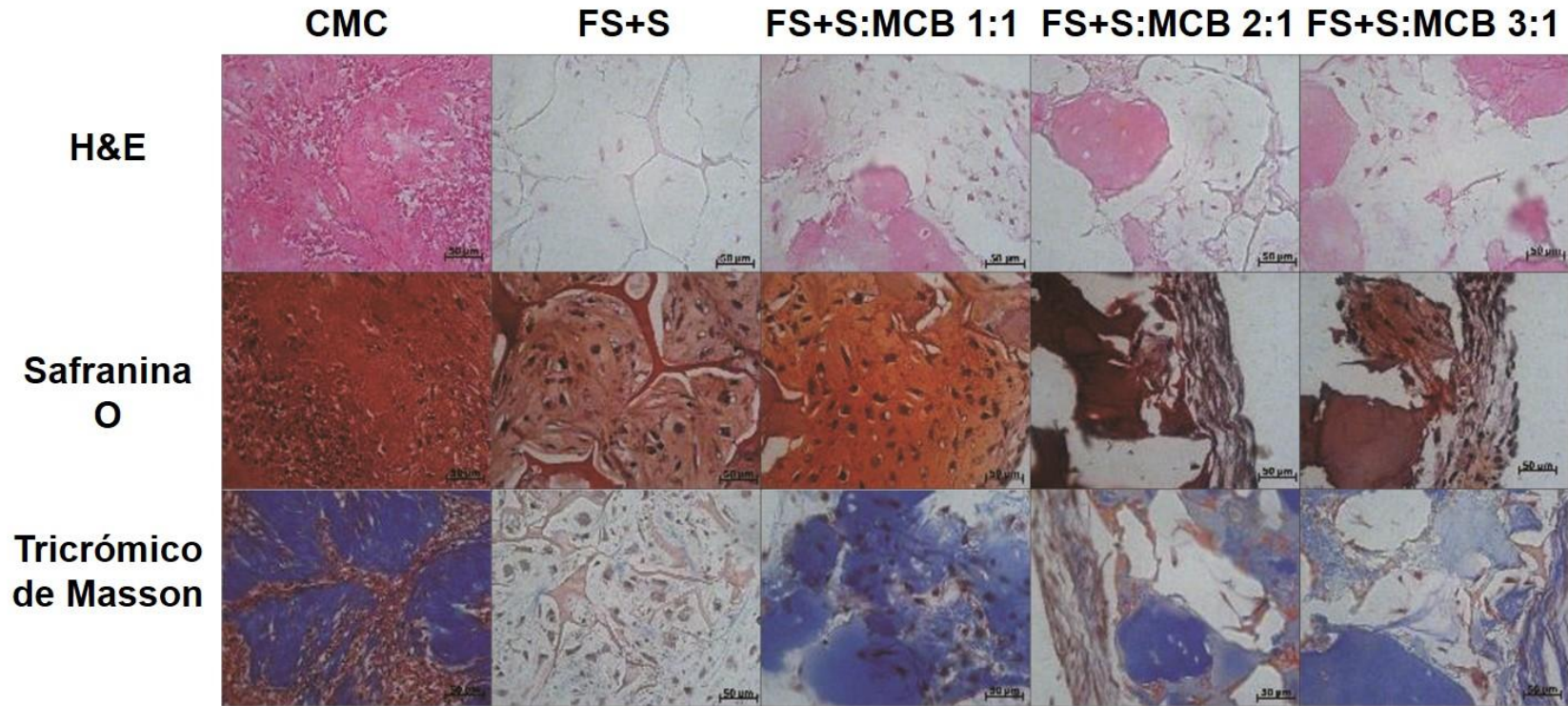
**5.6 Análisis histológico e inmunohistoquímico *in vitro***

Para evaluar la distribución de las células en el implante, se realizaron cortes histológicos y la tinción de H&E, en donde se observó que el grupo formado con FS+S:MCB 1:1 tuvo una mejor distribución celular. Adicionalmente, por la tinción de safranina O se evidenció un mayor contenido de GAGs, lo cual correlaciona con los

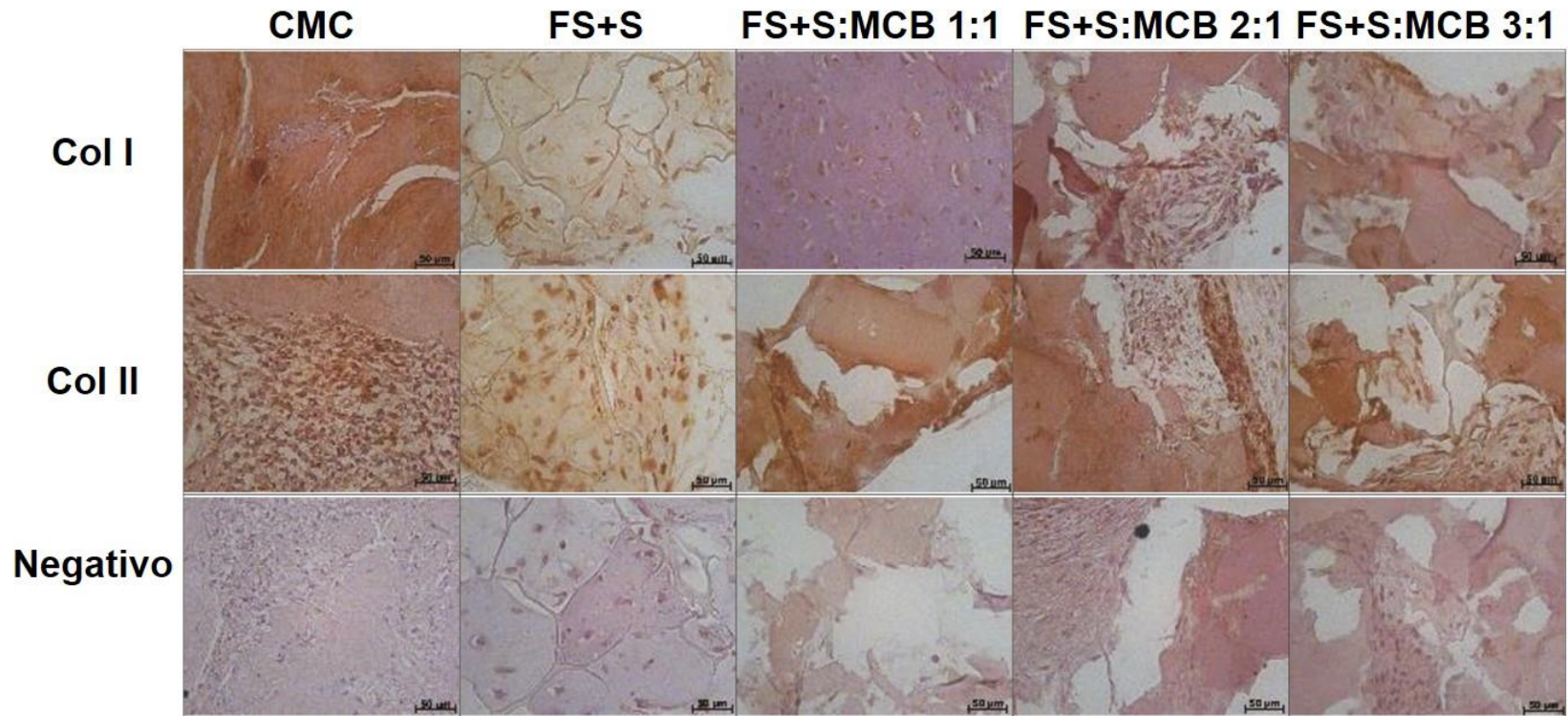
**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

resultados obtenidos mediante la cuantificación de GAGs. Por otro lado, la tinción de Tricrómico de Masson evidenció un mayor contenido de fibras de colágeno en el grupo formado con FS+S:MCB (1:1) (figura 22), por lo que el siguiente paso fue identificar el tipo de colágeno presente en los andamios. Para esto se realizó un análisis inmunohistoquímico. Este evidenció que todos los andamios que contienen MCB presentan un mayor contenido de Col II al compararse con los controles, sin embargo, al analizar el contenido de Col I, el grupo formado por FS+S:MCB(1:1) tenía un menor contenido de este y por lo tanto una mejor relación de Col II:Col I que es lo que se busca en el cartílago hialino (figura 23).



