

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS:

**DISEÑO DE UN ANDAMIO A BASE DE FIBRINA Y
MATRICES BIOLÓGICAS CON POTENCIAL
CONDROGÉNICO.**

PRESENTADO POR:

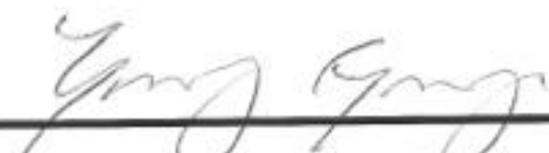
M.C. JUAN ANTONIO ROJAS MURILLO

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

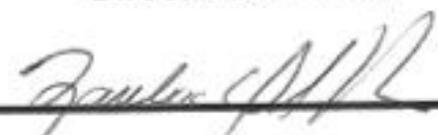
MONTERREY N.L. JULIO, 2025

**DISEÑO DE UN ANDAMIO A BASE DE FIBRINA Y MATRICES
BIOLÓGICAS CON POTENCIAL CONDROGÉNICO.**

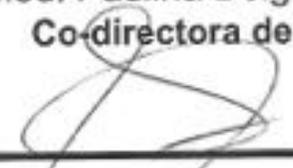
Aprobación de tesis:



Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Directora de Tesis



Dra. Med. Paulina Delgado González
Co-directora de Tesis



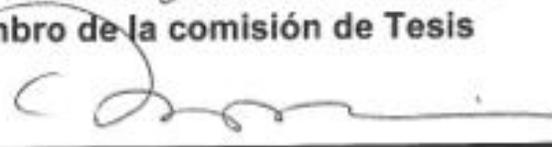
Dr. C. Mario Alberto Simental Mendía
Miembro de la comisión de Tesis



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Miembro de la comisión de Tesis



Dr. C. José Francisco Islas Cisneros
Miembro de la comisión de Tesis



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

El presente trabajo se llevó a cabo en el **Laboratorio de Terapia Celular e Ingeniería de Tejidos** del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, bajo la Dirección de la Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño y en el **Banco de Hueso y Tejidos** del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo la Supervisión del Dr. C. Mario Simental Mendía.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al SECIHTI (anteriormente CONACYT), por el apoyo brindado mediante la beca de posgrado que hizo posible el desarrollo de este proyecto de investigación y la elaboración de esta tesis.

A la comisión de tesis, integrada por la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño, el Dr. Mario Simental Mendía, la Dra. Paulina Delgado González, el Dr. Francisco Islas Cisneros y la Dra. Ana María Rivas Estilla, por su guía a lo largo de mi proyecto de investigación y por brindarme las herramientas necesarias para concluir mi posgrado.

A mis directores de tesis, la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño y el Dr. Mario Simental Mendía, por acompañarme durante todo el doctorado, por todo lo aprendido, por su paciencia y comprensión, y por facilitarme los medios para llevar a cabo mi investigación. Espero continuar trabajando y colaborando con ustedes.

A la Dra. Paulina Delgado González, por su interés no solo en mi desempeño académico, sino también en mi bienestar personal: por preguntar cómo me sentía y asegurarse de que estuviera a gusto.

Al Dr. Héctor Leija y Dr. Rodolfo Franco, muchísimas gracias por su ayuda en el desarrollo de mi tesis y por facilitarme las herramientas para cumplir los objetivos y experimentos de mi investigación.

A los profesores del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, por su enseñanza, pláticas, felicitaciones, críticas y sugerencias que enriquecieron mi estancia en el departamento; y al personal administrativo, en especial a Juany, por consentirme, su amabilidad y su apoyo constante en cada paso; y a Deya, por aguantarme y por su paciencia con los trámites y requisitos que en ocasiones olvidaba.

Finalmente, a mis compañeros y compañeras de posgrado, por la colaboración, las discusiones científicas, las ideas compartidas y el compañerismo de cada día; por los días en el laboratorio, los cafés, las risas y el apoyo en los momentos difíciles. Haber recorrido este camino junto a ustedes hizo todo más enriquecedor y fácil de llevar.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por permitirme cumplir otra de mis metas, por bendecirme en cada paso de mi vida, por cuidarme siempre y por haberme dado la dicha de nacer en una familia a la que amo, aunque hoy mi relación con Él no sea la mejor.

A mis Padres, que aun siendo adulto me apoyan incondicionalmente; por darme siempre mucho más de lo que necesitaba; porque gran parte de lo que soy se lo debo a ustedes y cada uno de mis logros es también suyo. Gracias por darme el mejor ejemplo de la persona y del padre que quiero ser. No existe cifra en el universo que alcance para describir mi amor por ustedes: son lo mejor que la vida me pudo dar.

A mis hermanos, Chita, Danny y Jorge, y a sus familias, por toda una vida a su lado; por impulsarme a ser mejor en lo que hago; por ayudarme cada vez que lo necesité; por confiar en mí y por regalarme una familia más grande con personas a las que amo profundamente. Los amo incondicionalmente, con todo el amor que existe en el universo y más.

A mi familia materna, por su apoyo, elogios, ejemplos y amor; por ver en mí una versión mejor de quien soy, por ponerme como ejemplo y por inspirarme a querer ser esa versión que ustedes ven en mí.

A mi familia paterna, por darme los mejores ejemplos de cómo una persona debe ser; por enseñarme valores, humildad y el sentido de familia. Aunque no nos veamos con frecuencia, siempre nos tratamos como si nos viéramos a diario, con el mismo amor, cariño y felicidad.

A todos y cada uno de mis amigos, de la iglesia, de la escuela y de la vida, gracias por su compañía, crecimiento, complicidad, peleas, discusiones, consejos, por los momentos vividos y por mucho más. Gracias por estar ahí para mí.

A mis amigas VIP de Monterrey, Mich, Sofi y Adri: gracias por acompañarme y seguirme en mis ideas; y sí, por el chisme (jeje). Las quiero.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica, algunos ya no están pero fueron parte importante: Pablo, Toño, Fer, Cynthia, Selene, Óscar y a los que está: Itzel, Sergio, JD, Jocelyn, Yareli y Luis con quienes más conviví durante mi doctorado). Y, principalmente, a David, una persona como pocas en este mundo y a quien admiro mucho: muchísimas gracias por toda la ayuda, por las pláticas, por acompañarme y por tu amistad. Sin tu apoyo, mi investigación habría sido mucho más difícil; gracias de verdad.

Finalmente, y de manera personal, quiero agradecer de nuevo a mis “padres científicos”. A la **Dra. Elsa Nancy Garza Treviño**, muchísimas gracias por estos seis años como mi guía (maestría y doctorado), por su apoyo, por aterrizarme cuando fue necesario, por

animarme a seguir, por las pláticas, por ser la asesora perfecta y, me atrevo a decir, la mejor del departamento. Me llevo un aprendizaje inmenso de usted y le agradezco infinitamente haber estado siempre para mí. Al **Dr. Mario Simental Mendía**, de verdad he aprendido muchísimo de usted. Gracias por su comprensión y por la presión necesaria para ayudarme a cumplir (aunque más de una vez no lo hiciera a tiempo), por respaldar muchas veces mis ideas y por creer en mí. Tenerlo como asesor me dio, en numerosas ocasiones, la confianza de que estaba haciendo bien mi trabajo. Espero que podamos seguir colaborando y desarrollando nuevas ideas y proyectos. Ambos han dejado una huella profunda en mí y los llevo con gran cariño.

DEDICATORIA

A mis padres, porque cada logro es por y gracias a ustedes.

A mis hermanos, Chita, Danny y Jorge, y a sus familias, por inspirarme y enseñarme.

A mis amigos y a mi familia, por su apoyo incondicional y por estar siempre ahí para mí.

Al yo que era cuando llegué a este lugar, al que soy hoy y al que seré en el futuro:
nunca dejes de soñar; lucha siempre por lo que deseas.

A todas las personas que se cruzaron en mi camino y dejaron su huella en mí, sé que
soy quien soy hoy porque las conocí.

¡No! No podría estar más feliz...

***Aunque, tengo que admitir, es un poco diferente a lo que había anticipado.
Pero, aun así, simplemente no podría estar más feliz, bueno, tal vez no "simplemente".
Porque alcanzar tus sueños es algo extraño, y parece ser un poco... complicado.***

***Creo que hay un cierto tipo de costo. Hay un par de cosas que se pierden en el camino.
Hay límites que cruzas que no sabías que cruzaste... hasta que ya los has cruzado.
Y esa alegría, esa emoción que esperabas, a veces no te emociona tanto como pensabas que lo haría.***

***Aun así... aquí estoy, con este final perfecto: ¡las felicitaciones y la emoción!
¿Quién no se sentiría feliz? Así es... No podría estar más feliz.
Porque la felicidad es lo que sucede cuando todos tus sueños se vuelven realidad.***

¿Y bien, es así? ¿Es feliz quien hace sus sueños realidad?

-Traducido y modificado de "Thanks Goodness" de Stephen Schwartz.



ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
4. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Cartílago articular	4
2.1.1. Condrocitos	4
2.1.2. Estructura del cartílago articular.....	6
2.1.2.1. Zona superficial.....	6
2.1.2.2. Zona media.....	8
2.1.2.3. Zona profunda	10
2.1.2.4. Zona calcificada	11
2.2. Lesiones de cartílago articular	12
2.3. Enfoques terapéuticos para el tratamiento de lesiones de cartílago articular	14
2.3.1. Enfoques basados en estimulación medular	15
2.3.2. Enfoques basados en reemplazo osteocondral	16
2.3.3. Enfoques basados en terapia celular	18
2.3.4. Enfoques basados en aplicación de agentes ortobiológicos	19
2.3.5. Enfoque basado en Ingeniería de tejidos y biomateriales	20
2.4. Ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago articular	22
2.4.1. Uso de biomateriales en ingeniería de cartílago	25
2.4.1.1. Fibrina.....	25
2.4.1.2. Matriz de cartílago articular descelularizado	27
2.4.1.3. Matriz de membrana amniótica descelularizada	30
2.5. Antecedentes directos del grupo de investigación	¡Error! Marcador no definido.
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
7. METODOLOGÍA	37
7.1. Recolección de Cartílago Humano y Preparación de la Matriz de Cartílago Articular Descelularizada (MCAd)	37

7.2. Recolección de Membrana Amniótica y Preparación de la Matriz de Membrana Amniótica Descelularizada (MMAd)	38
7.3. Análisis Histológico e Inmunohistoquímico	39
7.4. Análisis de Microestructura de MCAAd y MMAd	40
7.5. Espectroscopía FT-IR	40
7.6. Aislamiento y Cultivo de Condrocitos	40
7.7. Ensayos de Cultivo Celular <i>In Vitro</i>	40
7.8. Análisis de expresión de genes condrogénicos.....	41
7.9. Generación del andamio FCMA	42
7.10 Evaluación Microscópica	43
7.12 Evaluación de la Estabilidad del andamio FCMA en Cultivo.....	43
7.13 Evaluación de la Citocompatibilidad	43
7.14 Evaluación del mantenimiento del linaje condrogénico	44
7.15 Evaluación de la Producción de Elementos de la Matriz Extracelular (MEC) en el Andamio	45
8. RESULTADOS	47
8.1. Obtención de matrices en polvo	47
8.2. Eliminación de células mediante el proceso de descclularización	48
8.3. Preservación de la composición bioquímica nativa de las MEC	48
8.4. Conservación del colágeno y agrecano en las matrices en polvo	49
8.5. Los extractos de MCAAd y MMAd inducen la proliferación de condrocitos humanos ..	51
8.6. La MCAAd incrementa la expresión de SOX9, mientras que el MMAd incrementa la expresión de ACAN	53
8.7. La combinación de MCAAd y MMAd potencia la expresión de genes condrogénicos...	54
8.8 Diseño de Andamio FCMA	55
8.9 Evaluación de la degradación y Citocompatibilidad del andamio FCMA.....	56
8.10 Evaluación de la expresión de genes condrogénicos	59
8.13 Evaluación de la producción de elementos de la ECM en el andamio FCMA	62
8.14 Caracterización histológica del andamio FCMA	65
9. DISCUSIÓN.....	68
10. CONCLUSIONES	84
11. PERSPECTIVAS	85

REFERENCIAS..... 87
APÉNDICES 114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del cartílago articular.	6
Figura 2. Estrategia experimental.....	36
Figura 3. Descripción macroscópica y microscópica de MCAd y MMAd.	47
Figura 4. Caracterización histológica del cartílago articular (CA) y la membrana amniótica (MA) antes y después de la descelularización.....	49
Figura 5. Caracterización del cartílago articular (CA) y la membrana amniótica (MA) antes y después de la descelularización.	50
Figura 6. Efecto de MCAd y MMAd en el cultivo de condrocitos in vitro.	52
Figura 7. Efecto de la mezcla de MCAd y MMAd en el cultivo de condrocitos in vitro.	55
Figura 8. Evaluación de la polimerización, morfología y degradación de los andamios.....	57
Figura 9. Evaluación de la viabilidad celular y distribución de condrocitos en los andamios. .	59
Figura 10. Expresión relativa de genes asociados al fenotipo condrogénico.	61
Figura 11. Evaluación inmunohistoquímica de colágeno tipo II en los andamios.	62
Figura 12. Evaluación inmunohistoquímica de agrecano en los andamios.	63
Figura 13. Evaluación inmunohistoquímica de colágeno tipo I en los andamios.....	64
Figura 14. Evaluación histológica de los andamios mediante H&E y Safranina O/Verde Rápido.	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Componentes Bioactivos de la Matriz de Cartílago Articular descelularizada **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. Componentes Bioactivos de la Matriz de Membrana amniótica descelularizada ¡Error! Marcador no definido.

ABREVIATURAS

ACAN	Agrecano (proteoglicano agregado)
ADAMTS5	Una Disintegrina y Metaloproteinasas con motivos de trombospondina 5
BMAC	Concentrado de Médula Ósea Autólogo
BMP-2	Proteína Morfogenética Ósea 2
BMP-7	Proteína Morfogenética Ósea 7
CAMO	Concentrado de Aspirado de Médula Ósea
CMM	Células Madre Mesenquimales
COL10A1	Cadena Alfa 1 del Colágeno Tipo X
COL1A2	Cadena Alfa 2 del Colágeno Tipo I
COL2A1	Cadena Alfa 1 del Colágeno Tipo II
COMP	Proteína Oligomérica de la Matriz del Cartílago
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FCMA	Fibrina con Cartílago y Membrana Amniótica
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FT-IR	Espectroscopía por Transformada de Fourier en el Infrarrojo
H&E	Hematoxilina y Eosina
HA	Ácido Hialurónico
HGF	Factor de Crecimiento Hepatocítico
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1β	Interleucina 1 beta
MEC	Matriz Extracelular
MMP13	Metaloproteinasas de la Matriz 13
MSCs	Células Madre Mesenquimales
PRG4	Proteoglicano 4 (lubricina)
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa
RUNX2	Factor de Transcripción Relacionado con Runt 2
SOX9	Factor de Transcripción SRY-Box 9
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
MCA_d	Matriz de Cartílago Articular Descelularizada
MMA_d	Matriz de Membrana Amniótica Descelularizada

RESUMEN

M.C. Juan Antonio Rojas Murillo

Fecha de Graduación: agosto del 2025

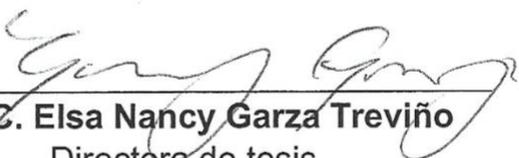
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Título del estudio: Diseño de un andamio a base de fibrina y matrices biológicas con potencial condrogénico.