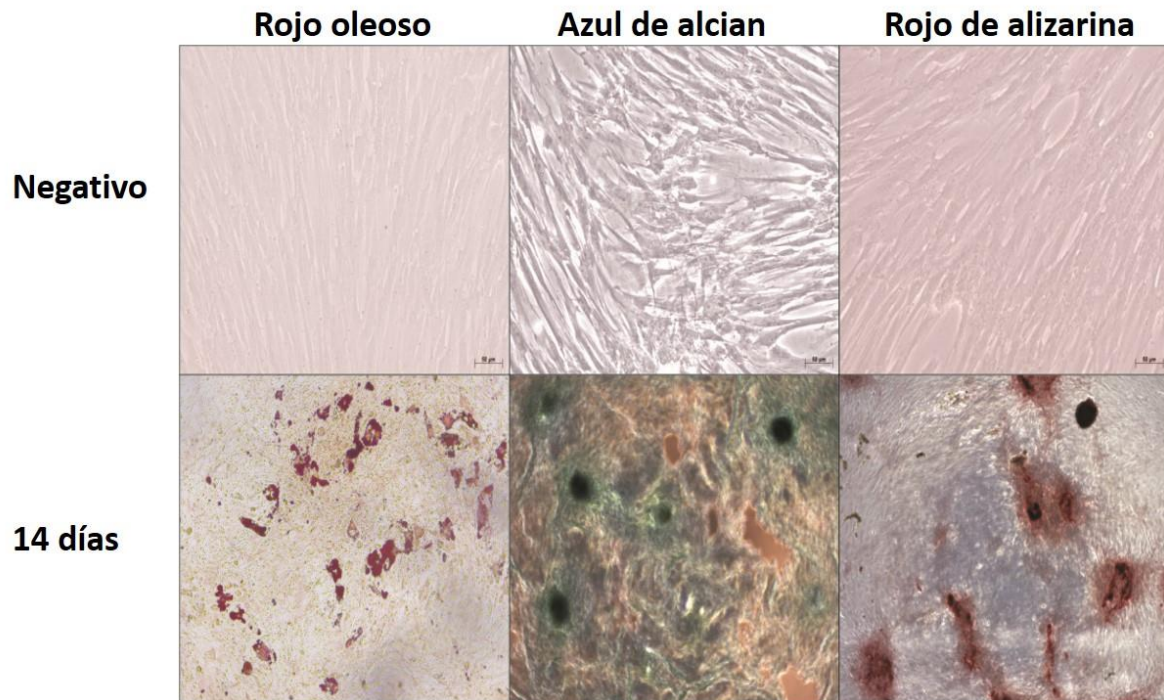
**Figure 22. Evaluación histológica de la repuesta *in vitro* de las CMM-TA cultivadas en monocapa y condiciones 3D con medio condrogénico por 28 días.** Grupos CMC a FS+S:MCB 3:1. En la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) el grupo FS+S:MCB 1:1 mostró una mejor celularización de los andamios, en la tinción de safranina O y Tricrómico de Masson se observó una mayor presencia de glucosaminoglicanos y de fibras de colágeno respectivamente; esto al comparar con el resto de los andamios. CMC: células en monocapa, FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino.



**Figure 23. Evaluación inmunohistoquímica de la repuesta *in vitro* de las CMM-TA cultivadas en monocapa y condiciones 3D con medio condrogénico por 28 días.** Grupos CMC a FS+S:MCB 3:1. Todos los grupos de andamios muestran una tinción débilmente positiva para colágeno tipo I, mientras las CMC muestran una tinción más fuerte. Por otro lado la tinción para colágeno tipo II es mayor en todos los grupos de andamios. Los controles negativos fueron tratados con PBS. CMC: células en monocapa, FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino.

## 5.7 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMMs-TA)

El aislamiento de las CMMs-TA de cerdo se realizó mediante digestión del tejido adiposo con colagenasa I al 0.1%. Se comprobó el aislamiento de estas mediante su capacidad para adherirse al plástico, así como su diferenciación multilínea (figura 24). Estas se expandieron y cultivaron hasta el pasaje 2 el cual fue utilizado para celularizar los andamios durante el ensayo piloto.



**Figura 24. Diferenciación multilínea de CMMs-TA de cerdo.** Rojo Oleoso: Diferenciación adipogénica; se pueden observar los lípidos dentro de las células teñidos en color rojo. Azul alcian: Diferenciación condrogénica, las mucinas de los PGs se observan teñidos en color azul. Rojo de alizarina: diferenciación osteogénica, los cúmulos de calcio se tiñen en color rojo.

## **5.8 Ensayo de biocompatibilidad**

Para evaluar la biocompatibilidad de los andamios, todos sus componentes se implantaron de forma subcutánea, por separado, en un modelo murino. El estudio constó de ocho semanas. Todos los animales sobrevivieron al experimento, no se observaron infecciones o complicaciones posquirúrgicas. Después de cumplirse el tiempo de recuperación los animales fueron sacrificados y se realizó el análisis macroscópico y microscópico.

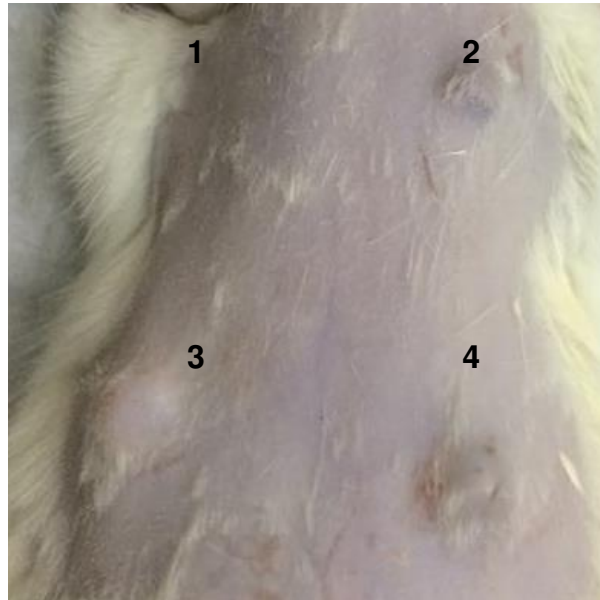
No se observó ninguna anormalidad ni signo de rechazo o reacción adversa a nivel macroscópico en ninguno de los tratamientos (figura 25). El tratamiento de FS no se observó a nivel macroscópico después de las ocho semanas de recuperación, lo que pudiera indicar una reabsorción el andamio.

El análisis microscópico se realizó por medio de la tinción de hematoxilina y eosina para analizar la morfología celular del tejido adyacente, así como la presencia de células inmunes (figura 26). La piel adyacente al sitio de implantación se observó con epidermis, dermis y algunos anexos histológicamente normales. Todos los grupos estaban rodeados por una cápsula de tejido fibroso, con numerosos fibroblastos bien orientados y ocasionalmente la presencia de células inmunes. En su interior se observaron restos de los andamios, así como la presencia de células inmunes como cúmulos de linfocitos, macrófagos y células gigantes, lo cual evidencia una reacción inmune crónica. El grupo que presentó mayor degradación del andamio fue el de FS, donde los restos de la fibroína eran muy pequeños. En los grupos que contenían MCB ésta se observó en proceso de calcificación y

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

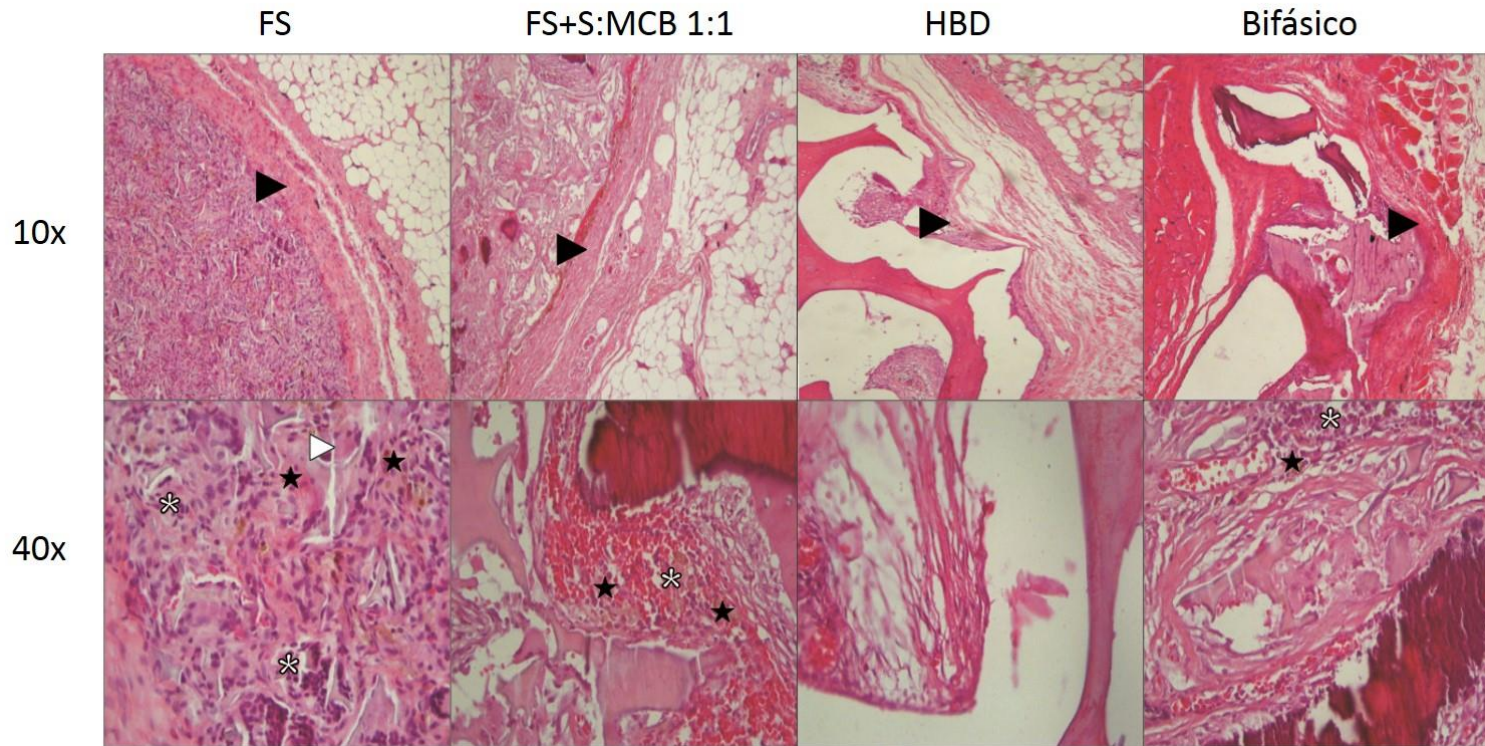
---

degradación. Mientras el grupo de HBD fue el que menos degradación tuvo. Se le dio una puntuación a la reacción inmune presente en cada uno de los grupos. Donde el grupo de HBD fue el que tuvo la menor respuesta inmune, aunque no se observó diferencia significativa en la presencia de las células inmunes, excepto en el grupo de FS donde hubo una mayor presencia de células gigantes.