Área de Estudio: Ingeniería de Tejidos.

Número de páginas: 114

INTRODUCCIÓN: El cartílago articular es un tejido altamente especializado, avascular, aneural y alinfático, cuya función principal es facilitar el movimiento articular y absorber cargas mecánicas. Sin embargo, su limitada capacidad de regeneración lo hace vulnerable a lesiones focales que, si no se tratan, pueden progresar a patologías degenerativas como la osteoartritis. Ante la limitada eficacia de tratamientos convencionales, la ingeniería de tejidos ha emergido como una alternativa terapéutica que busca restaurar la función del cartílago mediante andamios biomiméticos que imiten la matriz extracelular (MEC) y mantengan el fenotipo condrogénico. **OBJETIVOS:** Diseñar, caracterizar y evaluar un andamio funcional compuesto por fibrina, matriz de cartílago articular descelularizado (MCAd) y membrana amniótica descelularizada (MMAd), con el fin de preservar el fenotipo condrogénico y promover la regeneración de cartílago hialino *in vitro*. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se obtuvieron cartílago articular humano y membrana amniótica, los cuales fueron descelularizados mediante protocolos físicos, enzimáticos y detergentes no iónicos, y posteriormente liofilizados y pulverizados. Se formularon andamios de fibrina mediante la combinación de trombina y fibrinógeno, incorporando concentraciones óptimas de MCAd y MMAd previamente determinadas mediante ensayos de viabilidad y proliferación celular. Los condrocitos humanos fueron aislados, cultivados, y sembrados sobre los andamios funcionalizados, evaluando su comportamiento durante 28 días de cultivo estático. Se aplicaron pruebas de viabilidad celular (Live/Dead), tinciones histológicas (Azul Alciano, Safranina-O y Hematoxilina-Eosina), y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR para los marcadores SOX9, COL2A1, ACAN y RUNX2. Además, se analizó la morfología celular, la distribución de matriz extracelular y el mantenimiento del fenotipo condrogénico. **RESULTADOS:** Los andamios funcionalizados mostraron cerca del 99% de viabilidad celular y una distribución homogénea de condrocitos en el interior del hidrogel. Se observó un incremento mayor a 1.5 veces la expresión de genes asociados al fenotipo condrogénico (SOX9, COL2A1, ACAN) en comparación con los controles, así como una disminución de casi 3 veces en la expresión de RUNX2, indicador de diferenciación de hipertrofia. Las tinciones confirmaron una mayor acumulación de proteoglicanos sulfatados en los grupos con MCAd y MMAd. **CONCLUSIONES:** La incorporación simultánea de MCAd y MMAd a hidrogeles de fibrina permite generar un microambiente bioactivo y biomimético que favorece la expresión de marcadores condrogénicos, la síntesis de matriz extracelular hialina y la preservación del fenotipo condrocítico. Este sistema de andamio funcional representa una estrategia prometedora para la reparación de defectos focales del cartílago articular.


Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Directora de tesis

ABSTRACT

M.C. Juan Antonio Rojas Murillo

Graduation Date: August 2025

**Universidad Autónoma de Nuevo León
School of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Medicine**

Study Title: Design of a Fibrin-Based Scaffold Functionalized with Biologic Matrices with Chondrogenic Potential.

Field of Study: Tissue Engineering

Number of Pages: 114

INTRODUCTION: Articular cartilage is a highly specialized tissue that is avascular, aneural, and alymphatic, with the primary function of facilitating joint movement and absorbing mechanical loads. However, its limited regenerative capacity makes it vulnerable to focal injuries which, if left untreated, may progress to degenerative pathologies such as osteoarthritis. Given the limited effectiveness of conventional treatments, tissue engineering has emerged as a therapeutic alternative aimed at restoring cartilage function through biomimetic scaffolds that replicate the extracellular matrix (ECM) and support the maintenance of the chondrogenic phenotype. **OBJECTIVES:** To design, characterize, and evaluate a functional scaffold composed of fibrin, decellularized articular cartilage matrix (MCA_d), and decellularized amniotic membrane (MMA_d), with the aim of preserving the chondrogenic phenotype and promoting the *in vitro* regeneration of hyaline cartilage. **MATERIALS AND METHODS:** Human articular cartilage and amniotic membrane were obtained, decellularized using physical, enzymatic, and non-ionic detergent-based protocols, and subsequently lyophilized and pulverized. Fibrin scaffolds were formulated by combining thrombin and fibrinogen and incorporating optimal concentrations of MCA_d and MMA_d, previously determined through cell viability and proliferation assays. Human chondrocytes were isolated, cultured, and seeded onto the functionalized scaffolds and evaluated over a 28-day static culture period. Cell viability (Live/Dead assay), histological stains (Alcian Blue, Safranin-O, and Hematoxylin-Eosin), and gene expression analysis by RT-qPCR were performed for SOX9, COL2A1, ACAN, and RUNX2. Additionally, cell morphology, extracellular matrix distribution, and chondrogenic phenotype maintenance were assessed. **RESULTS:** The functionalized scaffolds showed approximately 99% cell viability and a homogeneous distribution of chondrocytes within the hydrogel. An increase greater than 1.5-fold in the expression of genes associated with the chondrogenic phenotype (SOX9, COL2A1, ACAN) was observed compared to controls, along with an almost threefold decrease in the expression of RUNX2, an indicator of hypertrophic differentiation. Staining confirmed a greater accumulation of sulfated proteoglycans in the groups with MCA_d and MMA_d. **CONCLUSIONS:** The simultaneous incorporation of MCA_d and MMA_d into fibrin hydrogels enables the creation of a bioactive and biomimetic microenvironment that promotes the expression of chondrogenic markers, the synthesis of hyaline extracellular matrix, and the preservation of the chondrocytic phenotype. This functional scaffold system represents a promising strategy for the repair of focal articular cartilage defects.

1. INTRODUCCIÓN

La reparación del cartílago articular representa uno de los desafíos más complejos en la medicina regenerativa debido a las características anatómicas y fisiológicas propias de este tejido [1]. El cartílago articular es un tejido avascular, aneural y alinfático, compuesto por una matriz extracelular (MEC) densa y por una única población celular especializada: los condrocitos [2]. Su limitada capacidad intrínseca de autorreparación, sumada a su baja actividad celular y escasa renovación de la matriz, lo convierten en un blanco particularmente vulnerable a procesos degenerativos o traumáticos [3]. En consecuencia, las lesiones focales del cartílago, si no se tratan adecuadamente, pueden evolucionar hacia patologías más graves como la osteoartritis, con un alto impacto funcional y socioeconómico para la población afectada[4].

Si bien no se sabe con exactitud la incidencia global de las lesiones focales de cartilago articular, se estima que afecta a 0.2 personas de cada 1000 al año [5]. Además estudios recientes afirman que el 36 % de los atletas padecen este tipo de lesiones [4], así como entre el 5 y el 10% de las personas mayores de 40 años [6].

En las últimas décadas, la ingeniería de tejidos ha emergido como una disciplina prometedora para el tratamiento de defectos focales del cartílago, proponiendo soluciones biotecnológicas que combinan células, biomateriales y señales bioactivas [7]. Uno de los pilares fundamentales en esta estrategia son los andamios tridimensionales, cuya función principal es proporcionar un microambiente adecuado que recapitule las propiedades estructurales, mecánicas y bioquímicas del cartílago nativo [7]. Para lograrlo, es necesario emplear biomateriales capaces de sostener la viabilidad y función de los condrocitos o células progenitoras, así como de guiar la regeneración de la matriz cartilaginosa [8].

Entre los distintos biomateriales disponibles, la fibrina se ha consolidado como una de las matrices naturales más utilizadas en ingeniería de tejidos, debido a su excelente biocompatibilidad, capacidad de gelificación *in situ*, y propiedades bioactivas [9]. Mediante la acción de la trombina, la fibrina forma una red tridimensional que favorece la

adhesión celular, permite la encapsulación de células y la incorporación de moléculas bioactivas, y puede integrarse fácilmente con otros componentes. Sin embargo, su rápida degradación y limitada resistencia mecánica requieren de estrategias adicionales de estabilización y funcionalización para potenciar su desempeño en aplicaciones de carga como el cartílago articular [10].

En este contexto, la incorporación de agentes funcionalizantes derivados de matrices extracelulares descelularizadas (MECd) se ha propuesto como una estrategia altamente efectiva para dotar a los andamios de señales biológicas específicas del tejido [11]. La matriz de cartilago articular descelularizada (MCAd) conserva componentes estructurales y bioactivos esenciales, como colágeno tipo II, agregano, glicosaminoglicanos (GAGs) y factores de crecimiento asociados a la MEC, tales como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) [12]. Estos elementos no solo promueven la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales y condrocitos, sino que también favorecen la homeostasis tisular y la síntesis de nueva matriz específica. Asimismo, su incorporación en hidrogeles permite mejorar la arquitectura del andamio y estimular vías de señalización que potencian la regeneración del cartílago [13].

De forma complementaria, la membrana amniótica humana descelularizada (MMAd) ha mostrado ser un recurso valioso como biomaterial funcionalizante, dada su abundante composición en colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicanos y factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) y TGF- β [14]. Estos componentes confieren propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y condroprotectivas, lo que resulta particularmente relevante en entornos articulares dañados o inflamados [15]. Además, la MMAd ha demostrado su capacidad para modular la expresión génica de los condrocitos y mantener su fenotipo, lo que la convierte en una herramienta prometedora para el diseño de andamios bioinspirados que reproduzcan las condiciones fisiológicas del cartílago[16].

El uso conjunto de MCAd y MMAd como agentes funcionalizantes de andamios basados en fibrina ofrece una alternativa innovadora y sinérgica que puede contribuir

significativamente a superar las limitaciones actuales de las terapias regenerativas. Al incorporar simultáneamente señales específicas de la matriz de cartilago y factores bioactivos de la membrana amniótica, se espera crear un microambiente más favorable para la regeneración de tejido hialino funcional [17]. Esta aproximación biomimética tiene el potencial de promover la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como de modular el metabolismo condrocítico y favorecer la integración del nuevo tejido con el cartílago circundante. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo general diseñar, caracterizar y evaluar un andamio funcional (FCMA) basado en fibrina, matriz cartilaginosa descelularizada y membrana amniótica descelularizada, orientado a promover el mantenimiento del linaje condrogénico y la producción de componentes de la MEC de cartilago.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cartílago articular

El cartílago articular es un tejido conectivo altamente especializado que recubre las superficies óseas en las articulaciones sinoviales, formando una capa lisa y lubricada que facilita movimientos de baja fricción, y al mismo tiempo, actuar como un soporte natural que distribuye las cargas mecánicas a lo largo de la articulación [2,18].

El cartílago está formado por células especializadas llamadas condrocitos, los cuales se encuentran distribuidos de manera dispersa dentro de una matriz extracelular (MEC) densa [19], compuesta principalmente por una red de fibrillas de colágeno tipo II, que mantienen la integridad del tejido y le proporcionan resistencia tensil, y proteoglicanos como el agregano, que confieren rigidez compresiva al retener moléculas de agua en su estructura [2,18,20]. El agua atrapada entre los proteoglicanos constituye hasta un 80% del peso húmedo del tejido, esto es esencial para el comportamiento viscoelástico bifásico que permite al cartílago soportar cargas y disipar energía durante actividades cíclicas [21,22].

Los condrocitos son las únicas células presentes en este tejido, son responsables de la síntesis y mantenimiento de la MEC mediante la síntesis y secreción continua de proteoglicanos y colágeno tipo II [23]. Para conservar la homeostasis tisular, equilibran procesos anabólicos y catabólicos en respuesta a las señales bioquímicas y mecánicas del entorno [24]. Además, muestran heterogeneidad fenotípica a lo largo de las diferentes zonas del cartílago, adaptándose a las particularidades de presión, fricción y composición del líquido sinovial en cada región [25,26].

Esta compleja sinergia entre la composición de la MEC y la actividad de los condrocitos se refleja en una arquitectura tisular muy particular, donde variaciones en la densidad celular, la orientación de las fibrillas de colágeno y la distribución de proteoglicanos dan lugar a capas con funciones mecánicas y metabólicas diferenciadas.

2.1.1. Condrocitos

Los condrocitos son el único tipo celular residente en el cartílago articular y desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento, la organización y la integridad funcional de

este tejido conectivo altamente especializado. Son responsables de la síntesis y remodelación de la MEC, compuesta principalmente por fibrillas de colágeno tipo II y grandes agregados de proteoglicanos como el agregano [2,27]. Estos componentes confieren al cartílago su capacidad para resistir fuerzas compresivas y soportar cargas mecánicas repetitivas en las articulaciones sinoviales, lo que permite un movimiento suave y sin dolor [2,18].

Desde el punto de vista del desarrollo, los condrocitos derivan de células madre mesenquimales (MSCs) mediante un proceso de condrogénesis regulado por factores de transcripción clave como SOX9, SOX5 y SOX6 (factor de transcripción SRY-caja 9, 5 y 6 respectivamente) [28]. A lo largo de esta diferenciación, las células adquieren una morfología redondeada, disminuyen su proliferación y comienzan a secretar componentes específicos de la MEC del cartílago [29–31].

En el cartílago maduro, los condrocitos muestran fenotipos dependientes de la zona en la que se encuentran, lo que refleja los distintos entornos biomecánicos y bioquímicos [24,25]. En la zona superficial, las células son aplanadas, secretan lubricina y contribuyen a la lubricación y resistencia al cizallamiento. En la zona media, tienen forma esférica y están distribuidas de forma aleatoria, con alta producción de proteoglicanos. En la zona profunda, se alinean en columnas y participan en la resistencia mecánica y la conexión con el hueso subcondral [31].

Los condrocitos presentan un perfil de expresión génica especializado que define su identidad y función. Entre los genes anabólicos más importantes están COL2A1 (colágeno tipo II), ACAN (agrecano), COMP (Proteína de Matriz Oligomérica del Cartílago) y PRG4 (Proteoglicano 4 o lubricina) [32]. SOX9 actúa como activador central de estos genes, manteniendo el fenotipo condrocítico y suprimiendo la diferenciación hipertrófica o fibrótica [33].

En condiciones patológicas como la osteoartritis, los condrocitos experimentan un cambio fenotípico caracterizado por la disminución de marcadores anabólicos y el aumento de enzimas catabólicas (MMP13, ADAMTS5) y citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α), lo que acelera la degradación de la MEC y conduce a la degeneración progresiva del tejido [34].