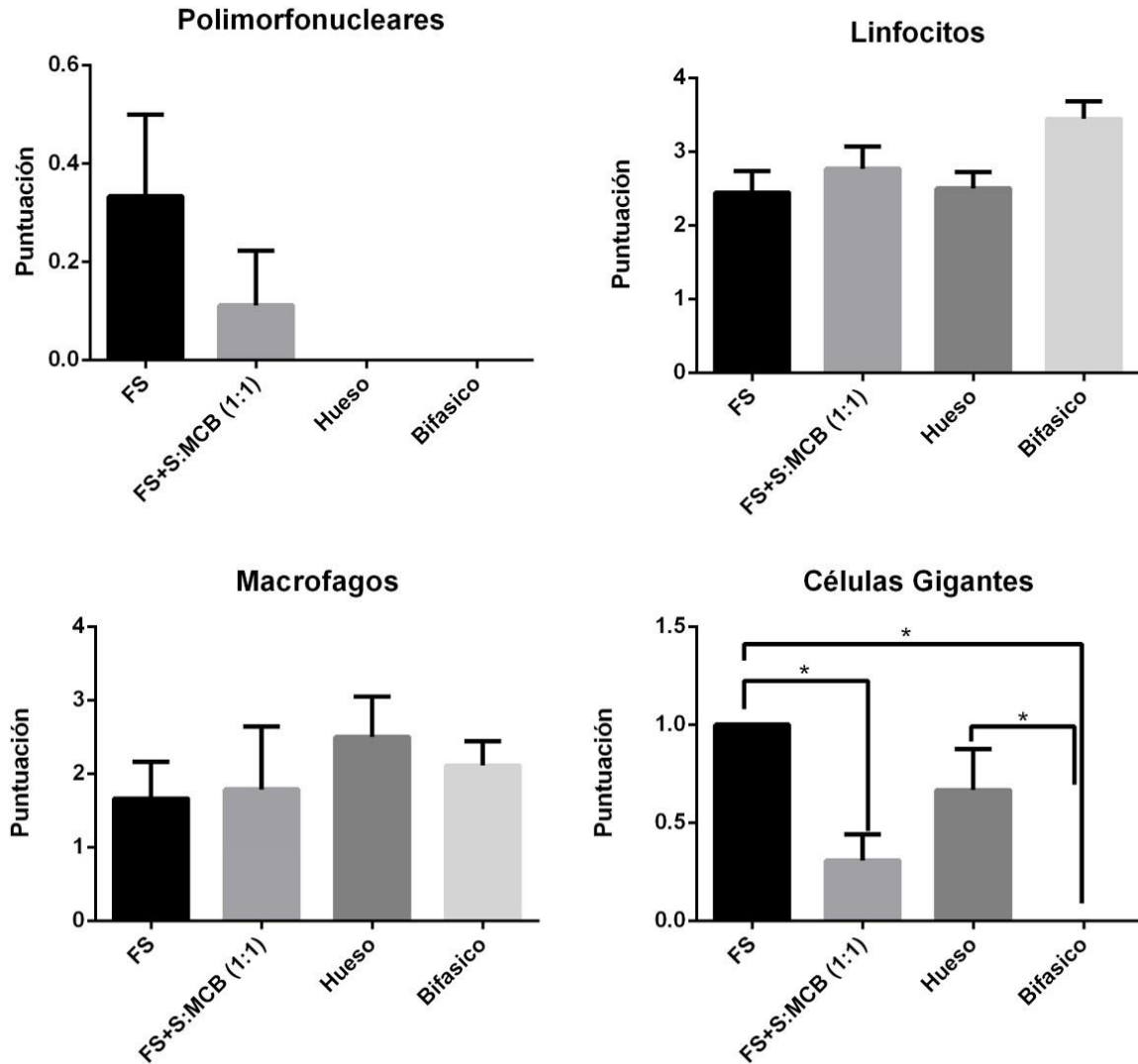
**Figura 25. Evaluación macroscópica de los diferentes tratamientos después de 8 semanas. 1)**

FS: fibroína de seda, **2)** FS+S:MCB (1:1), **3)** HBD, **4)** Andamio bifásico. No se observó ninguna evidencia de reacción de inflamación a nivel macroscópico en ninguno de los tratamientos. FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino, HBD: hueso bovino descelularizado.



**Figura 26. Análisis histopatológico de la respuesta inflamatoria.** El sitio del implante de todos los grupos se observó rodeado de una cápsula de tejido fibroso (cabeza de flecha negra). En su interior se observaron restos de los andamios, así como la presencia de linfocitos (asteriscos), macrófagos (estrellas) y células gigantes (cabezas de flecha blancas) lo cual indica una respuesta inflamatoria crónica. FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartilago bovino, HBD: hueso bovino descelularizado.

Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión

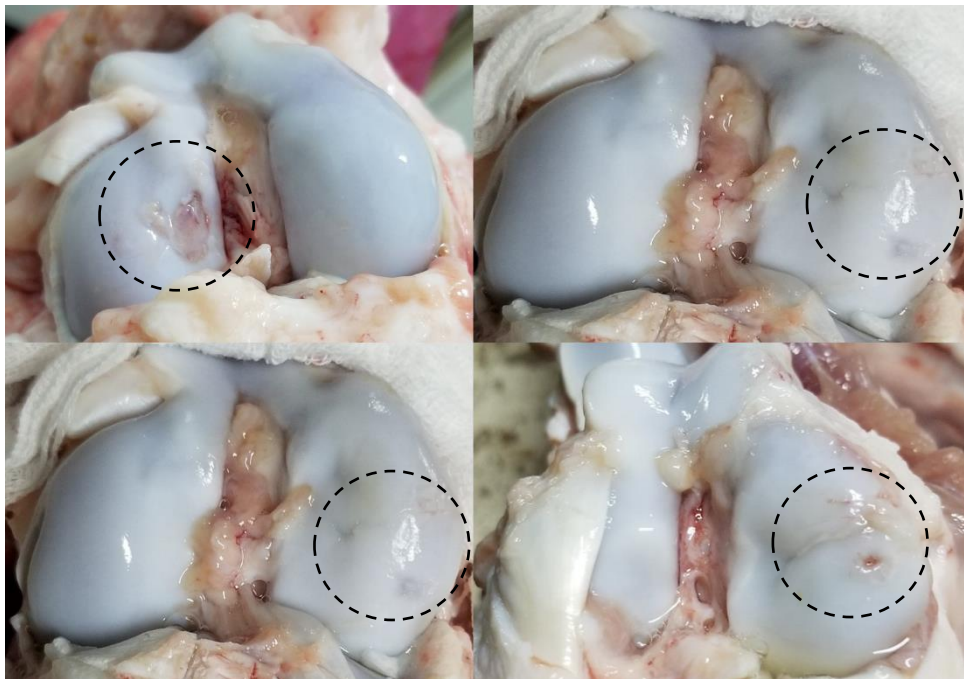


**Figura 27. Evaluación semicuantitativa de la respuesta inflamatoria.** Se observó una respuesta inflamatoria crónica en todos los grupos, la cual se evidencia por la presencia de células gigantes y macrófagos, donde la presencia de células gigantes fue significativamente mayor en los andamios formados solo por fibroína.  $p < 0.05$ . FS: fibroína de seda, S: sal, MCB: matriz de cartílago bovino.

### 5.9 Ensayo piloto en el modelo porcino

Después de ocho semanas de recuperación los cerdos fueron sacrificados por sobredosis de barbitúricos. Posteriormente los cóndilos fueron recuperados. Se tomaron fotografías macroscópicas y las piezas se fijaron para proceder con el análisis microscópico.

En la evaluación macroscópica todos los grupos presentaron un relleno en el sitio de la lesión después de las 8 semanas de recuperación.

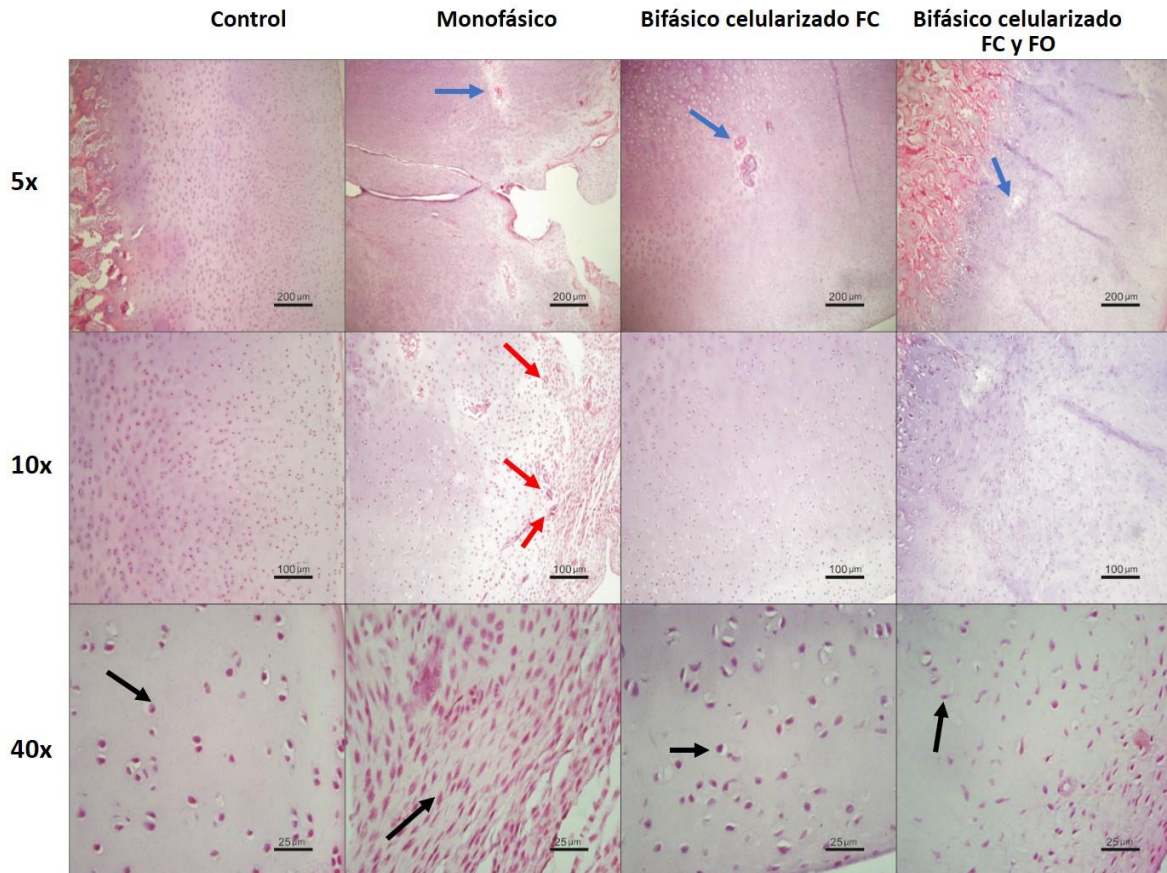


**Figura 28. Evaluación macroscópica de los cóndilos después de ocho semanas.** Todos los grupos tuvieron un relleno en el sitio de la lesión. Se observa una buena integración del tejido generado de *novo* al tejido adyacente.

## 5.10 Análisis morfológico

Para el análisis microscópico la primera prueba histológica que se realizó fue la de tinción de hematoxilina y eosina para observar la morfología de las células y tejido conectivo, integración de los andamios y el tejido formado *de novo* con el tejido adyacente. En la figura 29 se observa la fase condral del grupo control y de los diferentes tratamientos. En el grupo control se observó la histología normal del cartílago articular: condrocitos de forma redonda en sus lagunas ya sea aislados o en grupos isógenos, entre estos se identificó la matriz capsular o pericelular, seguida de matriz territorial con tinción basófila por los compuestos sulfatados, y finalmente la matriz interterritorial con tinción acidófila por la gran cantidad de fibras de colágeno; estos hallazgos se compararon con los grupos de estudio. En todos los grupos se observan restos de fibroína de seda (flechas azules). El grupo en el cual las lesiones se trataron con los andamios monofásicos, se observan un menor relleno de la lesión y con células de morfología fusiforme similar a la de las células fibroblásticas (flecha negra), además de matriz extracelular de apariencia desorganizada, con presencia de vasos sanguíneos (flechas rojas). Estos resultados son contrarios a los grupos tratados con los andamios bifásicos ya que estos grupos mostraron una morfología celular similar a la del grupo control: lagunas con condrocitos (flechas negras) de morfología esférica característica, y separados de matriz extracelular. Destaca que el grupo tratado con el andamio monofásico celularizado solo en la fase condral mostró una mayor organización de los condrocitos similar al grupo control.

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión



**Figura 29. Comparación histológica de los andamios celularizados.** El andamio bifásico celularizado solo en la fase condral, induce una mayor formación de tejido condral. Las imágenes panorámicas (4x) evidencian un menor relleno del sitio de la lesión en el grupo tratado con el andamio monofásico. En todos los grupos se observan restos del andamio (flechas azules). El grupo control y los tratados con el andamio bifásico presentan células de forma esférica (flechas negras) característica de los condrocitos, contrario a la morfología fusiforme en el grupo tratado con el andamio monofásico (10x y 40x), en el cual además se observa la presencia de vasos sanguíneos en los grupos (flechas rojas). FC: fase condral, FO: fase ósea. Tinción de hematoxilina y eosina.

Subyacente a la fase condral se observó la fase ósea con el tejido óseo trabecular o esponjoso (figura 30), integrado por trabéculas óseas con osteocitos incluidos en la matriz. En el grupo control se observaron las trabéculas rodeadas por líneas de

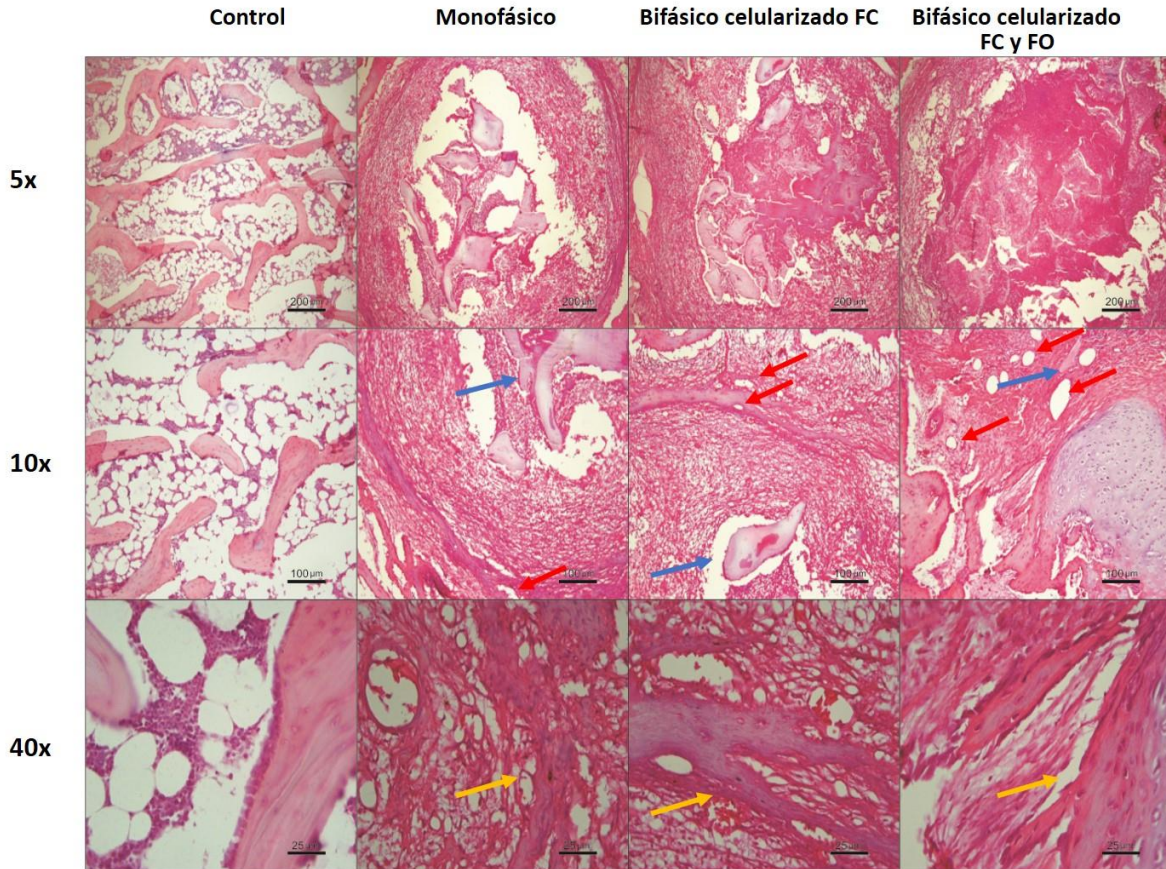
**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

células cúbicas (osteoblastos) y células más grandes multinucleadas (osteoclastos), además de células planas de núcleo ahusado correspondiente a las células osteogénicas y de revestimiento, todo esto correspondiente al endostio; entre las trabéculas se encuentran las células hematopoyéticas.

En comparación, los grupos tratados con el andamio monofásico y aquellos tratados con los andamios bifásicos muestran una buena integración entre el tejido formado *de novo* y el tejido adyacente o huésped, además, se observa la presencia de vasos sanguíneos (flechas rojas). En el sitio de la lesión, nuevamente el grupo tratado con el andamio monofásico muestra un menor relleno, donde la matriz ósea presente se observa desorganizada. En los grupos tratados con los andamios bifásicos se observa la formación de trabéculas más avanzada, lo cual indica una mejor regeneración del tejido. Todos los grupos muestran restos del material de fibroína (flechas azules).