Uno de los principales retos en la ciencia es mantener el fenotipo condrocítico. En cultivos en monocapa, los condrocitos tienden a desdiferenciarse, perdiendo su morfología esférica y disminuyendo la expresión de genes específicos del cartílago [35]. Los sistemas tridimensionales, como los hidrogeles y andamios, ofrecen un entorno más fisiológico que preserva el fenotipo, favorece la deposición de matriz y mejora el potencial traslacional de los constructos generados [36].

2.1.2. Estructura del cartílago articular

En los seres humanos adultos, el cartílago suele tener un grosor de entre 2 a 4 mm, [2,37] y se organiza en zonas bien definidas, cada una con roles estructurales y funcionales específicas que, en conjunto, determinan sus propiedades biomecánicas [38,39]. Dentro del cartílago pueden distinguirse cuatro regiones principales: zona superficial, zona media, zona profunda y zona calcificada (Figura 1).

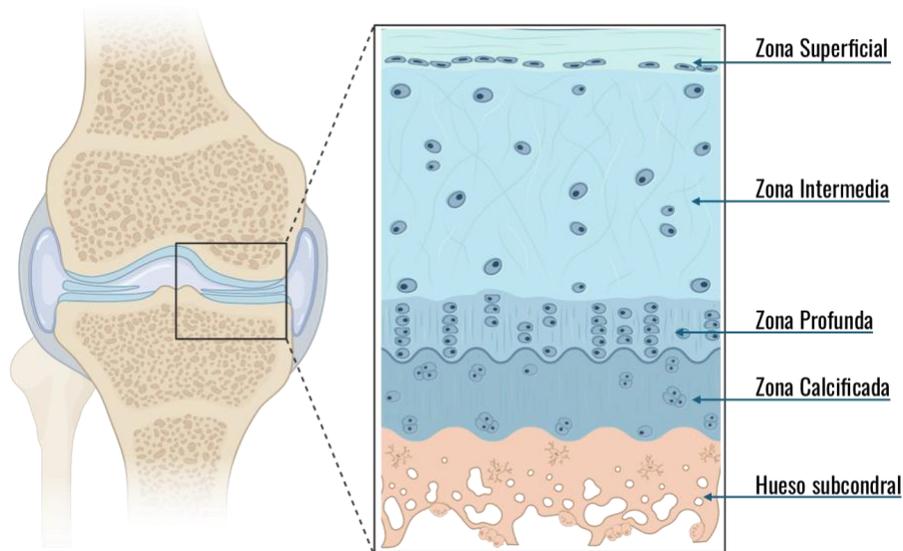


Figura 1. Estructura del cartílago articular.

2.1.2.1. Zona superficial

En la zona superficial, constituye entre el 10 y el 20% del grosor total del cartílago articular, siendo fundamental para la salud y función articular [2,40]. Esta capa está

especialmente diseñada para actuar como interfaz principal con el líquido sinovial, facilitando movimientos articulares de baja fricción y protegiendo las capas más profundas del cartílago del estrés mecánico y el desgaste que se producen durante el movimiento de las articulaciones [41,42].

Desde el punto de vista estructural, esta zona destaca por sus condrocitos aplanados y alargados, organizados paralelamente a la superficie articular [40]. Esta configuración es ideal para reducir la resistencia al movimiento durante la articulación [43]. Su morfología plana y alta densidad permiten que estos condrocitos mantengan eficazmente la suavidad e integridad de la superficie del cartílago, asegurando una interacción óptima con la capa lubricante del fluido sinovial[2,41]

La MEC de la zona superficial se caracteriza por fibras de colágeno tipo II densamente agrupadas, orientadas tangencialmente a la superficie articular [2]. Esta orientación específica proporciona una gran resistencia a las fuerzas de tracción, contrarrestando eficazmente los esfuerzos de cizallamiento durante los movimientos articulares [44]. Además, se encuentran presentes fibras de colágeno tipo IX y XI que estabilizan aún más la red fibrilar, reforzando mecánicamente la estructura del tejido [45].

El contenido de proteoglicanos, especialmente agregano, es relativamente bajo en comparación con capas más profundas, lo que facilita una rápida deformación y asegura la elasticidad necesaria para movimientos articulares fluidos [46]. A pesar de esta menor concentración de proteoglicanos, la zona superficial presenta un alto contenido de agua, alcanzando hasta el 80% de su peso húmedo, lo cual es esencial para mantener la lubricación y propiedades viscoelásticas del tejido [47].

Los condrocitos superficiales sintetizan activamente lubricantes como la proteoglicana 4 (PRG4), también conocida como lubricina, que forma una capa mucinosa rica en glicoproteínas [48]. Esta capa reduce significativamente la fricción y protege la superficie del cartílago mediante una interfase hidrofílica que interactúa eficientemente con el líquido sinovial [49]. Además, estos condrocitos producen fibronectina y proteoglicanos pequeños ricos en leucina, importantes para ensamblar la MEC y mejorar las

interacciones entre células y matriz, reforzando así la estabilidad biomecánica de esta zona [50,51].

Mecánicamente, la zona superficial presenta una alta rigidez tensil, pero una capacidad compresiva relativamente menor en comparación con capas más profundas [2,40]. Este comportamiento permite absorber y disipar eficazmente fuerzas de cizallamiento, manteniendo su integridad estructural durante el deslizamiento articular [46]. Su naturaleza viscoelástica, facilitada por la orientación del colágeno, la retención de agua y la distribución específica de proteoglicanos, hace de esta capa un excelente amortiguador que protege a las capas subyacentes frente a impactos mecánicos agudos [46,52].

La zona superficial es crucial para la mecanotransducción, ya que sus condrocitos responden activamente a estímulos mecánicos modulando la síntesis y degradación de la MEC, manteniendo así la homeostasis tisular [53,54]. Las propiedades mecanosensibles específicas de estos condrocitos son fundamentales para preservar la funcionalidad e integridad del cartílago [52], ya que las alteraciones en la integridad de la zona superficial, debido a lesiones o procesos degenerativos, están estrechamente relacionadas con el inicio de la erosión del cartílago y el desarrollo de enfermedades como la osteoartritis [47,52].

2.1.2.2. Zona media

La zona de transición, también llamada zona media, ocupa alrededor del 40–60 % del grosor del cartílago articular y actúa como un puente fundamental entre la capa superficial y las regiones más profundas [2,52]. Está diseñada, tanto en su estructura como en su función, para soportar eficazmente las cargas de compresión y permitir una transición suave de las propiedades mecánicas entre las zonas adyacentes [47].

En cuanto a sus células, los condrocitos de esta región son de forma esférica o redondeada y están menos apiñados que en la capa superficial, una adaptación que les permite resistir mayores presiones compresivas [31,52]. Su relación superficie-volumen intermedia es ideal para mantener un metabolismo equilibrado y producir MEC de forma

eficiente, garantizando que toda la profundidad del cartílago responda de manera uniforme a las fuerzas mecánicas [24,55].

La MEC de la zona de transición está formada por fibras de colágeno dispuestas de modo más aleatorio y menos compacto que en la capa superficial [52]. Esta orientación isotrópica facilita la absorción y distribución homogénea de las tensiones, especialmente las de compresión, al cargar la articulación [2,56,57].

En esta zona predomina el colágeno tipo II, con poca cantidad de los tipos IX y XI, lo que otorga a la matriz la elasticidad y resiliencia necesarias frente a la compresión [58]. El contenido de proteoglicanos, y en particular de agregano, es notablemente mayor que en la capa superficial, alcanzando su punto máximo en esta zona [21,51,52]. Al agruparse con ácido hialurónico, estas moléculas retienen grandes cantidades de agua y generan la presión osmótica que mantiene la hidratación y la capacidad de resistir fuerzas compresivas[22,59].

Desde el punto de vista mecánico, la zona de transición tiene una rigidez intermedia, sirviendo de nexo entre la flexibilidad superficial y la firmeza profunda [31,44]. Sus propiedades viscoelásticas, como la relajación de esfuerzo y la fluencia a lo largo del tiempo, son clave para dispersar energía mecánica y proteger a los condrocitos de posibles daños por carga súbita [46,52,60]. Además, los condrocitos aquí son muy sensibles a las fuerzas dinámicas: gracias a receptores como integrinas, canales iónicos y cilios primarios, convierten las señales mecánicas en respuestas bioquímicas que regulan la síntesis y la degradación de la matriz, preservando su integridad [53,61]. La zona de transición cumple el papel importante de amortiguador ante la compresión profunda, cualquier alteración en su estructura o función compromete seriamente el rendimiento del cartílago y acelera la degeneración, del tejido [47].

2.1.2.3. Zona profunda

La zona continua a la zona media es la zona profunda, también llamada zona radial, representa entre el 30 y el 40 % del grosor total del cartílago articular y es la encargada de soportar principalmente las cargas de compresión [62]. En esta región, los condrocitos se disponen en columnas verticales, perpendiculares a la superficie articular [63]. Estas células son más grandes y redondeadas que las de las zonas superficial e intermedia, y su relación superficie-volumen reducida favorece la producción masiva de MEC [31]. La alineación en columnas permite que las fuerzas de compresión se transmitan de forma directa al hueso, reforzando la estabilidad estructural [2,52].

La MEC de la zona profunda está compuesta por fibrillas de colágeno muy densas, principalmente colágeno tipo II, orientadas de manera perpendicular a la superficie articular [2,58]. Esta disposición radial brinda gran resistencia a la tracción en el eje vertical, anclando eficazmente la matriz al hueso y resistiendo la deformación por compresión[64]. Los colágenos IX y XI, en menor proporción, también colaboran en la estabilidad de las fibrillas y en su interacción con los proteoglicanos [58].

Aunque la cantidad de proteoglicanos y el porcentaje de agua en la zona profunda es menor que en la intermedia, sigue siendo alta [2,22]. El agregano, en particular, genera presión osmótica de hinchamiento esencial para la función de carga [65]. Gracias al equilibrio entre esa presión de hinchamiento y las restricciones impuestas por el colágeno radial, esta zona alcanza un módulo compresivo elevado, capaz de soportar cargas prolongadas [2,52].

A nivel mecánico, la zona profunda muestra la mayor rigidez a la compresión de todas las regiones del cartílago [66]. Su comportamiento viscoelástico se caracteriza por una baja permeabilidad, lo que mantiene la presión hidrostática dentro de la matriz al someterla a carga, mejorando la distribución de fuerzas y protegiendo a los condrocitos de tensiones extremas [46,66].

Los condrocitos de esta capa expresan genes indicativos de diferenciación hipertrófica, como colágeno tipo X, aunque en un cartílago sano la hipertrofia no se completa

[31,67,68]. Además, secretan metaloproteinasas de matriz y fosfatasa alcalina para regular la mineralización pericelular cerca de la línea de separación con el hueso, garantizando la integridad de la interfaz osteocondral [31,69]. La transición mecánica entre las zonas intermedia y profunda se mantiene gracias a la arquitectura de colágeno radial y la distribución de proteoglicanos, lo que permite un traspaso de carga sin interrupciones [70].

2.1.2.4. Zona calcificada

La zona calcificada forma la interfaz mineralizada que fija el cartílago articular al hueso subcondral, representando aproximadamente el 5–10 % de su grosor total [71]. Su arquitectura especializada ofrece una barrera rígida y de baja permeabilidad, capaz de distribuir las fuerzas de compresión hacia el hueso subyacente y, al mismo tiempo, proteger la matriz hialina superior de deformaciones excesivas [46].

Estructuralmente, esta zona se caracteriza por una MEC densamente mineralizada de cristales de hidroxapatita [72]. Las fibrillas de colágeno, son mayoritariamente de tipo II y reforzadas por los tipos IX y XI, las cuales se orientan perpendicularmente a la línea de marea o línea de demarcación calcificada (“tidemark”), formando pilares verticales que anclan el cartílago no calcificado al tejido mineralizado inferior [58,73]. La red mineralizada de colágeno confiere una gran rigidez y una permeabilidad hidráulica muy baja, esenciales para mantener la presión hidrostática durante cargas sostenidas [25,52].

En la zona calcificada, los condrocitos adquieren un fenotipo hipertrófico: son más grandes, ocupan lagunas ampliadas y expresan marcadores como colágeno X y fosfatasa alcalina, que impulsan la mineralización de la matriz [24,31,67]. Aunque son menos activos metabólicamente que los condrocitos de las capas superiores, estas células hipertróficas regulan el recambio de la matriz al secretar enzimas como MMP-13, modulando el avance de la línea de separación y manteniendo la integridad osteocondral [67,68].

La composición de la matriz en la zona calcificada difiere notablemente de la de las zonas no calcificadas, en esta zona el contenido de proteoglicanos se reduce drásticamente, limitando la presión osmótica de hinchamiento, mientras que la deposición mineral domina la masa seca [65,74]. En consecuencia, el agua presente disminuye y el flujo de líquidos a través de esta capa es mínimo, creando una barrera mecánica y bioquímica que aísla el cartílago del hueso vascularizado [22,54].

Desde el punto de vista mecánico, la zona calcificada exhibe el módulo de compresión más alto de todo el cartílago [2]. Su almacén de colágeno cargado de minerales resiste deformaciones permanentes y evita que las tensiones de cizallamiento se propaguen al hueso subcondral [75]. La baja permeabilidad asegura que la presión del fluido intersticial en la zona profunda se mantenga durante ciclos de carga prolongados, mejorando la resistencia global de la articulación [46,52].

La línea de demarcación calcificada, visible histológicamente como una línea basófila, demarca el límite entre el cartílago no mineralizado y el mineralizado [76]. La integridad de esta frontera es crucial para la coherencia biomecánica y para impedir la invasión vascular; su duplicación o irregularidad es un signo temprano de degeneración osteoarticular, a menudo acompañado por una expansión anómala de la zona calcificada [47,77].

2.2. Lesiones de cartílago articular

El cartílago articular, a pesar de ser esencial para el movimiento y protección de las articulaciones, presenta características que lo vuelven especialmente susceptible al daño. Su baja densidad celular, falta de vasos sanguíneos, nervios y sistema linfático limita el aporte de nutrientes y la eliminación de desechos, sobre todo en las zonas profundas, lo que reduce la capacidad de reparación de los condrocitos [2,18]. Además, al no contar con una irrigación adecuada, el cartílago no puede activar una respuesta inflamatoria o regenerativa efectiva después de una lesión, ya que depende únicamente de la limitada capacidad de sus células para reparar el tejido [78,79].

La organización zonal del cartílago, junto con la baja capacidad de proliferación de los condrocitos adultos, hace que incluso daños superficiales puedan desencadenar procesos degenerativos profundos y silenciosos, ya que la falta de inervación impide que se perciba dolor en etapas tempranas [43,79]. Además, factores mecánicos como la sobrecarga o la desalineación aceleran el desgaste y la degradación del tejido, llevando finalmente a la exposición del hueso subcondral [79,80].