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión



**Figura 30. Los andamios de los grupos tratados con los andamios bifásicos inducen una mejor formación y organización de trabéculas óseas.** Fase ósea de los sitios de la lesión. Se observan trabéculas rodeadas por osteoblastos, así como osteocitos embebidos en la matriz ósea en el grupo control. Los tratamientos muestran una buena integración con el tejido adyacente, con la formación de vasos sanguíneos (flechas rojas). Flechas azules: restos de andamio. Flechas amarillas: formación de trabéculas. Los grupos tratados con los andamios bifásicos muestran una mayor organización celular y tisular similar al grupo control. FC: fase condral, FO: fase ósea. Hematoxilina y eosina.

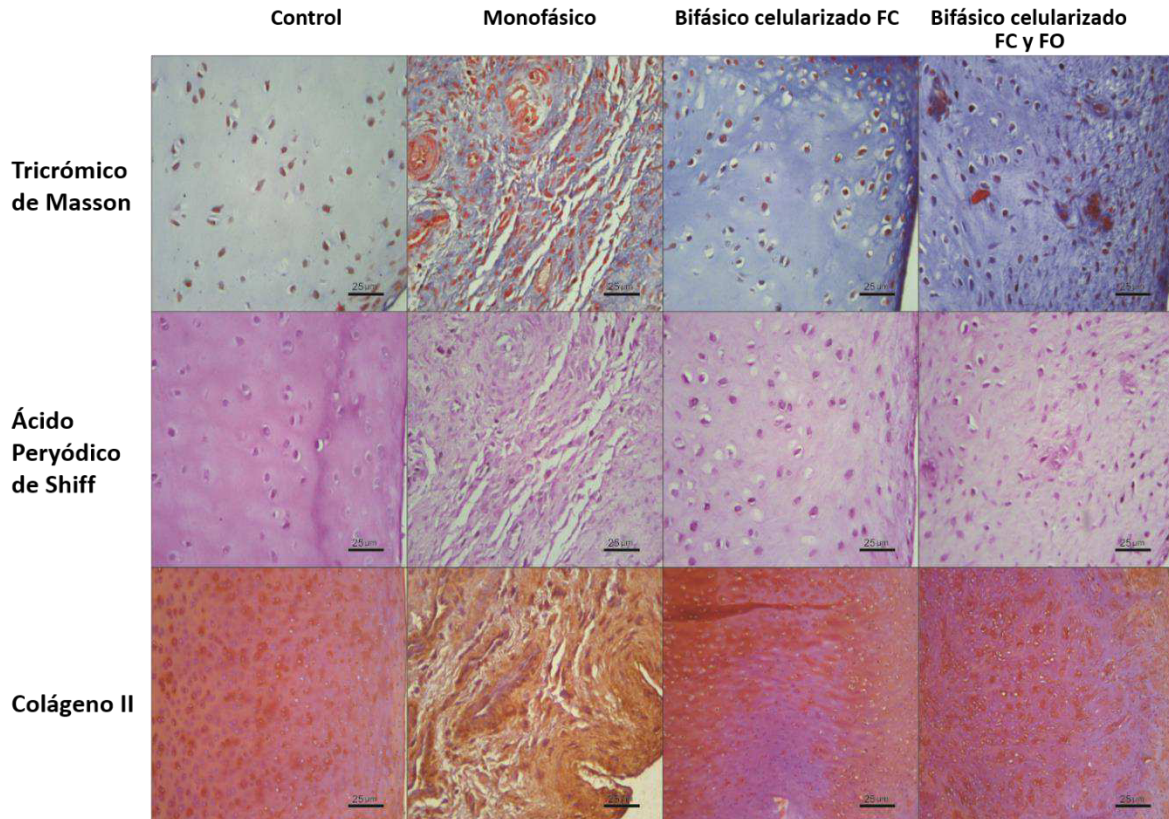
Para evaluar la composición del tejido conectivo formado *de novo* se realizó la tinción de Tricrómico de Masson y la histoquímica de PAS que tiñen las fibras de colágeno en color azul y polisacáridos complejos en color rosa-magenta, respectivamente.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

En la tinción de Tricrómico de Masson, el grupo control muestra una tinción azul pálida en las matrices territorial e interterritorial que separan a los condrocitos aislados o en grupos isógenos. De manera interesante, la fase condral de los grupos tratados con los andamios básicos muestra una tinción intensa de las fibras, sin embargo, el grupo tratado con el andamio bifásico celularizado solo en la fase condral muestra una organización mayor de las fibras, en forma paralela y similar al control. En el grupo tratado con el andamio monofásico se observan haces de fibras desorganizadas entre las células fusiformes (figura 31).

## Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión



**Figura 31. El andamio del grupo tratado con el andamio bifásico celularizado solo en la fase condral presenta mayor organización de las fibras de colágeno.** En la fase condral, se observa el grupo control con tinción pálida en las matrices territorial e interterritorial entre los condrocitos. Todos los tratamientos con haces de colágena y células entre ellos, se observa mayor organización en el grupo tratado con el andamio bifásico celularizado solo en la fase condral, se observa la presencia de vaso sanguíneos en el grupo tratado con el andamio monofásico (flechas rojas). La inmunohistoquímica para Col II comprueba la presencia de este en todos los tratamientos. FC: fase condral, FO: fase ósea.

## CAPITULO VI

### DISCUSION

Actualmente la regeneración de las lesiones condrales sigue representando un reto en el área de la medicina ortopédica. Cuando estas lesiones involucran al hueso subcondral, su regeneración se vuelve más compleja, debido a las diferencias que existen entre ambos tejidos. Por lo que diseñar un andamio que mimetice el complejo osteocondral es el objetivo de diversos estudios.

Para la regeneración del cartílago; polisacáridos tales como el alginato, la agarosa, el quitosano, entre otros, han sido usados como biomateriales para la construcción de andamios. Se ha reportado que el alginato celularizado con CMMs permite la diferenciación de éstas hacia un linaje condrogénico resultando en la síntesis de glucosaminoglicanos en presencia de TGF $\beta$ -1 o IGF1 (Awad, Wickham, Leddy, Gimble, & Guilak, 2004)(Moncada-Saucedo et al., 2019) .Otros materiales que han mostrado buenos resultados en el tratamiento de lesiones condrales son la matriz de cartílago bovino y la fibroína de seda.

Diversos trabajos reportan que la MCB favorece la diferenciación de CMMs-TA a linaje condrogénico, mientras la FS ha cobrado gran interés principalmente debido a sus buenas propiedades biomecánicas así como por su fácil manipulación (Cheng, Estes, Awad, & Guilak, 2008)(J. J. Li et al., 2015). En el presente trabajo se fabricaron diversos andamios bifásicos, formados por una fase condral y una fase ósea con el objetivo de simular el tejido osteocondral. Para la fase condral se

probaron diferentes composiciones con el objetivo de producir andamios con características mecánicas y biológicas que permitan la regeneración del tejido condral. Además, se evaluó el efecto del tamaño de partícula de la MCB sobre la mecánica de la fase condral.

Para esto, los andamios fabricados se sometieron a una prueba de compresión para calcular el módulo de Young, el cual mide la elasticidad o rigidez de un material; dicho en otras palabras, el módulo de Young mide la capacidad de deformación de un material ante las fuerzas de tensión y compresión. Moncada-Saucedo y cols. evaluaron andamios fabricados con alginato y la combinación de alginato y matriz de cartílago bovino. Se observó que al celularizar los andamios con CMMs-TA y pre-condrocitos, los andamios que contenían MCB soportaban la proliferación celular, generando así un ambiente favorable para las células. Siguiendo esta línea de investigación, en este trabajo se evaluó la mecánica de los andamios de AG y de la combinación de AG y la MCB. Los andamios que contenían matriz de cartílago bovino exhibieron un módulo de Young dos veces mayor a aquellos fabricados solamente con alginato (tabla 2), por lo que la MCB les confirió mayor fuerza a los andamios.

Por otro lado, los andamios fabricados con fibroína de seda mostraron un módulo de Young 20 veces mayor a los fabricados con alginato. Mientras aquellos andamios fabricados a partir de la combinación de FS y MCB tuvieron un módulo de Young hasta 4 veces mayor al observado en los andamios fabricados solamente con FS. Además, este fue similar al reportado para el cartílago hialino humano (450-800 kPa) (J. M. Mansour, 2009). Adicionalmente, se observó una relación entre el

aumento del módulo de Young y el tamaño de partícula de la MCB, donde aquellos andamios que contenían MCB con un tamaño de partícula  $<100 \mu\text{m}$  tuvieron una mejor mecánica (tabla 2).

Yang Q. y cols, 2017, analizaron la combinación de MCB y FS (3%:3% p/p) para la fabricación de andamios. Al evaluar su módulo de Young este fue de 64.99 kPa, 3 veces menor al reportado en este trabajo para los andamios fabricados solamente con FS. Sin embargo, esta diferencia se puede deber a que nosotros utilizamos una mayor concentración de FS y un diferente método de fabricación. Además, Yang Q. y cols. no mencionan el tamaño de partícula de la MCB lo cual en este trabajo se demostró que tiene un efecto sobre la mecánica de los andamios.

Al analizar los andamios *in vitro*, la fase condral que contiene mayor cantidad de MCB tuvo un mayor contenido de GAGs (figura 20), a nivel histológico mostró una mejor celularización y mayor presencia de GAGs (figura 21) lo cual coincide con el ensayo de cuantificación. Además, a nivel inmunohistoquímico se observa una mejor relación de Colágeno I: Colágeno II, en donde el colágeno II tuvo una mayor presencia, lo cual se busca en el cartílago hialino (figura 23). Esto coincide con trabajos previos donde se reporta que la MCB favorece la diferenciación condrogénica de las CMM (Q Yang, 2017, Y Sun, 2018, N Moncada, 2019). De acuerdo a lo reportado en trabajos previos una mayor presencia de Col II y GAGs mejoran las propiedades mecánicas de los andamios (Caballero Mendez et al., 2016); donde el colágeno II es responsable de la forma, la resistencia a la tracción y rigidez del tejido, mientras los GAGs proveen mayor resistencia a la compresión,

debido principalmente a su afinidad por el agua (Landínez-Parra et al., 2012)(Duarte Campos, Drescher, Rath, Tingart, & Fischer, 2012). Por lo que la mayor presencia de glucosaminoglicanos y colágeno tipo II sugiere una mejor mecánica para este grupo de andamios.

Adicionalmente se realizaron ensayos *in vivo* para evaluar la biocompatibilidad, integración y capacidad de reparación de los andamios.

En el ensayo de biocompatibilidad todos los andamios provocaron una respuesta inflamatoria crónica, evidenciada por la presencia de macrófagos y células gigantes. Sin embargo, la reacción inflamatoria se limitó al sitio de implantación (figura 26 y 27). Cabe destacar que la biocompatibilidad de un material depende de múltiples factores. Uno de ellos es el sitio de implantación ya que la reacción del hospedero puede ser dependiente del órgano o tejido en el que se implante (J.M. Anderson, 1996). El método más utilizado para evaluar la biocompatibilidad de un material es la implantación subcutánea. Sin embargo, ésta debe ser complementada con una evaluación en la zona en la que será implantado el andamio. El modelo *in vivo* más recomendado para evaluar la biocompatibilidad es el modelo de cerdo debido a que sus parámetros fisiológicos son similares a los valores humanos (Hussein et al., 2016).

Shen y col., 2014, compararon la respuesta inmune al implantar diversos andamios de manera subcutánea y en el sitio de interés, donde se observó una mayor respuesta inflamatoria cuando los andamios se implantaban de forma subcutánea. Lo cual coincide con lo observado en el ensayo piloto de este estudio donde los

andamios se implantaron en el sitio para el que fue diseñado. Al analizar la respuesta inmune por parte del hospedero, no se observó ninguna respuesta inflamatoria a nivel macroscópico (figura 28) ni microscópico (figura 29 y 30), lo cual indica una buena biocompatibilidad del andamio.

Finalmente, se evaluó la integración de los andamios al tejido adyacente. Al tratar lesiones osteocondrales con andamios que incluyan una fase ósea, se busca favorecer la integración de los andamios con el tejido adyacente al sitio de la lesión (Pan et al., 2015). La necesidad de celularizar o no un andamio siguen sin tener una respuesta concreta. Existen diversos trabajos en donde se han utilizado andamios libres de células, andamios celularizados en ambas fases o andamios celularizados solo en una de las fases. Sin embargo, ningún trabajo ha evaluado las diferentes variantes. Para ensayos *in vivo* se ha propuesto no celularizar la fase ósea de los andamios, apelando a la capacidad de sanar del hueso (Jiang et al., 2007). Mientras para la fase condral se recomienda su celularización debido a la poca capacidad de los condrocitos de migrar. El presente trabajo compara ambas variantes: andamios celularizados solo en la fase condral y andamios celularizados en ambas fases.

Los resultados muestran que las lesiones tratadas con los andamios bifásicos celularizados solo en la fase condral tuvieron una mejor reparación del cartílago articular, lo cual se evidenció por la presencia de células con una morfología esférica similar a la de los condrocitos, rodeadas por una matriz rica en glucosaminoglicanos y colágeno tipo II. Contrario a lo observado en las lesiones tratadas con los andamios monofásico y los andamios bifásicos celularizados en ambas fases (figura 29 y 31).

Por otro lado, los resultados sugieren que la celularización de la fase ósea no es necesaria ya que, los grupos tratados con los andamios celularizados solo en la fase condral tuvieron una buena integración al tejido adyacente a la lesión, coincidiendo con lo reportado en trabajos previos en donde se ha observado que cuando a un andamio condral se le adiciona una fase que simule al hueso subcondral, la fijación e integración del andamio al tejido circundante tiene mayor éxito (Nehrer, Spector, & Minas, 1999)(Benders et al., 2014)(Frenkel et al., 2005). Adicionalmente, en las lesiones tratadas con los andamios bifásicos celularizados solo en la fase condral se observó un mejor relleno de la fase ósea al compararlo con las lesiones tratadas con el andamio monofásico; una mejor organización de la matriz ósea secretada *de novo* con formación de trabéculas, así como una mayor formación de vasos sanguíneos comparado con las lesiones tratadas con los andamios monofásicos y bifásicos celularizados en ambas fases (figura 30). Si bien, el cartílago articular es un tejido avascular, el hueso subcondral es un tejido vascularizado, por lo que la presencia de vasos sanguíneos en la fase ósea de las lesiones es importante para la reparación del mismo ya que estos proveerán suficiente suplemento de sangre a el tejido óseo (Nooeaid et al., 2012). Además, estos resultados coinciden con lo reportado en el ensayo *in vitro* para la fase ósea (figura 17 y 18), es decir que se permitió la adhesión y proliferación de las células madres, así como la deposición de MEC lo cual es sumamente importante para la reparación el tejido óseo, confiriendo soporte para la fase condral del andamio y facilitando la integración de este al tejido adyacente.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartílago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

Este trabajo es la base para posteriores estudios *in vivo*, en el que es necesario aumentar el número de animales, con el objetivo de colocar solo un grupo de andamios en cada animal. Esto permitirá evaluar otros parámetros de recuperación, tales como la claudicación. Además, es recomendable aumentar el tiempo del estudio *in vivo* para conocer los resultados a largo termino.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

- Se evaluó la influencia del tamaño de partícula de la matriz de cartílago (10-20  $\mu\text{m}$  y  $\leq 100 \mu\text{m}$ ) sobre la capacidad de los implantes para soportar cargas, siendo la de  $\leq 100 \mu\text{m}$  la que exhibió un módulo de Young similar al reportado para el cartílago nativo (450-80 kPa).
- En el ensayo *in vitro*, la fase condral del implante bifásico constituida por FS+S:MCB 1:1 al ser celularizada con pre-condrocitos y cultivada durante 28 días en medio condrogénico, mostró un mayor contenido de GAGs, mejor distribución de las células, y una mejor relación del contenido de colágeno I: colágeno II.
- El implante bifásico construido a base de fibroína de seda/matriz de cartílago bovino/NaCl y adosado a una fase de hueso (matriz ósea descelularizada), no mostró datos de reacción inflamatoria ni a nivel macroscópico ni microscópico al ser implantado a nivel de la articulación de la rodilla en el modelo porcino; por lo que la biocompatibilidad del diseño integral es demostrada.
- El implante bifásico celularizado solo en la fase condral constituido por fibroína, MCB y MHB, demostró una integración eficiente con el tejido circundante al sitio de la lesión; mostrando tras el periodo reparativo un tejido de reparación con características histológicas propias del cartílago hialino; propiedades útiles en el tratamiento de lesiones de cartílago articular de espesor completo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, E., Ripoll, P. L., Restrepo, A., & Forriol, F. (2010). Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. *Trauma (Spain)*.
- Anderson, J. M. (2011). Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. In *Principles of Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381422-7.10038-0>
- Athanasίου, K. A., Darling, E. M., DuRaine, G. D., Hu, J. C., & Reddi, A. H. (2013). Articular Cartilage Pathology and Therapies. *Articular Cartilage*. <https://doi.org/10.1201/b14183>
- Awad, H. A., Wickham, M. Q., Leddy, H. A., Gimble, J. M., & Guilak, F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>
- Barron, V., Merghani, K., Shaw, G., Coleman, C. M., Hayes, J. S., Ansboro, S., ... Barry, F. (2015). Evaluation of Cartilage Repair by Mesenchymal Stem Cells Seeded on a PEOT/PBT Scaffold in an Osteochondral Defect. *Annals of Biomedical Engineering*, 43(9), 2069–2082. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1246-2>
- Benders, K. E. M., Boot, W., Cokelaere, S. M., Van Weeren, P. R., Gawlitta, D., Bergman, H. J., ... Malda, J. (2014). Multipotent Stromal Cells Outperform Chondrocytes on Cartilage-Derived Matrix Scaffolds. *Cartilage*.

<https://doi.org/10.1177/1947603514535245>

Bilgen, B., Orsini, E., Aaron, R. K., & Ciombor, D. M. (2007). FBS suppresses TGF- $\beta$ 1-induced chondrogenesis in synoviocyte pellet cultures while dexamethasone and dynamic stimuli are beneficial. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(6), 436–442.