Las lesiones del cartílago articular abarcan un amplio espectro, que va desde defectos focales, hasta cambios degenerativos progresivos, y en una etapa final dan lugar a osteoartritis [81]. Las lesiones de cartílago articular que superan los 5 mm² no se regeneran de forma espontánea, lo que implica que su tratamiento requiere considerar que estos defectos son multifactoriales y específicos del sitio anatómico afectado. Por ello, es fundamental realizar un análisis detallado de la patología subyacente y establecer una terapia individualizada para cada caso [82].

Un defecto o lesión focal de cartílago articular se define como una lesión limitada y bien delimitada en la superficie del cartílago hialino que recubre una articulación sinovial, caracterizada por la pérdida parcial o total del espesor del cartílago en un área concreta, sin comprometer inicialmente todo el compartimento articular [81,83]. Las lesiones focales suelen aparecer tras un trauma agudo o sobrecarga localizada, especialmente en personas jóvenes y activas (Kutaish et al., 2025). Habitualmente, estos daños se originan como pequeños defectos en la zona superficial, alterando el delicado equilibrio entre la presurización del fluido articular y la mecánica de la matriz, lo que resulta fundamental para una adecuada distribución de la carga [84,85]. Incluso lesiones mínimas pueden ocasionar un aumento localizado en la deformación tisular, pérdida de resiliencia viscoelástica y progresión de fisuras hacia capas más profundas [2,86]. Si estos defectos no se reparan, se convierten en puntos de concentración de estrés mecánico, lo que acelera la delaminación de la matriz y desencadena una remodelación del hueso subcondral, pasos clave en el desarrollo temprano de la osteoartritis [87].

A medida que el daño se acumula o en presencia de sobrecarga articular crónica y envejecimiento, las lesiones evolucionan de defectos focales a cambios degenerativos característicos de la osteoartritis. Este tipo de lesión refleja una interacción compleja entre

alteraciones mecánicas, mediadores inflamatorios y degradación progresiva de la matriz [88]. Desde el punto de vista histopatológico, el proceso inicia con fibrilación superficial y pérdida de proteoglicanos, avanzando hacia fisuras profundas, agrupamiento de condrocitos y, finalmente, extensión del daño hacia el cartílago calcificado y el hueso subcondral [89]. Una vez que la red de colágeno se ve comprometida, la pérdida de resistencia tensil y el aumento de la permeabilidad son irreversibles, lo que deteriora la capacidad del cartílago para absorber impactos y resistir el desgaste [90]. Además, la función de los condrocitos disminuye a medida que se reduce la actividad autofágica, lo que incrementa el estrés celular y la acción de enzimas catabólicas [34].

Las implicaciones clínicas de estas lesiones son profundas. El daño del cartílago articular se asocia estrechamente con dolor, disfunción articular y un riesgo elevado de desarrollar osteoartritis progresiva, llegando en muchos casos a la necesidad de reemplazo articular [91]. Tanto el tamaño como la profundidad de la lesión son factores críticos para el pronóstico y para definir los protocolos de rehabilitación posquirúrgica, ya que la reparación incompleta o los defectos de espesor total que persisten aumentan considerablemente el riesgo de fallo mecánico y progresión de la osteoartritis [87,92,93]. Por ello, la clasificación temprana y precisa de las lesiones no sólo orienta la intervención, sino que resulta clave para preservar la salud articular, optimizar los resultados del paciente y retrasar o evitar la necesidad de artroplastia [94].

2.3. Enfoques terapéuticos para el tratamiento de lesiones de cartílago articular

El manejo inicial de las lesiones focales del cartílago articular se basa en medidas no quirúrgicas orientadas a controlar los síntomas y preservar la función. El tratamiento inicial o primera opción terapéutica abarca la modificación de las actividades cotidianas, la fisioterapia dirigida para optimizar la biomecánica articular y el uso racional de analgésicos [95,96]. Sin embargo, el dolor persistente y los síntomas mecánicos hacen que hasta el 90 % de los pacientes termine requiriendo una intervención quirúrgica posterior [94,96,97].

Cuando los síntomas no ceden, resulta indispensable caracterizar con precisión el defecto condral. La resonancia magnética de alta resolución es el método no invasivo de referencia para determinar el tamaño, la profundidad y la afectación del hueso subcondral [98]. Por su parte, la artroscopia diagnóstica permite graduar la lesión de forma directa mediante las clasificaciones de la “International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society “ (ICRS) y, al mismo tiempo, evaluar la alineación del miembro, la estabilidad ligamentaria y la integridad meniscal [99]. Una vez que el defecto focal se ha diagnosticado y caracterizado mediante estas herramientas, se puede seleccionar el enfoque terapéutico más adecuado según su tipo y extensión.

Una vez que el defecto focal se ha diagnosticado y caracterizado mediante estas herramientas, se puede seleccionar el enfoque terapéutico más adecuado según su tipo y extensión. De acuerdo con las características del defecto y la evidencia actual, se han desarrollado diversos enfoques terapéuticos para el manejo de las lesiones focales de cartílago articular. Estos pueden agruparse en cinco categorías principales: enfoques basados en la estimulación medular, enfoques basados en reemplazo osteocondral, terapias basadas en aplicación de agentes ortobiológicos, Enfoques basados en terapia celular y estrategias basadas en biomateriales e ingeniería de tejidos.

2.3.1. Enfoques basados en estimulación medular

La estimulación medular constituye una estrategia quirúrgica fundamental para tratar defectos focales del cartílago articular, sobre todo en lesiones pequeñas y sintomáticas [100]. Este enfoque aplica técnicas que perforan el hueso subcondral generando pequeños canales, cuyo propósito es liberar células mesenquimales de médula ósea y factores de crecimiento en el área afectada [96]. La llegada de estos elementos promueve la formación de un coágulo de fibrina que sirve de andamiaje provisional para el nuevo tejido y facilita la regeneración del cartílago.

Las principales técnicas utilizadas en este enfoque son: microfractura, perforación del hueso subcondral y artroplastia por abrasión [101–103]. La microfractura se realiza por artroscopia y consiste en practicar pequeños orificios en la placa subcondral con cinceles

especializados [104]. El taladrado subcondral emplea brocas de pequeño calibre para penetrar el hueso [102], mientras que la artroplastia por abrasión remueve la capa esclerótica hasta exponer el espacio vascularizado de la médula [103,105]. Todas buscan reclutar células mesenquimales de médula ósea e inducir la regeneración del tejido [106]. En la práctica clínica, la estimulación medular está indicada en defectos de pequeño a moderado tamaño (menos de 2–4 cm²) en pacientes jóvenes y activos con articulaciones sanas. Se elige como primera opción por su carácter mínimamente invasivo, sencillez técnica y bajo costo [107]. Los mejores resultados se obtienen en lesiones agudas y bien delimitadas, donde se busca conservar la congruencia articular y lograr un alivio sintomático rápido [108]. No obstante, la eficacia disminuye en defectos voluminosos o en articulaciones con artrosis avanzada.

Entre sus ventajas destacan la facilidad de ejecución, la amplia disponibilidad y la mejora comprobada a corto plazo de dolor y función. Al realizarse por artroscopia, el periodo de recuperación es más breve que el de cirugías abiertas [109]. Su principal desventaja radica en que generalmente el tejido generado es de tipo fibrocartilago, compuesto mayoritariamente por colágeno tipo I, que carece de la resistencia mecánica y durabilidad del cartilago hialino nativo [108]. Este fibrocartilago degenera con mayor rapidez ante cargas repetitivas, y la mejoría clínica suele disminuir con el tiempo, especialmente más allá de dos años tras la intervención [86]. La técnica resulta menos eficaz en lesiones extensas o en pacientes de mayor edad, y la durabilidad a largo plazo continúa siendo un reto. Además, la variabilidad en los protocolos de rehabilitación y la falta de terapias adyuvantes estandarizadas contribuyen a la inconsistencia de los resultados [108].

2.3.2. Enfoques basados en reemplazo osteocondral

Las estrategias de reemplazo osteocondral representan un conjunto de enfoques quirúrgicos clave para tratar defectos focales del cartilago articular, sobre todo cuando la lesión alcanza el hueso subcondral o las técnicas reparadoras anteriores no ofrecen resultados [110]. El principio esencial consiste en trasplantar tejido osteocondral (cartilago articular junto con un segmento de hueso subcondral) en el sitio de la lesión

para restaurar la integridad estructural y funcional de la superficie articular [111]. Al sustituir directamente el cartílago dañado y su soporte óseo, estas técnicas buscan restablecer una superficie de cartílago hialino, lo que mejora la congruencia y la biomecánica de la articulación [112].

Las técnicas principales en ese enfoque son: el trasplante autólogo de cartílago, conocido como mosaicoplastia [111], y el trasplante alogénico de cartilago [113]. El trasplante autólogo extrae cilindros de cartilago sano de áreas que no soportan carga en la misma articulación del paciente y los coloca en la zona del defecto, de modo que se consigue un relleno preciso con cartílago y hueso viables [114]. En cambio, el trasplante alogénico emplea tejido de donantes para tratar lesiones más grandes o complejas que no se pueden resolver con autoinjertos, lo que elimina las limitaciones de los sitios donantes y permite intervenir zonas extensas [115]. Estas técnicas resultan indicadas para lesiones focales de cartílago que afectan al hueso subcondral, defectos de tamaño intermedio o grande y casos en que han fracasado métodos reparadores previos [116]. También se consideran en pacientes con alta demanda funcional (por ejemplo, deportistas jóvenes) que necesitan durabilidad y recuperación de la función articular. El trasplante autólogo resulta más adecuado cuando la lesión mide menos de 2–3 cm², dada la disponibilidad limitada de tejido propio, mientras que el alogénico se reserva para áreas más extensas, profundas o de múltiples superficies [113,115–117].

Entre las ventajas destaca la restauración inmediata del cartílago hialino y la arquitectura ósea subcondral, lo cual favorece la mejora rápida de la función articular y la integración duradera del injerto [118]. El trasplante alogénico amplía las posibilidades de tratamiento sin generar morbilidad en el sitio donante, lo que retrasa o evita la necesidad de prótesis en pacientes jóvenes [113,117]. No obstante, estos métodos presentan desventajas importantes. El trasplante autólogo conlleva riesgo de morbilidad en el área donante, disponibilidad limitada de injertos y retos técnicos para lograr una buena integración del tejido. El injerto alogénico implica peligro de transmisión de enfermedades, rechazo inmunológico y viabilidad variable del injerto según los métodos de preservación. Ambos pueden sufrir integración incompleta o fracaso a lo largo del tiempo y la densa matriz

extracelular del cartílago trasplantado puede dificultar la incorporación biológica con el tejido nativo [90].

2.3.3. Enfoques basados en terapia celular

Los enfoques basados en terapia celular surgen como estrategias innovadoras y prometedoras para el tratamiento de defectos focales de cartílago articular. Estas técnicas parten de la idea de emplear células vivas, como condrocitos o células madre mesenquimales, para regenerar el cartílago dañado y recuperar su función normal [112]. Al introducir células capaces de sintetizar nueva matriz de cartílago directamente en la lesión de cartílago, se pretende generar un tejido de reparación que se asemeje al cartílago hialino nativo [112,119].

El implante autólogo de condrocitos constituye uno de los procedimientos más consolidados en terapia celular [120]. Este método exige obtener una pequeña muestra de cartílago sano de una zona no sometida a carga de la articulación. A continuación, los condrocitos se expanden en el laboratorio y luego se reimplantan en el defecto de cartílago. Las células implantadas generan nueva matriz de cartílago en el defecto y promueven la reparación [121].

Las células madre mesenquimales han atraído gran interés como fuente para la reparación de cartílago. Estas células multipotentes se aíslan de médula ósea, tejido adiposo o sinovial y pueden diferenciarse en condrocitos, además de secretar factores de crecimiento y moléculas antiinflamatorias que favorecen la regeneración de cartílago [122,123]. Las CMM pueden inyectarse directamente en el defecto, administrarse en la articulación o combinarse con andamiajes y adyuvantes biológicos, como plasma rico en plaquetas, para potenciar su acción reparadora [124,125].

La terapia celular se aplica sobre todo en defectos sintomáticos que no han respondido a procedimientos reparadores más sencillos [126]. Resulta especialmente idónea en pacientes jóvenes y en lesiones de tamaño medio a grande, así como en quienes priorizan la preservación articular. Este enfoque se utiliza para reparar defectos mayores de 2 cm², particularmente tras el fracaso de tratamientos anteriores [126,127].

Entre las principales ventajas de este enfoque figura la capacidad de generar un tejido de reparación cuya composición y propiedades mecánicas se acercan a las del cartílago hialino sano [128]. Los estudios clínicos muestran mejoras significativas en el alivio del dolor, la función articular y la satisfacción general, especialmente en lesiones complejas o de gran tamaño (Kutaish et al., 2025a). Las CMM aportan además un efecto modulador sobre la inflamación articular y estimulan los mecanismos endógenos de reparación [122,123,125]. Pese a estos beneficios, existen limitaciones importantes. Para el implante de células requieren dos intervenciones quirúrgicas separadas, una para la obtención de las células y otra para su implantación, lo que aumenta los costos y prolonga los periodos de rehabilitación [129]. También existe riesgo de complicaciones, como sobrecrecimiento del injerto, delaminación y problemas en el área donante. Los resultados de las terapias con células madre dependen de factores como la edad del paciente y el estado de la articulación. Además, persisten retos en la estandarización de las preparaciones celulares, la aprobación regulatoria y la acumulación de datos sólidos de seguridad y eficacia a largo plazo [122,128,130].

2.3.4. Enfoques basados en aplicación de agentes ortobiológicos

Las terapias ortobiológicas constituyen un campo dinámico y en expansión en la reparación de defectos focales de cartílago articular. Estos métodos se basan en la administración de sustancias biológicas, como factores de crecimiento o citocinas, para potenciar la propia respuesta curativa del organismo y regular el entorno inflamatorio local [131,132].

Los agentes ortobiológicos más utilizados en la práctica clínica son el PRP, el ácido hialurónico (HA) y el concentrado de aspirado de médula ósea [131,132]. El PRP se obtiene concentrando plaquetas de la sangre del paciente y depositándolas en la articulación o directamente en el defecto de cartílago. Estas plaquetas liberan un cóctel de factores de crecimiento y moléculas antiinflamatorias que estimulan la actividad de los condrocitos y la producción de matriz de cartílago, al tiempo que alivian el dolor ([133–135]. El HA, componente esencial del líquido sinovial, se administra por vía intraarticular para mejorar la lubricación, reducir la fricción y ofrecer un soporte que favorece la

migración celular y la síntesis de matriz [136,137]. El concentrado de aspirado de médula ósea procede de una muestra de médula ósea y contiene células madre mesenquimales, plaquetas y diversos factores de crecimiento; su aplicación en el defecto combina soporte celular y molecular para la reparación de cartílago [138–140].