<https://doi.org/10.1002/term.56>

Brighton, C. T., & Heppenstall, R. B. (1971). Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*.

<https://doi.org/10.2106/00004623-197153040-00011>

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 331(14),

889–895. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>

Caballero Mendez, L., Rivera Cano, J., Gaviria Arias, D., & Arias, D. G. (2016).

Evaluación de la Fibroína de Seda como Biomaterial de Soporte para el Crecimiento de Células Mesenquimales Estromales de Pulpa Dental. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*.

<https://doi.org/10.11565/arsmed.v41i1.41>

Cheng, N.-C., Estes, B. T., Awad, H. A., & Guilak, F. (2008). Chondrogenic

Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells by a Porous Scaffold

Derived from Native Articular Cartilage Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part A*. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0253>

Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>

Cukierman, E., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 14, pp. 633–639. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00364-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00364-2)

Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K., & Kim, K. (2016). Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells International*, 2016, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/6737345>

Deepthi, S., & Jayakumar, R. (2016). Prolonged release of TGF- $\beta$  from polyelectrolyte nanoparticle loaded macroporous chitin-poly(caprolactone) scaffold for chondrogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.068>

Duarte Campos, D. F., Drescher, W., Rath, B., Tingart, M., & Fischer, H. (2012). Supporting Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Cartilage*. <https://doi.org/10.1177/1947603512444722>

Edelman, D. B., & Keefer, E. W. (2005). A cultural renaissance: In vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Experimental Neurology*, Vol. 192, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.005>

Frenkel, S. R., Bradica, G., Brekke, J. H., Goldman, S. M., Ieska, K., Issack, P., ...

Kronengold, R. T. (2005). Regeneration of articular cartilage - Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants.

*Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.04.018>

Frisbie, D. D., Cross, M. W., & McIlwraith, C. W. (2006). A comparative study of

articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee.

*Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. <https://doi.org/>

Fuentes-Mera, L., Camacho, A., Engel, E., Pérez-Silos, V., Lara-Arias, J., Marino-

Martínez, I., & Peña-Martínez, V. (2019). Therapeutic Potential of Articular Cartilage Regeneration using Tissue Engineering Based on Multiphase Designs. In *Cartilage Tissue Engineering and Regeneration Techniques*.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.84697>

Gao, Y., Liu, S., Huang, J., Guo, W., Chen, J., Zhang, L., ... Guo, Q. (2014). The

ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes.

*BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/648459>

Haider, M. A., & Guilak, F. (2007). Application of a three-dimensional poroelastic

BEM to modeling the biphasic mechanics of cell-matrix interactions in articular cartilage. *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*.

<https://doi.org/10.1016/j.cma.2006.08.020>

Han, E., Chen, S. S., Klisch, S. M., & Sah, R. L. (2011). Contribution of

proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophysical Journal*.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.006>

Han, T. T. Y., Toutounji, S., Amsden, B. G., & Flynn, L. E. (2015). Adipose-derived stromal cells mediate *in vivo* adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. *Biomaterials*.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.053>

Haug, A. (1964). Composition and Properties of Alginates. *Norwegian Institute of Seaweed Research*. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85263-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85263-6)

Hernandez-Carmona, G., Rofriguez-Montesinos, Y. E., Reyes-Tisnado, R., Arvizu-higuera, D. L., Maurillo-Añvarez, J. L., & Muñoz-Ochoa, M. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México Technological Advance for Alginate Production in Mexico. *Ingeniería Investigación y Tecnología*.

<https://doi.org/10.22201/ii.25940732e.2012.13n2.015>

Hurtig, M. B., Buschmann, M. D., Fortier, L. A., Hoemann, C. D., Hunziker, E. B., Jurvelin, J. S., ... Whiteside, R. A. (2011). Preclinical studies for cartilage repair: Recommendations from the international cartilage repair society.

*Cartilage*. <https://doi.org/10.1177/1947603511401905>

Hussein, K. H., Park, K. M., Kang, K. S., & Woo, H. M. (2016). Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering C*.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.068>

Jiang, C. C., Chiang, H., Liao, C. J., Lin, Y. J., Kuo, T. F., Shieh, C. S., ... Tuan, R. S. (2007). Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. *Journal of Orthopaedic Research*.

<https://doi.org/10.1002/jor.20442>

Kankala, R., Lu, F.-J., Liu, C.-G., Zhang, S.-S., Chen, A.-Z., & Wang, S.-B. (2018). Effect of Icarin on Engineered 3D-Printed Porous Scaffolds for Cartilage Repair. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma11081390>

Kong, L., Zheng, L. Z., Qin, L., & Ho, K. K. W. (2017). Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *Journal of Orthopaedic Translation*.

<https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.006>

Landínez-Parra, N. S., Garzón-Alvarado, D. A., & Vanegas-Acosta, J. C. (2012). Mechanical Behavior of Articular Cartilage. *Injury and Skeletal Biomechanics*.

<https://doi.org/10.5772/46881>

Lee, K., Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments.

*Journal of the Royal Society Interface*. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223>

Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T. S., Pavlos, N. J., Zhang, C., & Zheng, M. H. (2013). Subchondral bone in osteoarthritis: Insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Research and Therapy*, Vol. 15.

<https://doi.org/10.1186/ar4405>

- Li, J. J., Kim, K., Roohani-Esfahani, S.-I., Guo, J., Kaplan, D. L., & Zreiqat, H. (2015). A biphasic scaffold based on silk and bioactive ceramic with stratified properties for osteochondral tissue regeneration. *J. Mater. Chem. B*, 3(26), 5361–5376. <https://doi.org/10.1039/C5TB00353A>
- Li, W. J., Chiang, H., Kuo, T. F., Lee, H. S., Jiang, C. C., & Tuan, R. S. (2009). Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: A pilot study. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1002/term.127>
- Li, X., Ding, J., Wang, J., Zhuang, X., & Chen, X. (2015). Biomimetic biphasic scaffolds for osteochondral defect repair. *Regenerative Biomaterials*, 2(3), 221–228. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv015>
- Liu, P., Sun, L., Chen, H., Sun, S., Zhou, D., Pang, B., & Wang, J. (2015). Lentiviral-mediated multiple gene transfer to chondrocytes promotes chondrocyte differentiation and bone formation in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4241>
- Mansour, A., Mezour, M. A., Badran, Z., & Tamimi, F. (2017). Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. *Tissue Engineering Part A*. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0026>
- Mansour, J. M. (2009). Biomechanics of Cartilage. *Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, 66–79.

<https://doi.org/10.1002/art.23548>

- March, L., & Little, C. (2016). ARTICULAR CARTILAGE IN HEALTH AND DISEASE. In *The Musculoskeletal System*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-3377-3.00006-8>
- Martin, I., Miot, S., Barbero, A., Jakob, M., & Wendt, D. (2007). Osteochondral tissue engineering. *Journal of Biomechanics*, Vol. 40, pp. 750–765. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.03.008>
- Mata, M., Milian, L., Oliver, M., Zurriaga, J., Sancho-Tello, M., De Llano, J. J. M., & Carda, C. (2017). In Vivo Articular Cartilage Regeneration Using Human Dental Pulp Stem Cells Cultured in an Alginate Scaffold: A Preliminary Study. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2017/8309256>
- McMahon, L., O'Brien, F., & Prendergast, P. (2008). Biomechanics and mechanobiology in osteochondral tissues. *Regenerative Medicine*, 3(5), 743–759. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.5.743>
- Mehlhorn, A. T., Niemeyer, P., Kaschte, K., Muller, L., Finkenzeller, G., Hartl, D., ... Schmal, H. (2007). Differential effects of BMP-2 and TGF- $\beta$ 1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2007.00473.x>
- Mejia Pacheco, M., Molist Garcia, P., & Pomal Diego, M. A. (n.d.). Tejidos animales. Tejido cartilaginoso. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Retrieved September 13, 2019, from

[https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada\\_a\\_cartilaginoso.php](https://mmegias.webs.uvigo.es/guiada_a_cartilaginoso.php)

Moncada-Saucedo, N. K., Marino-Martínez, I. A., Lara-Arias, J., Romero-Díaz, V.

J., Camacho, A., Valdés-Franco, J. A., ... Fuentes-Mera, L. (2019). A

Bioactive Cartilage Graft of IGF1-Transduced Adipose Mesenchymal Stem

Cells Embedded in an Alginate/Bovine Cartilage Matrix Tridimensional

Scaffold. *Stem Cells International*, 2019, 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2019/9792369>

Nehrer, S., Spector, M., & Minas, T. (1999). Histologic analysis of tissue after failed

cartilage repair procedures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*.

<https://doi.org/10.1097/00003086-199908000-00020>

Ng, J., Bernhard, J., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Mesenchymal stem cells for

osteocondral tissue engineering. In *Methods in Molecular Biology*.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_3)

Nooeaid, P., Salih, V., Beier, J. P., & Boccaccini, A. R. (2012). Osteochondral

tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular*

*and Molecular Medicine*, 16(10), 2247–2270. [https://doi.org/10.1111/j.1582-](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01571.x)

[4934.2012.01571.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01571.x)

Nukavarapu, S. P., & Dorcemus, D. L. (2013). Osteochondral tissue engineering:

Current strategies and challenges. *Biotechnology Advances*, Vol. 31, pp. 706–

721. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.004>

Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2017). Regenerative strategies for the treatment of

knee joint disabilities. In *Strategies in Regenerative Medicine*.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-44785-8>

Pan, Z., Duan, P., Liu, X., Wang, H., Cao, L., He, Y., ... Ding, J. (2015). Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in cartilage tissue engineering. *Regenerative Biomaterials*, 2(1), 9–19.