Estas terapias muestran indicación en defectos de tamaño pequeño a moderado, sobre todo en etapas tempranas o intermedias de degeneración. Convienen a pacientes que no son candidatos ideales a cirugía invasiva o que desean posponer procedimientos más agresivos. También resultan útiles como complemento a técnicas quirúrgicas, por ejemplo, microfractura, con el fin de mejorar la calidad del tejido de reparación [107,141]

Entre sus virtudes destacan el carácter mínimamente invasivo y la posibilidad de realizarse de forma ambulatoria con un tiempo de recuperación reducido. Tanto el PRP [135] como el HA [142] proceden de fuentes autólogas o totalmente compatibles, lo que minimiza las reacciones inmunológicas. Los estudios clínicos han evidenciado disminución del dolor, mejora de la función articular y, en ocasiones, formación de tejido similar al cartílago nativo [132,142]. Además, las inyecciones ortobiológicas se pueden repetir según la respuesta de cada paciente [131].

No obstante, estas terapias presentan limitaciones. El tejido nuevo suele ser fibrocartílago, carente de la resistencia mecánica y durabilidad del cartílago hialino. Los resultados clínicos varían según la edad del paciente, el tamaño del defecto y el grado de degeneración articular [112,141]. La falta de estandarización en la preparación y administración de productos como PRP y BMAC provoca diferencias en los resultados entre centros. Además, la evidencia a largo plazo sobre la capacidad de regeneración sostenida es aún limitada y no todos los pacientes alcanzan la misma mejoría [143].

2.3.5. Enfoque basado en Ingeniería de tejidos y biomateriales

Los biomateriales y las estrategias de ingeniería de tejidos constituyen algunos de los avances más innovadores en el tratamiento de defectos focales de cartílago articular. Estos métodos parten del diseño y uso de andamiajes, hidrogeles y materiales compuestos que buscan reproducir la estructura y función del cartílago nativo. El objetivo

consiste en crear un entorno que facilite la adhesión, proliferación y diferenciación de células, con el fin de guiar la formación de nuevo tejido de cartílago [144,145]

Las técnicas principales incluyen el implante de andamiajes acelulares y de andamiajes sembrados con células. Los andamiajes acelulares suelen elaborarse con polímeros biocompatibles, como colágeno, HA o materiales sintéticos (por ejemplo, poliácido láctico-co-glicólico) [144,146]. Estos andamiajes pueden emplearse solos o junto con moléculas bioactivas, de modo que las células reparadoras propias migren al defecto y comiencen a producir nueva matriz de cartílago [144]. En los andamiajes sembrados se incorporan condrocitos o células madre mesenquimales y, a menudo, se añaden agentes biológicos como PRP para mejorar la viabilidad celular y la diferenciación condrogénica [147].

Los enfoques más avanzados emplean hidrogeles y constructos compuestos que ofrecen propiedades mecánicas y bioquímicas personalizables. Los hidrogeles, elaborados con polímeros naturales o sintéticos, proporcionan un entorno tridimensional hidratado muy similar a la matriz de cartílago [144,148,149]. Estos soportes admiten factores de crecimiento, células madre o ambos, con el fin de favorecer la retención celular y la regeneración dirigida de tejido [7,150]. También se investigan andamiajes de tejido descelularizado, como los derivados de placenta humana, por su capacidad para facilitar la adhesión de células madre y su diferenciación hacia condrocitos [151].

Estas técnicas resultan adecuadas para defectos de cartílago de tamaño medio a grande, sobre todo cuando los tratamientos previos han fracasado o se requiere regeneración de alta calidad [13]. La ingeniería de tejidos también ha demostrado utilidad en casos en que las terapias celulares tradicionales o el reemplazo osteocondral no son viables debido al tamaño, la ubicación o la complejidad del defecto [152].

Entre las ventajas destacan la capacidad de personalizar la composición y la arquitectura del andamiaje, lo que ofrece apoyo específico para el crecimiento celular y la formación de la matriz. Cuando se combinan con células y factores de crecimiento, estos constructos pueden generar una regeneración de cartílago más organizada y duradera que los métodos convencionales [153]. Con este enfoque, la versatilidad de estos

materiales permite adaptarlos a defectos de distintas formas y tamaños, ampliando las opciones de tratamiento [10,153].

Sin embargo, existen desafíos significativos. La complejidad en la fabricación de andamiajes y los requisitos regulatorios pueden limitar su adopción clínica [154]. Además, los datos a largo plazo sobre la integración, durabilidad mecánica y resultados funcionales todavía son escasos. Algunos andamiajes no reproducen con exactitud las propiedades bioquímicas y mecánicas del cartílago nativo, lo que puede afectar la calidad del tejido de reparación [1]. Además, la necesidad de técnicas quirúrgicas especializadas y cuidados postoperatorios específicos puede plantear barreras logísticas en ciertos entornos clínicos.

2.4. Ingeniería de tejidos para la regeneración de cartílago articular

La ingeniería de tejidos de cartílago articular surge como una respuesta necesaria ante uno de los mayores desafíos clínicos: la escasa capacidad que tiene este tejido para repararse por sí mismo [16,155]. Ante esta limitación, los andamios desarrollados a partir de biomateriales se han convertido en una pieza clave, ya que imitan tanto la estructura como la composición bioquímica de la MEC del cartílago sano, creando un entorno que favorece su regeneración [153]. Estos andamios están pensados para ofrecer un soporte adecuado que reproduzca las condiciones mecánicas y biológicas del tejido original [156]. Gracias a ello, el diseño de biomateriales avanzados se ha transformado en un esfuerzo conjunto que une conocimientos de la ingeniería de tejidos, la ciencia de materiales y la medicina regenerativa.

Las particularidades del cartílago articular, como su falta de vasos sanguíneos y la baja densidad celular, hacen indispensable el uso de andamios cuidadosamente diseñados para que la reparación sea realmente efectiva [16,36]. Estos deben ser capaces de enfrentar retos importantes, como permitir el paso de nutrientes y la eliminación de desechos celulares, funciones que en un tejido tan poco irrigado no se dan con facilidad [157]. Además, deben ofrecer las condiciones necesarias para que las células se adhieran, se multipliquen y se diferencien adecuadamente, incluso en un entorno

sometido a fuerzas mecánicas constantes [149]. Por eso, lograr una combinación equilibrada de propiedades físicas, químicas y biológicas en el diseño del andamio es clave para recrear un ambiente propicio que impulse la reparación del cartílago (Rojas-Murillo et al., 2022).

Para que un biomaterial sea verdaderamente eficaz en la ingeniería del cartílago, debe cumplir con una serie de requisitos fundamentales: ser biocompatible, biodegradable de forma controlada, poseer integridad mecánica y, además, favorecer la diferenciación condrogénica [158]. La biocompatibilidad es clave para evitar respuestas inmunológicas adversas y, al mismo tiempo, permitir que las células sobrevivan y se multipliquen con normalidad [159]. Por otro lado, el ritmo de degradación del material debe estar cuidadosamente ajustado al de la formación del nuevo tejido, para que el andamio proporcione soporte cuando es necesario y desaparezca cuando ya no lo es, sin interferir en el proceso regenerativo [160]. Además, debe presentar propiedades físicas como viscoelasticidad y rigidez compresiva que se asemejen a las del cartílago natural [144]. Incorporar señales bioactivas dentro del andamio también puede marcar la diferencia, ya que potencia su capacidad para guiar la regeneración del tejido [146].

Las propiedades mecánicas juegan un papel crucial, ya que estos andamios deben soportar las fuerzas propias de una articulación en movimiento y, al mismo tiempo, transmitir estímulos mecánicos a las células, algo esencial para su correcto funcionamiento [144]. Por eso se espera que los materiales tengan una buena resistencia a la compresión y se comporten de forma viscoelástica, replicando así la función de soporte de carga del cartílago sano [20,161]. En muchos casos, incluso se diseñan con gradientes mecánicos que imitan la organización zonal del cartílago articular. Estos gradientes no solo refuerzan la estructura del andamio, sino que también influyen directamente en el comportamiento celular y en la formación de nueva MEC [17]. Por tanto, afinar las características mecánicas es esencial tanto para la maduración del constructo en laboratorio como para su desempeño funcional dentro del cuerpo.

Otro aspecto que no puede descuidarse es la biodegradabilidad del andamio. Esta debe ser cuidadosamente controlada para que el material se degrade en sincronía con la formación del nuevo cartílago, transfiriendo de forma gradual la carga mecánica al tejido

en desarrollo. Este equilibrio evita que el soporte desaparezca antes de tiempo o que el andamio permanezca más allá de lo necesario, lo que podría generar reacciones no deseadas [162]. Para lograr esta degradación a medida, se puede jugar con la química de los polímeros y el grado de entrecruzamiento del material, obteniendo perfiles de degradación personalizados [163]. Así, una biodegradabilidad bien regulada se convierte en un factor clave para asegurar una regeneración eficiente y sin complicaciones inflamatorias.

La porosidad del andamio y su arquitectura tridimensional también son factores determinantes en su efectividad [164]. Una red de poros interconectados favorece la difusión de oxígeno y nutrientes y permite la eliminación de los desechos celulares, algo vital en un tejido sin irrigación como el cartílago [165]. Además, tanto el tamaño como la distribución de estos poros influyen en la migración celular, la deposición de nueva matriz y la integración con el tejido circundante [164]. La combinación de poros grandes y pequeños actúa de forma sinérgica, creando un entorno más favorable para la regeneración. Por eso, el control preciso de esta arquitectura interna, que hoy en día se logra mediante tecnologías como la impresión 3D, resulta fundamental para el éxito del andamio [166].

Finalmente, la superficie del andamio también desempeña un papel esencial en cómo las células interactúan con él [167]. Características como la topografía, la rugosidad o la presencia de grupos químicos específicos pueden mejorar la adhesión celular y activar señales que orienten la diferenciación hacia el linaje condrogénico [168]. Por ejemplo, al añadir péptidos que imitan al colágeno u otras secuencias bioactivas en la superficie del andamio, se ha observado una mayor adhesión de los condrocitos y una mayor producción de matriz extracelular de cartilago [169]. Además, una microarquitectura superficial que imite las señales naturales de la MEC puede mejorar la integración del andamio con el cartílago ya existente [170].

La elección del biomaterial es un aspecto fundamental en la fabricación de andamios para la reparación de defectos focales del cartílago articular, ya que de sus propiedades dependerá la capacidad del andamio para integrarse con el tejido huésped, soportar las cargas articulares, y favorecer la actividad celular necesaria para regenerar la matriz

cartilaginosa. Un material mal seleccionado puede desencadenar respuestas inflamatorias, degradarse demasiado rápido o no proporcionar el entorno adecuado para que las células sobrevivan y se diferencien. Por ello, seleccionar biomateriales que imiten las características estructurales, mecánicas y bioquímicas del cartílago natural es clave para lograr una regeneración funcional y duradera.

2.4.1. Uso de biomateriales en ingeniería de cartílago

Los biomateriales han cobrado un papel protagónico en la ingeniería de tejidos del cartílago debido a su alta biocompatibilidad y capacidad para interactuar de forma favorable con el entorno celular [153]. Materiales como la fibrina, el colágeno, el HA, la fibroína de seda y el alginato ofrecen un entorno similar al de la MEC nativa, lo que facilita la adhesión, migración y proliferación celular [171–173]. Su estructura molecular y productos de degradación suelen ser bien tolerados por el organismo, lo que los hace ideales para aplicaciones *in vivo* [173]. Además, su versatilidad permite modificar sus propiedades fisicoquímicas para adaptarlas a los requerimientos específicos del tejido cartilaginoso, como la resistencia mecánica y la velocidad de degradación.

Uno de los biomateriales más utilizados para el andamiaje en ingeniería de cartílago es la fibrina.

2.4.1.1. Fibrina

La fibrina ha emergido como un biomaterial altamente versátil y prometedor para la fabricación de hidrogeles aplicados en la reparación de defectos focales del cartílago articular [9]. Derivada de la conversión del fibrinógeno mediante trombina durante el proceso de coagulación, la fibrina forma una red tridimensional porosa que imita de manera notable la MEC del cartílago [10]. Esta estructura permite la adhesión, migración y proliferación celular, y al mismo tiempo actúa como reservorio para moléculas bioactivas y factores de crecimiento esenciales para la regeneración del tejido cartilaginoso [171].

Una de las principales ventajas de la fibrina como base de andamios es su excelente biocompatibilidad. Al tratarse de un biopolímero natural, se integra sinérgicamente al entorno fisiológico, evitando respuestas inmunes adversas y favoreciendo una regeneración ordenada [9,171]. Además, presenta una degradación enzimática controlada, principalmente mediada por la plasmina, que puede sincronizarse con la formación de nueva matriz, lo cual es crucial para lograr una sustitución funcional del tejido sin comprometer la estabilidad mecánica del implante [171,174].

Los hidrogeles de fibrina ofrecen un entorno ideal para la diferenciación condrogénica de MSCs y condrocitos. Al contener sitios de unión para integrinas y factores de crecimiento, estos andamios no solo promueven la viabilidad celular, sino que también activan vías de señalización clave que estimulan la síntesis de componentes específicos del cartílago, como colágeno tipo II, agrecano y el factor de transcripción SOX9 [175,176]. Además, su naturaleza porosa facilita el intercambio de nutrientes y desechos, condición indispensable para el mantenimiento celular y la formación de una arquitectura tisular organizada [164].

En escenarios clínicos, la fibrina se ha utilizado con éxito como matriz provisional tras procedimientos de microfractura, actuando como vehículo para células progenitoras derivadas de médula ósea [177]. Su aplicación dentro del defecto condral no solo mejora la retención celular, sino que crea un ambiente bioactivo que guía la regeneración hacia un cartílago de tipo hialino [9]. Asimismo, su empleo como adhesivo biológico, permite fijar de manera eficaz injertos y constructos celulares, asegurando la estabilidad del andamio bajo cargas articulares y favoreciendo una integración tisular más uniforme y duradera [178].

La capacidad de la fibrina para ser modificada químicamente amplía aún más su aplicabilidad. La incorporación de agentes entrecruzantes o la combinación con polímeros sintéticos, como el poliuretano, ha permitido mejorar su resistencia mecánica, ajustar su velocidad de degradación y adaptar sus propiedades al entorno dinámico de las articulaciones [171]. Estas formulaciones compuestas han demostrado replicar con mayor fidelidad las propiedades biomecánicas del cartílago nativo, incluso bajo condiciones de carga mecánica en sistemas hidrodinámicos [9].

No obstante, en muchos casos el uso exclusivo del hidrogel de fibrina no es suficiente para inducir una regeneración cartilaginosa completa y funcional. Esto ha impulsado el desarrollo de hidrogeles funcionalizados mediante la incorporación de diversos agentes bioactivos que potencian las propiedades del andamio e introducen nuevas capacidades. Un ejemplo relevante es el uso de matrices derivadas de MEC, las cuales aportan señales bioquímicas adicionales que imitan de forma más precisa el entorno nativo del cartílago y mejoran significativamente la respuesta regenerativa del tejido.

2.4.1.2. Matriz de cartílago articular descelularizado

La matriz de cartílago articular descelularizada (MCA_d) ha emergido como un biomaterial prometedor capaz de imitar la estructura, composición y señales biológicas del cartílago nativo [179]. La descelularización implica la eliminación de los componentes celulares del tejido cartilaginoso donante mediante una combinación de tratamientos físicos, químicos y enzimáticos, preservando cuidadosamente la arquitectura de la MEC, sus propiedades biomecánicas y las moléculas bioactivas [180]. Al eliminar los elementos celulares, esta estrategia reduce significativamente la inmunogenicidad, ofreciendo un andamio que puede guiar a las células madre mesenquimales (MSCs) o condrocitos hacia una regeneración efectiva de tejido cartilaginoso hialino [13].

Desde el punto de vista estructural, la MCA_d conserva la compleja composición de la MEC del cartílago hialino, incluyendo una red fibrilar densa compuesta principalmente por colágeno tipo II entrelazado con proteoglicanos como agregano, y GAGs sulfatados como condroitín sulfato y queratán sulfato [16,179] (Tabla 1). También se mantienen glicoproteínas no colágenas esenciales, como fibronectina y laminina, las cuales facilitan las interacciones célula-matriz críticas para la supervivencia celular y la remodelación de la matriz bajo cargas mecánicas fisiológica [181].

Tabla 1: Componentes Bioactivos de la Matriz de Cartílago Articular descelularizada

Tipo de Biomolécula	Biomoléculas relevantes al metabolismo de condrocitos/Cartílago	Función en el cartílago
Componentes de MEC	Colágeno tipo II, Colágeno tipo VI, Ácido hialurónico, Condroitín sulfato, Queratan sulfato, Agrecano.	Brindan soporte mecánico e integridad tisular; modulan hidratación y presión osmótica; preservan el fenotipo condrogénico.
Factores de crecimiento	TGF- β 1, IGF-1, BMPs (especialmente BMP-2), bFGF.	Promueven la proliferación condrocitaria, la condrogénesis y la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos.
Glicoproteínas de adhesión	Fibronectina, Laminina, COMP.	Favorecen la adhesión y supervivencia celular mediante interacción con integrinas; participan en la organización del citoesqueleto y en la prevención de la apoptosis condrocitaria.
Moléculas inmunomoduladoras	Decorina, Biglicano, Versicana, Integrinas (α 5 β 1, β 1).	Modulan inflamación, promueven adhesión célula-MEC, organizan la matriz circundante, mantienen la homeostasis celular y permiten la señalización mecanoquímica.
Inhibidores de proteasas	TIMP-1, TIMP-2, α 2-macroglobulina.	Inhiben MMPs, protegen la matriz cartilaginosa contra la degradación excesiva, promueven la integridad y regeneración tisular.

TGF- β 1: factor de crecimiento transformante beta 1. IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1. BMPs: proteínas morfogenéticas óseas. COMP: proteína oligomérica de la matriz del cartílago. TIMP-1: inhibidor tisular de metaloproteinasas 1. TIMP-2: inhibidor tisular de metaloproteinasas 2.

La composición de la MCA_d influye directamente en el metabolismo y la diferenciación de los condrocitos. Por ejemplo, las fibras de colágeno proporcionan sitios de unión para integrinas, favoreciendo la adhesión y orientación celular, mientras que las regiones ricas en GAGs retienen y liberan gradualmente factores de crecimiento fundamentales para la condrogénesis, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) [50,182]. Estos factores de crecimiento, naturalmente embebidos en la MEC, potencian la proliferación celular, la síntesis de matriz y el mantenimiento de un fenotipo condrocítico estable [183]. Además, colágenos menores como el tipo IX y XI contribuyen a la organización fibrilar, mejorando la capacidad del andamio para resistir las tensiones mecánicas características del cartílago articular [58].

Estudios recientes han demostrado la eficacia y versatilidad de la MCAd en diversas configuraciones de andamios. Procesos como la liofilización y la criomolienda permiten generar hidrogeles inyectables que facilitan una administración mínimamente invasiva directamente en los defectos del cartílago [184]. Asimismo, técnicas avanzadas de biofabricación, como la bioimpresión 3D, permiten la incorporación de MCAd en bioinks para crear constructos osteocondrales específicos para cada paciente con microarquitecturas controladas [185]. Los andamios híbridos que combinan MCAd con polímeros sintéticos como el polietilenglicol (PEG), o con hidrogeles naturales como la gelatina metacrilada y redes interpenetrantes de alginato-ácido hialurónico, han demostrado una mayor resistencia mecánica sin perder la actividad biológica de la MEC [13].

Investigaciones preclínicas refuerzan el potencial inmuno-evasivo y regenerativo de los andamios basados en MCAd. Li et. Al (2019) demostraron una respuesta inflamatoria mínima y una reparación efectiva de defectos cartilaginosos utilizando andamios derivados de MCAd de origen animal sin necesidad de tratamientos inmunosupresores en un modelo animal de lesión de cartilago en conejo [186]. Tian et al. (2016) reportaron resultados favorables similares utilizando MCAd derivada de cerdo, destacando su baja citotoxicidad y excelente biocompatibilidad[187].

A nivel celular, los andamios de MCAd mejoran notablemente la diferenciación condrogénica. Estudios de Almeida et al. (2016) y Liao et al (2010) mostraron que los hidrogeles que contienen MEC derivada de tejidos cartilaginosos incrementan significativamente la expresión de marcadores condrogénicos clave como SOX9 y ACAN en MSCs, promoviendo una abundante deposición de GAGs característica del cartílago hialino nativo [188,189]. Además, los andamios anisotrópicos elaborados con MCAd alinean las MSCs a lo largo de las fibrillas de colágeno nativas, recreando efectivamente la arquitectura zonal del cartílago y evitando la diferenciación hipertrófica no deseada [190].

Pese a estos hallazgos prometedores, sigue siendo fundamental optimizar los protocolos de descelularización, ya que una exposición excesiva a detergentes durante el

procesamiento puede afectar la integridad de las fibrillas de colágeno y disminuir las propiedades mecánicas del andamio [191,192]. Para superar esta limitación, se han desarrollado estrategias compuestas que incorporan agentes entrecruzantes o polímeros de soporte que ayudan a mantener la integridad estructural sin comprometer la actividad biológica ni la infiltración celular[180].

2.4.1.3. Matriz de membrana amniótica descelularizada

La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta humana, que comúnmente se desecha tras el parto, pero que destaca por sus notables propiedades biológicas y estructurales [193]. Su función natural consiste en proteger y nutrir al feto durante el desarrollo. Sin embargo, sus características intrínsecas han sido ampliamente aprovechadas en medicina regenerativa debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antifibróticas y regenerativas [194]. Estructuralmente, está compuesta por una capa epitelial, una membrana basal rica en colágeno y una capa estromal con abundantes proteoglicanos y otras moléculas propias de la MEC [195].

La descelularización de la membrana amniótica es esencial para reducir su inmunogenicidad, preservando al mismo tiempo sus propiedades beneficiosas. Este proceso implica la eliminación del material celular mediante métodos enzimáticos, detergentes y procedimientos mecánicos, asegurando la conservación de componentes estructurales y bioactivos críticos como los colágenos tipo I, III y IV, elastina, proteoglicanos y glucoproteínas [196] (Tabla 2). Estos elementos preservados proporcionan un andamio óptimo capaz de imitar el entorno nativo de la MEC, apoyando la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, todos ellos factores clave para una regeneración tisular exitosa [195,197].

Tabla 2: Componentes Bioactivos de la Matriz de Membrana amniótica descelularizada

Tipo de Biomolécula	Biomoléculas relevantes al metabolismo de condrocitos/Cartílago	Función en el cartílago
Componentes de MEC	Fibronectina, Ácido hialurónico, Proteoglicano, Laminina.	Favorecen la adhesión, diferenciación y supervivencia celular; mantienen la estructura, hidratación y función mecánica del cartílago.
Factores de crecimiento	TGFβ1, IGF-1, FGF-2 (bFGF), EGF, EGF R, PDGF-AA, HGF.	Promueven la proliferación condrocitaria, la condrogénesis y la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos.
Citoquinas	IL-10, OPG, PGE2.	OPG protege el hueso subcondral y regula el entorno osteocondral; PGE2 puede modular positivamente la diferenciación.
Quimiocinas	MCP-1, MIP-1α, MIP-1β.	Regulan la inflamación y el reclutamiento celular; participan en fases de limpieza, regeneración o daño tisular.
Inhibidores de proteasas	TIMP-1, TIMP-2, α2M, A1AT.	Inhiben la actividad de las metaloproteinasas y otras proteasas; protegen la matriz del cartílago y mantienen el equilibrio anabólico-catabólico.

TGFβ1: factor de crecimiento transformante beta 1. IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1. FGF-2 (bFGF): factor de crecimiento de fibroblastos 2 (factor de crecimiento básico de fibroblastos). EGF: factor de crecimiento epidérmico. EGF R: receptor del factor de crecimiento epidérmico. PDGF-AA: factor de crecimiento derivado de plaquetas AA. HGF: factor de crecimiento de hepatocitos. IL-10: interleucina 10. OPG: osteoprotegerina. PGE2: prostaglandina E2. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1. MIP-1α: proteína inflamatoria macrófaga 1 alfa. MIP-1β: proteína inflamatoria macrófaga 1 beta. TIMP-1: inhibidor tisular de metaloproteinasas 1. TIMP-2: inhibidor tisular de metaloproteinasas 2. α2M: alfa-2-macroglobulina. A1AT: alfa-1-antitripsina.

Una de las principales ventajas de la matriz de membrana amniótica descelularizada (MMA_d) es su capacidad para retener moléculas bioactivas y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el TGF-β y el FGF. Estas moléculas influyen significativamente en el metabolismo de los condrocitos, promoviendo la diferenciación condrogénica, potenciando la proliferación celular y favoreciendo la síntesis de matriz extracelular, procesos esenciales para la reparación del cartílago [14,193].

En los últimos años han surgido estrategias innovadoras de funcionalización de biomateriales con MMA_d, incorporando péptidos con capacidad condroinductiva o condroconductiva y moduladores bioactivos que mejoran sus capacidades regenerativas

[14]. Técnicas avanzadas de microfabricación y entrecruzamiento también han sido aplicadas para mejorar sus propiedades mecánicas, garantizando la estabilidad estructural y la compatibilidad mecánica de los andamios con el cartílago nativo bajo condiciones fisiológicas de carga [198,199].

Estudios recientes han validado la eficacia de las matrices de MMAd en la reparación del cartílago. Por ejemplo, se ha observado que la interacción entre condrocitos y andamios de MMAd favorece la sobreexpresión de genes clave responsables de la síntesis de colágeno tipo II y agregano, componentes esenciales del cartílago saludable [200,201]. Asimismo, ensayos preclínicos han demostrado una mejora en la calidad del cartílago regenerado y una mejor integración con los tejidos circundantes tras la implantación del andamio, lo cual destaca el potencial clínico de estos biomateriales [202].

A pesar de estos resultados prometedores, aún persisten diversos desafíos en la transición de los andamios de MMAd desde la investigación hacia la práctica clínica. Entre ellos se encuentran la estandarización de los protocolos de descelularización para garantizar una conservación consistente de la integridad de la MEC y de los factores bioactivos [203], la optimización de las técnicas de funcionalización del andamio y el abordaje de los aspectos regulatorios necesarios para su uso clínico [204]. Además, estudios actuales se centran en la combinación de matrices de MMAd con terapias celulares, como células madre mesenquimales, y el empleo de sistemas de liberación controlada de factores de crecimiento para potenciar aún más sus resultados terapéuticos [205].

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cartílago casi no se regenera por sí mismo, resulta imprescindible explorar nuevas terapias que no solo reparen el daño, sino que también protejan el tejido de futuras lesiones. Entre las estrategias más prometedoras destaca el uso de biomateriales combinados con células, capaces de recrear las condiciones ideales para la regeneración del cartílago articular. No obstante, lograr que estos sistemas imiten fielmente las exigencias estructurales, mecánicas y bioquímicas propias del tejido sigue siendo un reto.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* apuntan a que los hidrogeles de fibrina facilitan la reparación de zonas dañadas del cartílago, mientras que la matriz extracelular descelularizada de cartílago aporta un entorno rico en señales para reforzar la síntesis de sus componentes clave. Por su parte, la matriz extracelular descelularizada de membrana amniótica ofrece una fuente natural de factores de crecimiento que nutren a los condrocitos y estimulan la formación de MEC de cartílago.

Con base en estas observaciones, en este trabajo proponemos diseñar un andamio híbrido que combine fibrina con matrices extracelulares descelularizadas derivadas de cartílago articular y membrana amniótica. Nuestra meta es crear un andamio capaz de mantener el fenotipo condrocítico y fomentar la producción de MEC, recreando así un microambiente óptimo para la regeneración del cartílago.

4. HIPÓTESIS

El andamio generado a partir de fibrina, funcionalizado con MCA_d y MMA_d, generará un microambiente óptimo capaz de sostener la condrogénesis, preservar el fenotipo, la morfología y la distribución celular propios del cartílago, y promover la síntesis de matriz extracelular rica en colágeno tipo II y proteoglicanos, similar a la del cartílago hialino, facilitando así la reparación de lesiones focales de cartílago articular.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Diseñar, caracterizar y evaluar un andamio funcional con potencial uso en ingeniería de tejidos, a base de fibrina, combinado con matriz de cartílago articular y membrana amniótica (FCMA) que promueva el mantenimiento del linaje condrogénico y la generación de MEC de cartílago hialino en condrocitos humanos *in vitro*.