<https://doi.org/10.1093/rb/rbv001>

Pei, Y., Fan, J. J., Zhang, X. Q., Zhang, Z. Y., & Yu, M. (2014). Repairing the osteochondral defect in goat with the tissue-engineered osteochondral graft preconstructed in a double-chamber stirring bioreactor. *BioMed Research International*, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/219203>

Poole, C. A. (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure.

*Journal of Anatomy*, 191 ( Pt 1, 1–13. [https://doi.org/10.1046/j.1469-](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x)

[7580.1997.19110001.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19110001.x)

Ravanetti, F., Galli, C., Manfredi, E., Cantoni, A. M., Scarpa, E., Macaluso, G. M., & Cacchioli, A. (2015). Chitosan-based scaffold modified with D-(+) raffinose

for cartilage repair: an in vivo study. *Journal of Negative Results in*

*Biomedicine*, 14, 2. <https://doi.org/10.1186/s12952-014-0021-5>

Reinholz, G. G., Lu, L., Saris, D. B. F., Yaszemski, M. J., & O'Driscoll, S. W.

(2004). Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials*.

[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00498-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00498-8)

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L.

(2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>

Rothrauff, B. B., Yang, G., & Tuan, R. S. (2017). Tissue-specific bioactivity of soluble tendon-derived and cartilage-derived extracellular matrices on adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*.  
<https://doi.org/10.1186/s13287-017-0580-8>

Ruetze, M., & Richter, W. (2014). Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: Trophic function versus stem cell activity. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 16. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.9>

Shah, D., Naware, S., Bhatnagar, S., & Kulkarni, V. (2014). Role of magnetic resonance imaging in the evaluation of articular cartilage in painful knee joint. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*. <https://doi.org/10.4103/0975-2870.126326>

Shimomura, K., Moriguchi, Y., Murawski, C. D., Yoshikawa, H., & Nakamura, N. (2014). Osteochondral Tissue Engineering with Biphasic Scaffold: Current Strategies and Techniques. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(5), 468–476. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0543>

Sladkova, M., Cheng, J., Palmer, M., Chen, S., Lin, C., Xia, W., ... de Peppo, G. M. (2018). Comparison of Decellularized Cow and Human Bone for Engineering Bone Grafts with Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, ten.tea.2018.0149. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0149>

- Slattery, C., & Kweon, C. Y. (2018). Classifications in Brief: Outerbridge Classification of Chondral Lesions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. <https://doi.org/10.1007/s11999-0000000000000255>
- Smith, G. D. (2005). A clinical review of cartilage repair techniques. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 87-B(4), 445–449. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B4.15971>
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Sosio, C., Di Giancamillo, A., Deponi, D., Gervaso, F., Scalera, F., Melato, M., ... Peretti, G. M. (2015). Osteochondral Repair by a Novel Interconnecting Collagen–Hydroxyapatite Substitute: A Large-Animal Study. *Tissue Engineering Part A*, 21(3–4), 704–715. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0129>
- Subbiah, R., & Guldberg, R. E. (n.d.). Materials Science and Design Principles of Growth Factor Delivery Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials*, 0(0), 1801000. <https://doi.org/doi:10.1002/adhm.201801000>
- Tamaddon, M., Wang, L., Liu, Z., & Liu, C. (2018). Osteochondral tissue repair in osteoarthritic joints: clinical challenges and opportunities in tissue engineering. *Bio-Design and Manufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s42242-018-0015-0>

Tolle, C., Riedel, J., Mikolaj, C., Winkel, A., Stiesch, M., Wirth, D., & Menzel, H.

(2018). Biocompatible Coatings from Smart Biopolymer Nanoparticles for Enzymatically Induced Drug Release. *Biomolecules*.

<https://doi.org/10.3390/biom8040103>

Vepari, C., & Kaplan, D. L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer*

*Science (Oxford)*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013>

Wang, Y., Rudym, D. D., Walsh, A., Abrahamsen, L., Kim, H. J., Kim, H. S., ...

Kaplan, D. L. (2008). In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.05.002>

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>

Y., Z., Garciadiego-Czares, D., Parra- Cid, C., Aguilar-Gaytn, R., Velasquillo, C.,

Ibarra, C., & Castro Carmo, J. S. (2013). Cartilage Tissue Engineering: The Role of Extracellular Matrix (ECM) and Novel Strategies. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.5772/55917>

Zhou, T., Li, X., Li, G., Tian, T., Lin, S., Shi, S., ... Lin, Y. (2017). Injectable and

thermosensitive TGF- $\beta$ 1-loaded PCEC hydrogel system for in vivo cartilage repair. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11322-w>

## ANEXOS

### Anexo 1

#### **Buffer hipotónico (TRIS-HCL 10mM, EDTA 2mM)**

1. Para preparar 1 l de buffer hipotónico pesar:

1.576 g de TRIS-HCL (SIGMA)

0.584 g de EDTA (SIGMA)

2. Adicionar 800 ml de agua destilada y homogenizar.

3. Ajustar a pH 8.

### Anexo 2

#### **Buffer hipotónico suplementado con KCl 100mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM**

1. Para prepara 1 l. A partir de buffer hipotónico pH 8 adicionar:

7.456 g de KCl (SIGMA)

0.476 g MgCl<sub>2</sub>(SIGMA)

2. Mezclar hasta homogenizar.

### **Anexo 3**

#### **Buffer hipotónico suplementado con KCl 100mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM y 0.5% SDS**

1. Para preparar 1 l. A partir de buffer hipotónico pH 8 adicionar:

7.456 g de KCl

0.476 g MgCl<sub>2</sub>

5 g de SDS (SIGMA)

2. Mezclar hasta homogenizar.

### **Anexo 4**

#### **Buffer hipotónico + 0.5% SDS**

1. Para preparar 1 l. A partir de buffer hipotónico pH 8 adicionar:

5 g de SDS

2. Mezclar hasta homogenizar.

### **Anexo 5**

#### **Ensayo de Azul de alamar para hueso bovino descelularizado**

1. Preparar el medio de cultivo correspondiente con 10% de azul de alamar.
2. Adicionar el volumen necesario de azul alamar al 10% en cada tratamiento, por ejemplo 800 µl a cajas de 48 pozos).
3. Incubar durante 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, protegido de la luz.

**Evaluación *in vivo* de un implante bifásico bioactivo para la regeneración simultánea del cartilago articular y el hueso subcondral en lesiones condrales de gran extensión**

---

4. Colocar el medio en cajas negras de 96 pozos. Lavar los andamios con PBS y seguir el cultivo con el medio correspondiente.
5. Leer la fluorescencia bajo las siguientes condiciones:  
Longitud de excitación: 540-570 nm  
Longitud de emisión: 580-610 nm
6. En cada nueva lectura se debe cambiar el implante de pozo con el objetivo de que las células que se adhieren a la superficie de la placa no interfieran con los resultados de la lectura.
7. Los datos se deben normalizar con la lectura del medio correspondiente cultivado bajo las mismas condiciones en pozos libres de células.

## **Anexo 6**

### **Embebido de tejido en parafina**

Fijación del tejido:

1. Fijar el tejido en la solución correspondiente de 24 a 48 h.
2. Una vez cumplido el tiempo de fijación lavar con PBS.

Deshidratación del tejido:

1. Colocar las muestras en cassetes de inclusión y deshidratar en acetonas graduales (CTR) 70%, 90%, 90%, 100%, 100% por 20 min cada una.
2. Colocar en las siguientes soluciones por 20 min cada una: acetona/xilol, xilol 100%, xilol 100%.

Embebido en parafina:

1. Colocar en dos soluciones de parafina líquida por 30 min cada una a 60°C.
2. Colocar las muestras en bloques de inclusión y embeber las muestras con parafina, enfriar el bloque a 4°C por al menos 2 h. desmontar del bloque y mantener a 4°C hasta realizar los cortes.

## **Anexo 7**

### **Desparafinización de laminillas**

1. Para poder realizar las tinciones las laminillas con los cortes se colocan en un horno a 60°C de 15 a 30 min.
2. Posteriormente se colocan en Xilol por 5 min, seguido por 5 min en etanol/xilol, 2 min en etanol absoluto, 2 min en etanol 96% y 2 min en agua destilada.
3. Proceder con la tinción correspondiente.

## **Anexo 8**

### **Silanizado de portaobjetos**

1. Limpiar los portaobjetos para que estén libres de polvo.
2. Diluir Silano 3% en acetona, debe hacerse en recipiente de plástico para evitar que el silano se adhiera al vidrio.
3. Sumergir por 2 min los portaobjetos en la solución.

4. Escurrir y enjuagar por 2 min en 2 lavados de agua destilada.
5. Dejar secar verticalmente.

## **Anexo 9**

### **Buffer de citratos**

Solución A. Ácido cítrico anhidro 0.1 M

Solución B Citrato de sodio dihidratado 0.1 M

Tomar 9.5 ml de la solución. A y 41.5 ml de la solución B, aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada y ajustar a pH 6 con 5N NaOH y 1 N HCl. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.