Objetivos específicos:

- I. Aislar, acondicionar y caracterizar las matrices de cartílago articular y membrana amniótica humana, así como el cultivo de condrocitos necesarios para la formulación del andamio FCMA.
- II. Determinar las concentraciones óptimas de matriz de cartílago articular, membrana amniótica humana y fibrina para la construcción del andamio FCMA, que mantengan la viabilidad de condrocitos humanos y su linaje condrogénico en condiciones de cultivo *in vitro*.
- III. Evaluar la tasa de degradación, la citocompatibilidad y la distribución celular del andamio FCMA en condiciones de cultivo con condrocitos humanos *in vitro*.
- IV. Evaluar la funcionalidad del andamio FCMA con condrocitos humanos para mantener *in vitro* la expresión de marcadores condrogénicos, así como la producción de MEC de cartílago.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

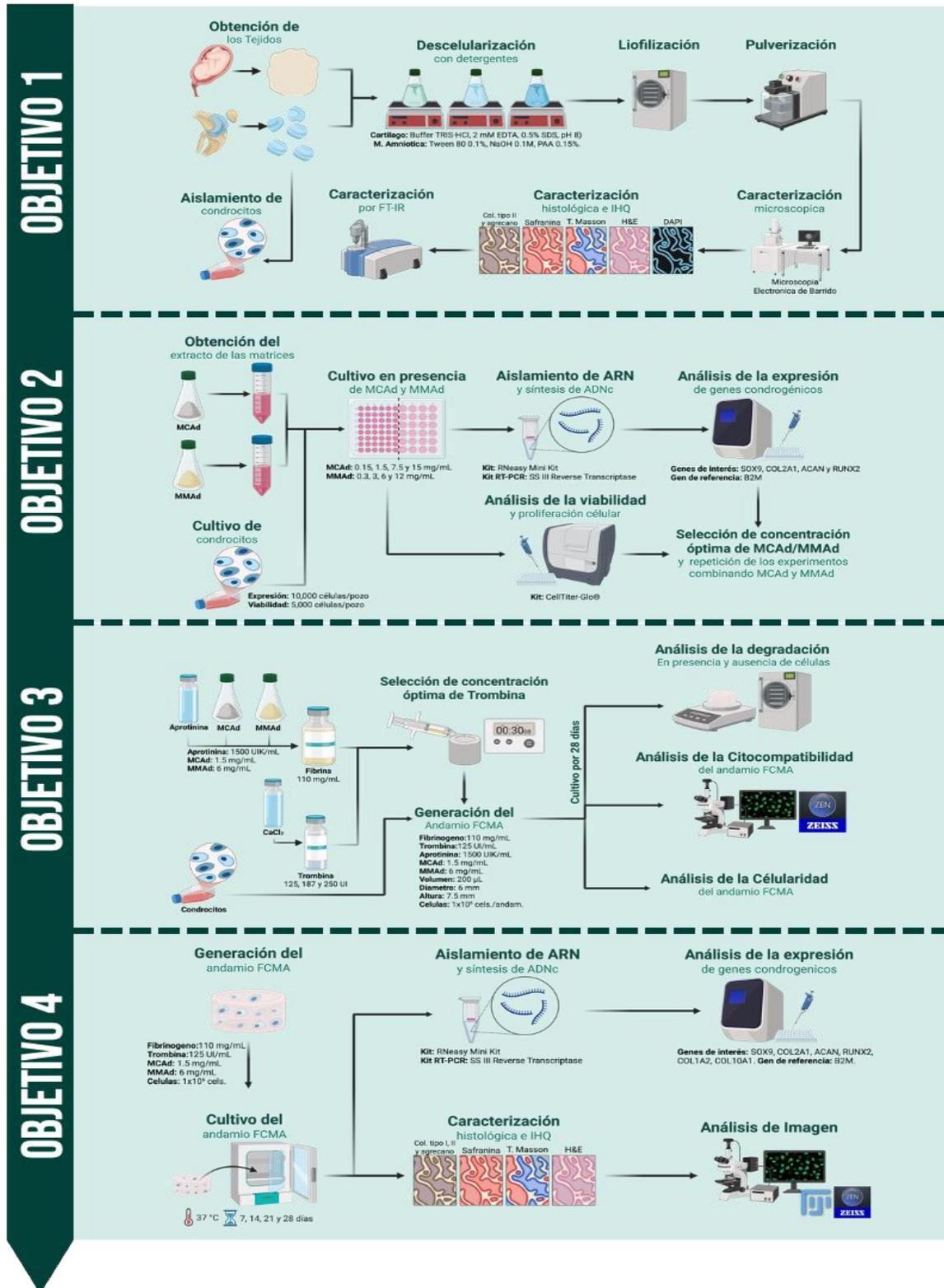


Figura 2. Estrategia experimental.

7. METODOLOGÍA

7.1. Procuración de Cartílago Humano y Preparación de la Matriz de Cartílago Articular Descelularizada (MCA_d)

Se obtuvieron láminas de cartílago articular humano (grosor = 2 mm) de donadores cadavéricos (provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la ciudad de Monterrey, N.L México) en un entorno estéril (número de aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León: BI23-001). El cartílago fue recolectado de las áreas de los cóndilos, la rótula y la tróclea femoral utilizando un bisturí No. 24 (SensiMedical, Aventura, FL, EE. UU.).

Las láminas de cartílago fueron lavadas tres veces con PBS (1X, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) suplementado con una solución Antibiótico-Antimicótica (100X, 10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B, Gibco, EE. UU.). Posteriormente, las láminas se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El protocolo de descelularización se llevó a cabo en cartílago de 20 donadores, siguiendo el procedimiento descrito previamente por [206]. Brevemente, se expusieron 205 g de cartílago articular a cinco ciclos de choque térmico en nitrógeno líquido durante 5 minutos, seguidos de un lavado con PBS (1X, Gibco, EE. UU.) durante 10 minutos. Posteriormente, el cartílago fue triturado utilizando una licuadora.

El cartílago pulverizado se lavó durante 24 horas en 10 volúmenes de un buffer hipotónico (10 mM TRIS-HCl, 2 mM EDTA, pH 8) suplementado con 100 mM de KCl (99%, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EE. UU.) y 5 mM de MgCl₂ (98%, SIGMA-ALDRICH, EE. UU.). Luego, se añadió al cartílago 10 volúmenes del mismo buffer hipotónico suplementado con 100 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂ y 0.5% de SDS (99%, SIGMA-ALDRICH, EE. UU.) durante 18 horas. Finalmente, la matriz se lavó con 10 volúmenes del buffer hipotónico suplementado con 0.5% de SDS durante 36 horas. Para eliminar los residuos de SDS, las muestras fueron enjuagadas tres veces con PBS estéril. Posteriormente, las muestras se congelaron inmediatamente a -80 °C. Se realizó un proceso de liofilización durante 24 horas para eliminar completamente el fluido intersticial, seguido de una pulverización fina utilizando un molino pulverizador K10 (Micron, Shanghái, China) y un Freezer/Mill

6870 (SPEX® SamplePrep, Metuchen, NJ, EE. UU.). La MCA_d fue esterilizada con óxido de etileno y almacenada a -80 °C hasta su uso.

7.2. Procuración de Membrana Amniótica y Preparación de la Matriz de Membrana Amniótica Descelularizada (MMA_d)

Tras obtener el consentimiento informado, se realizó la intervención quirúrgica. Se obtuvieron placentas humanas de la sala de operaciones de tococirugía (número de aprobación del Comité de Ética en Investigación: BI23-001). Las muestras fueron recolectadas y transportadas a 4 °C en tubos estériles de 50 mL con PBS que contenía una solución antibiótico-antimicótica (100X, 10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B, Gibco, EE. UU.). En un entorno estéril, y tras tres lavados con PBS, las muestras fueron cortadas en piezas de aproximadamente 1 cm² y almacenadas inmediatamente a -80 °C hasta su uso. En total, se recolectaron 30 membranas amnióticas.

El protocolo de descclularización para la membrana amniótica se realizó en las 30 membranas recolectadas (125 g), tal como fue descrito anteriormente por [207]. Brevemente, todas las membranas amnióticas pasaron por cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido (-196 °C) durante 30 minutos, seguidos de descongelación en un baño serológico (Precision Scientific Inc., Chicago, IL, EE. UU.) a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las membranas fueron tratadas con 0.1% de Tween 80 (SIGMA-ALDRICH, EE. UU.) durante 4 horas, remojadas en 0.1 M de NaOH (97%, JALMEX, Guadalajara, México) durante 1 hora, y tratadas con 0.15% de ácido peracético (PAA, 15%, Cetik, Ciudad de México) en etanol (96%, CTR, Monterrey, México). Las membranas fueron blanqueadas con NaOH 0.1 M durante 1 hora y con PAA 0.15% durante otra hora. Se aplicó un lavado final con etanol al 70% durante 1 hora para eliminar los ácidos nucleicos residuales y los fosfolípidos del tejido. Finalmente, se eliminó todo el etanol mediante lavados con PBS durante 2 horas (tres veces), y las membranas fueron almacenadas a -80 °C. Durante todo el proceso, las membranas fueron agitadas suavemente para asegurar un lavado homogéneo y minimizar el daño a la ultraestructura del tejido.

Las membranas amnióticas fueron liofilizadas durante 24 horas para eliminar completamente los líquidos, seguidas de una pulverización fina utilizando un molino pulverizador K10 (Micron, Shanghái, China) y un Freezer/Mill 6870 (SPEX® SamplePrep, Metuchen, NJ, EE. UU.). La matriz de membrana amniótica descelularizada (MMA_d) fue esterilizada con óxido de etileno y almacenada a -80 °C hasta su uso.

7.3. Análisis Histológico e Inmunohistoquímico

Tanto la MCA_d como la MMA_d fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, luego se incrustaron en bloques de parafina utilizando métodos histológicos convencionales. Posteriormente, se prepararon secciones histológicas de 4 µm y se tiñeron con diversos colorantes para distintos análisis.

Para evaluar la presencia de restos de DNA, núcleos o células en las matrices, se utilizó la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, VECTOR, Newark, CA, EE. UU.). La tinción con hematoxilina y eosina (H y E) se utilizó para examinar la histología general de las muestras. La tinción con Safranina O detectó la presencia de proteoglicanos sulfatados, mientras que la tinción con tricrómico de Masson visualizó las fibras de colágeno en la MEC). La conservación de los componentes de la MEC, como las fibras de colágeno tipo II y agregano, se analizó mediante inmunohistoquímica (IHC). Se utilizaron anticuerpos primarios anti-col II (dilución 1:400, ab34712, ABCAM, Cambridge, Reino Unido) y anti-agregano (dilución 1:100, ab3778, ABCAM, Cambridge, Reino Unido) que fueron incubados a 4 °C durante la noche. Se empleó el sistema de detección específico para ratón y conejo HRP/DAB (kit IHC de detección ABC, ab64264m, ABCAM, Waltham, MA, EE. UU.), con hematoxilina de Gill (SIGMA-ALDRICH, EE. UU.) como contracolorante. Los controles negativos para la IHC fueron muestras de cartílago articular sin el anticuerpo primario. Las imágenes se capturaron con un microscopio Olympus AX70 (Olympus, Tokio, Japón). Para el análisis, se examinaron 10 campos por cada lámina (3 láminas por tejido) para calcular el porcentaje de área positiva para el respectivo anticuerpo utilizando el software ImageJ.

7.4. Análisis del tamaño de partícula de MCA_d y MMA_d

Las muestras de MCA_d y MMA_d liofilizadas fueron recubiertas con una capa de oro y transferidas a un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JSM-6390LV, JEOL, Tokio, Japón). El tamaño de partícula fue medido mediante análisis de imágenes.

7.5. Espectroscopía FT-IR

Los perfiles espectrales por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de MCA_d y MMA_d se obtuvieron utilizando un espectrómetro PerkinElmer Frontier en un rango espectral de 400–4000 cm⁻¹. Este enfoque analítico permitió el examen detallado de la composición molecular y las características estructurales de las muestras.

7.6. Aislamiento y Cultivo de Condrocitos

Los condrocitos fueron aislados de las articulaciones de rodilla de donadores humanos saludables y donadores cadavéricos (número de aprobación del Comité de Ética en Investigación: BI23-001). Brevemente, el tejido de cartílago articular se cortó en pequeños trozos (<1 mm) y se incubó con 2.5% de tripsina (Gibco, EE. UU.) a 37 °C durante 30 minutos. Tras la eliminación de la solución de tripsina, el tejido se digirió con 2 mL de colagenasa tipo II al 0.2% (Gibco, EE. UU.) a 37 °C durante 2 horas. Las células liberadas fueron obtenidas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, y el tejido restante fue digerido una vez más durante 90 minutos. Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 (Gibco, EE. UU.) suplementado con 10% de FBS (Gibco, EE. UU.) y una solución de antibiótico-antimicótico (100X, 10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B, Gibco, EE. UU.). El medio se cambió cada 2 días. Una vez que las células alcanzaron el 80%–90% de confluencia, los condrocitos fueron utilizados para todos los experimentos posteriores. No se utilizaron condrocitos con más de 3 pasajes de cultivo.

7.7. Ensayos de Cultivo Celular *In Vitro*

El extracto soluble de la MEC descelularizada fue preparado incubando 200 mg de MCAAd o MMAAd con 2 mL de OptiMEM sin suero (Gibco, EE. UU.) a 37 °C durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, el medio fue aclarado mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos; luego, el sobrenadante fue diluido con OptiMEM al 5% de FBS a concentraciones de 15 mg/mL, 7.5 mg/mL, 1.5 mg/mL y 0.15 mg/mL de MCAAd (peso seco), como se describió en [208], y 12 mg/mL, 6 mg/mL, 3 mg/mL y 0.3 mg/mL de MMAAd (peso seco), como se describió en [209], y almacenado a -20 °C o utilizado inmediatamente.

Para los ensayos de viabilidad, se sembraron 5×10^3 condrocitos por pozo en una placa de 96 pozos con 100 μ L/pozo de OptiMEM suplementado con 5% de FBS. Después de 24 de incubación, se retiró el medio, y las células fueron tratadas con 100 μ L/pozo del medio con las diferentes concentraciones del extracto soluble de MCAAd o MMAAd. Las células fueron incubadas durante 24, 48 y 72 horas. La luminiscencia de ATP fue determinada utilizando el ensayo CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, EE. UU.) para evaluar la viabilidad. Un reactivo CellTiter-Glo (100 μ L) fue añadido a cada pozo, agitado durante 2 minutos a 300–500 rpm, e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se cuantificó utilizando un lector de placas Cytation 3 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.). El porcentaje de muerte celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$1 - \frac{\text{Luminisencia promedio del grupo tratado}}{\text{Luminisencia promedio del grupo control}} \times 100$$

7.8. Análisis de expresión de genes condrogénicos

Los condrocitos fueron sembrados en una placa de 24 pozos a 1×10^5 células/pozo con OptiMEM suplementado con 5% FBS. Después de 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con el extracto soluble a concentraciones de 15 mg/mL, 7.5 mg/mL, 1.5 mg/mL y 0.15 mg/mL para MCAAd, y 12 mg/mL, 6 mg/mL, 3 mg/mL y 0.3 mg/mL para MMAAd. Las células fueron incubadas durante 24, 48 y 72 horas. La extracción de ARN se realizó utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, MD, EE. UU.) según el protocolo del fabricante.

La transcripción reversa del ARN total a cDNA de una sola cadena se completó utilizando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión génica se analizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.). Las sondas TaqMan (Applied Biosystems), incluyeron varios genes diana: Beta-2 microglobulina (B2M: control endógeno; ID: Hs99999907_m1), agregano (ACAN; ID: Hs00153936_m1), SRY (factor de determinación sexual Y)-box 9 (SOX9; ID: Hs00165814_m1), colágeno tipo II (COL2A1; ID: Hs00156568_m1) y RUNX2. Los datos de 3 muestras se evaluaron como niveles de ARNm en triplicado. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se utilizó para calcular la expresión relativa (RQ) de cada gen diana.

7.9. Generación del andamio FCMA

Los andamios FCMA fueron fabricados mediante la combinación de un sellador de fibrina comercial (Tisseel, Baxter, Reino Unido) con MCAd y MMAd. En primer lugar, se disolvieron 220 mg de polvo de fibrinógeno en 1 mL de solución de aprotinina (1500 UI/mL) a 37 °C bajo agitación suave hasta lograr su completa solubilización. Posteriormente, se añadieron condrocitos articulares humanos (2×10^7 células), previamente suspendidos en 50 μ L de PBS, a la solución de fibrinógeno con aprotinina, mezclándose cuidadosamente hasta obtener una suspensión homogénea. A esta mezcla se incorporaron 1.5 mg de MCAd y 6 mg de MMAd, y se agitaron suavemente para asegurar una distribución uniforme de las matrices.

En paralelo, se reconstituyeron 250 UI de trombina en 1 mL de solución de cloruro de calcio (0.44 μ mol) a 37 °C. Tanto la suspensión de fibrinógeno con células y matrices como la solución de trombina con cloruro de calcio fueron cargadas en las dos cámaras de un sistema de doble jeringa y coextruídas en proporción 1:1 en moldes personalizados (volumen final de 200 μ L). Los constructos se dejaron polimerizar a 37 °C hasta completar la gelación y posteriormente se enjuagaron con PBS. Finalmente se sembraron 1×10^5 condrocitos sobre la superficie del andamio. Se dejaron en cultivo por 24 horas en una

placa de 96 pozos para permitir que los condrocitos se adhirieran a la superficie del andamio y posteriormente se transfirieron a placas de 48 pozos.

7.10 Evaluación Microscópica del Andamio FCMA

Para la evaluación de la microestructura de los andamios, las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% y tetróxido de osmio al 1%. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y deshidratadas mediante una serie de tratamientos con alcohol en concentraciones crecientes. A continuación, los andamios se secaron mediante el punto crítico con CO₂ y se recubrieron con una capa de oro. Finalmente, se examinaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido.

7.12 Evaluación de la Estabilidad del andamio FCMA en Cultivo

La degradación de los hidrogeles fue evaluada en cuatro grupos experimentales: andamio de fibrina, andamio de fibrina con condrocitos, andamio FCMA y andamio FCMA con condrocitos. Muestras por triplicado de cada grupo fueron liofilizadas y pesadas para determinar su peso seco inicial (W_i).

Posteriormente, los andamios frescos de igual masa fueron transferidos a placas de 24 pozos e incubados en 1.5 mL de medio DMEM/F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. En los días 7, 14, 21 y 28, los andamios fueron lavados cuidadosamente con agua destilada, liofilizados y pesados para obtener el peso seco residual (W_t). La degradación se calculó como el porcentaje de pérdida de masa según la siguiente fórmula:

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100$$

7.13 Evaluación de la Citocompatibilidad, viabilidad celular y celularidad del andamio.

La citocompatibilidad *in vitro*, la viabilidad celular y la celularidad fueron evaluadas para los andamios de fibrina (control) y los andamios FCMA en los días 1, 7, 14, 21 y 28. En

cada punto de tiempo, los andamios fueron incubados con el kit LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante adaptado para constructos tridimensionales. Brevemente, se diluyeron 2 µL de la solución madre de etidio homodímero-1 (Homodimero D1) en 5 mL de PBS, y posteriormente se añadieron 2.5 µL de Calceína AM. Los andamios fueron sumergidos en esta solución de tinción durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

Tras la tinción, las muestras fueron embebidas en medio O.C.T. (Tissue-Tek®), y realizaron cortes de 8 µm de grosor utilizando un criostato. Las secciones fueron montadas con un medio de montaje acuoso para microscopia de fluorescencia y analizadas mediante microscopía de fluorescencia para visualizar las células vivas (verde) y muertas (rojo).

El análisis cuantitativo se realizó utilizando el software ZEN Blue (Zeiss). Para cada andamio a un respectivo tiempo se analizaron tres muestras independientes; de cada muestra se obtuvieron diez cortes, y en cada corte se capturaron diez campos aleatorios. El número total de células se determinó mediante el conteo de las señales fluorescentes verde y roja. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de células vivas respecto al número total de células. La celularidad se expresó como el número absoluto de células vivas por campo.

7.14 Evaluación del mantenimiento del linaje condrogénico

La expresión de genes condrogénicos fue evaluada en andamios de fibrina y andamios FCMA sembrados con condrocitos articulares humanos. Los constructos fueron preparados como se describió previamente y mantenidos en DMEM suplementado con 5 % de suero fetal bovino. En los días 7, 14, 21 y 28, se recolectaron tres andamios por grupo y se sumergieron inmediatamente en RNAlater (Invitrogen) para estabilizar el ARN. Antes de la extracción, las muestras se retiraron del RNAlater, se enjuagaron brevemente con PBS frío para eliminar el exceso de reactivo y posteriormente se pulverizaron en condiciones refrigeradas. El ARN total fue extraído utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Germantown, MD, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y pureza del ARN se evaluaron por espectrofotometría mediante la relación A260/A280.

La síntesis de ADNc de cadena sencilla se realizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), conforme a las instrucciones del proveedor. La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE. UU.) empleando sondas Applied Biosystems™ TaqMan® Gene Expression Assays para los siguientes genes: B2M (Hs99999907_m1), ACAN (Hs00153936_m1), SOX9 (Hs00165814_m1), COL2A1 (Hs00156568_m1), RUNX2 (Hs01047973_m1), COL1A2 (Hs00164099_m1) y COL10A1 (Hs00166657_m1). Cada reacción de 10 µL contenía 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems), 0.5 µL de la sonda correspondiente, 1 µL de ADNc diluido (equivalente a 100 ng de ADNc) y 3.5 µL de agua libre de nucleasas. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, junto con controles negativos sin plantilla.

El análisis de datos se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizando la expresión de cada gen blanco con respecto a B2M y expresando los resultados de manera relativa al grupo control de fibrina correspondiente a cada día.

7.15 Evaluación de la Producción de Elementos de la Matriz Extracelular (MEC) en el Andamio

Los análisis histológicos e inmunohistoquímicos se realizaron en andamios de fibrina y andamios FCMA sembrados con condrocitos, en los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo. En cada punto de tiempo, se recolectaron tres andamios por grupo, se lavaron brevemente con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, fueron deshidratados mediante una serie creciente de diluciones de etanol y embebidos en parafina siguiendo métodos estándar. De cada bloque se obtuvieron cortes de 6 µm de grosor en un micrótopo, los cuales fueron montados en portaobjetos.

Para evaluar la morfología general, la localización y distribución celular dentro del andamio, las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. El contenido de proteoglicanos fue visualizado mediante tinción con Safranina O, mientras que el contenido de colágenos se evaluó mediante la tinción tricrómica de Masson. Las láminas fueron deshidratadas, aclaradas y cubiertas con cubreobjetos antes de su análisis microscópico.

Para evaluar la producción de matriz extracelular, se realizó inmunohistoquímica dirigida a marcadores de cartílago hialino—colágeno tipo II y agregano—y al marcador de fibrocartílago colágeno tipo I. Las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a recuperación antigénica en buffer TRS (pH 6.0) a 95 °C durante 20 minutos. La actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 0.3 % en metanol durante 30 minutos. Luego, las láminas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 5 % durante una hora a temperatura ambiente, y posteriormente incubadas toda la noche a 4 °C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-colágeno tipo II (1:400; ab34712, Abcam), anti-agregano (1:100; ab3778, Abcam) o anti-colágeno tipo I (1:200; ab34710, Abcam). La detección se realizó utilizando el kit Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (ab64264, Abcam), siguiendo las instrucciones del fabricante, y las secciones fueron contra-teñidas con hematoxilina de Gill. Los controles negativos fueron procesados omitiendo el anticuerpo primario.

Todas las secciones teñidas se analizaron bajo microscopía de fluorescencia en un microscopio Olympus AX70, utilizando parámetros de exposición idénticos. Para cada andamio se analizaron 10 laminillas, con 3 cortes por laminilla, y en cada corte se capturaron 10 campos aleatorios, para un análisis exhaustivo de cada muestra. La tinción positiva se cuantificó utilizando el software ImageJ (versión 1.54g), aplicando un umbral de señal DAB y dividiendo el área positiva entre el área total del tejido. Adicionalmente, se calculó el Histscore (H-score) para cada marcador, con el fin de combinar la intensidad y la frecuencia de tinción. En cada campo, las células fueron clasificadas según la intensidad de tinción (0 = sin tinción, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = intensa) y se registró el porcentaje de células en cada categoría (P_0 – P_3). El H-score se calculó con la siguiente fórmula:

$$H - score = (1 \times P_1) + (2 \times P_2) + (3 \times P_3)$$

8. RESULTADOS

8.1. Obtención de las matrices descelularizadas y pulverizadas

Después de los procesos de descelularización, liofilización y pulverización, se obtuvieron dos tipos de polvo con características visuales distintas: un polvo fino de color blanquecino (MCAd, Figura 2A) y un polvo aparentemente más grueso de color amarillento (MMAd, Figura 2D). Además, se evaluó la estructura microscópica mediante MEB. Ambas matrices presentaron una estructura porosa con diferentes tamaños de partícula. Posteriormente, se realizó un análisis de imágenes obtenidas por MEB (Figuras 2B y 2C para la matriz de cartílago y 2E y 2F para la matriz de membrana amniótica) para determinar el tamaño de las partículas. La MCAd presentó un rango de tamaños de partícula de 1.6 a 600 μm , mientras que la MMAd presentó un rango de 0.3 a 1700 μm .

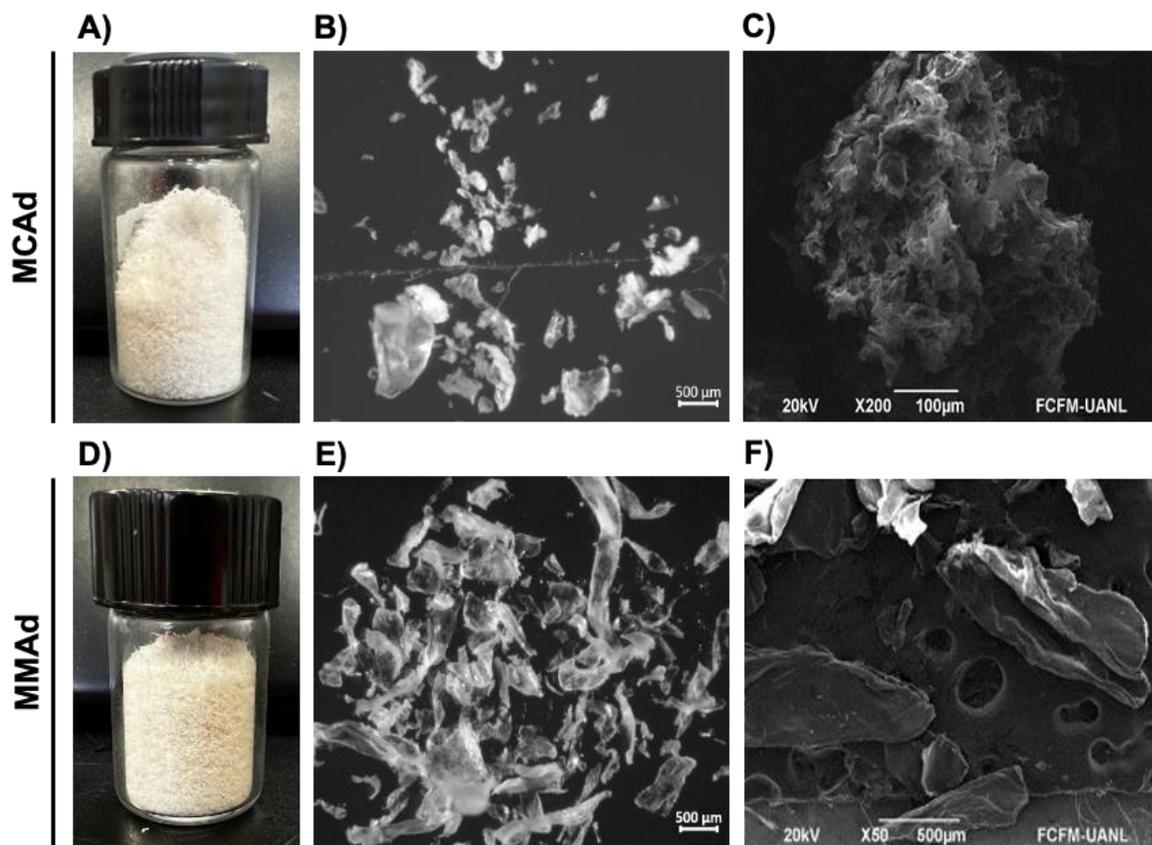


Figura 3. Descripción macroscópica y microscópica de MCAd y MMAd. (A) Fotografía macroscópica de MCAd; (B) Imagen de micrografía electrónica de barrido a 50 \times de MCAd; (C) Imagen de micrografía electrónica de barrido a 20,000 \times de MCAd; (D) Fotografía macroscópica de MMAd; (E) Imagen de micrografía electrónica de barrido a 200 \times de MMAd; (F) Imagen de micrografía electrónica de barrido a 2000 \times de MMAd.

8.2. Eliminación de células mediante el proceso de descelularización

Diseñar un biomaterial derivado de tejido biológico para su implantación en el cuerpo humano requiere eliminar los componentes celulares para reducir la probabilidad de desencadenar una respuesta inmune. Para evaluar el grado de descelularización, se realizó una tinción con DAPI. Esta técnica reveló la presencia de núcleos residuales en las MEC de ambos tejidos (Figura 3A y Figura 3F). El análisis de imágenes mediante el software ImageJ mostró que la MCA_d presentó menos del 5% de núcleos residuales en comparación con el cartílago nativo (Figura 3E). Por otro lado, la MMA_d estuvo casi completamente descelularizada, con aproximadamente 1% de núcleos residuales en comparación con la membrana amniótica nativa (Figura 3J).

La descelularización también se validó mediante tinción con HYE. En el cartílago nativo, los núcleos de los condrocitos se observaron en color púrpura/azul, mientras que en el tejido descelularizado se apreciaron lagunas vacías sin núcleos visibles (Figura 3B). De manera similar, en la membrana amniótica nativa se observó una fila de núcleos de células epiteliales adheridos a la membrana basal, los cuales no se encontraron tras la descelularización (Figura 3G). La descelularización logró eliminar más del 90% de las células en la MEC de MA y CA.

8.3. Preservación de la composición bioquímica nativa de las MEC

Para asegurar que la descelularización química no afectara los componentes característicos de la MEC, se realizó una caracterización histológica e inmunohistoquímica. El análisis histológico con HYE confirmó la preservación de la MEC tanto del cartílago (Figura 3B) como de la membrana amniótica (Figura 3G) después del tratamiento de descelularización, evidenciado por la señal rosa de la eosina unida a los componentes de la MEC en los tejidos nativos y descelularizados.

La tinción tricrómico de Masson evidenció la concentración de colágenos presentes en ambas MEC_d, mostrando una coloración azul característica del azul de anilina antes y después de la descelularización (Figura 3H para membrana amniótica y Figura 3C para cartílago). Por último, la tinción con safranina permitió evaluar la conservación de agregano. En el caso del cartílago, no se observaron diferencias antes y después de la

descelularización (Figura 3D). Sin embargo, en la membrana amniótica se observó una disminución en la intensidad de la tinción en el tejido descelularizado (Figura 3I).

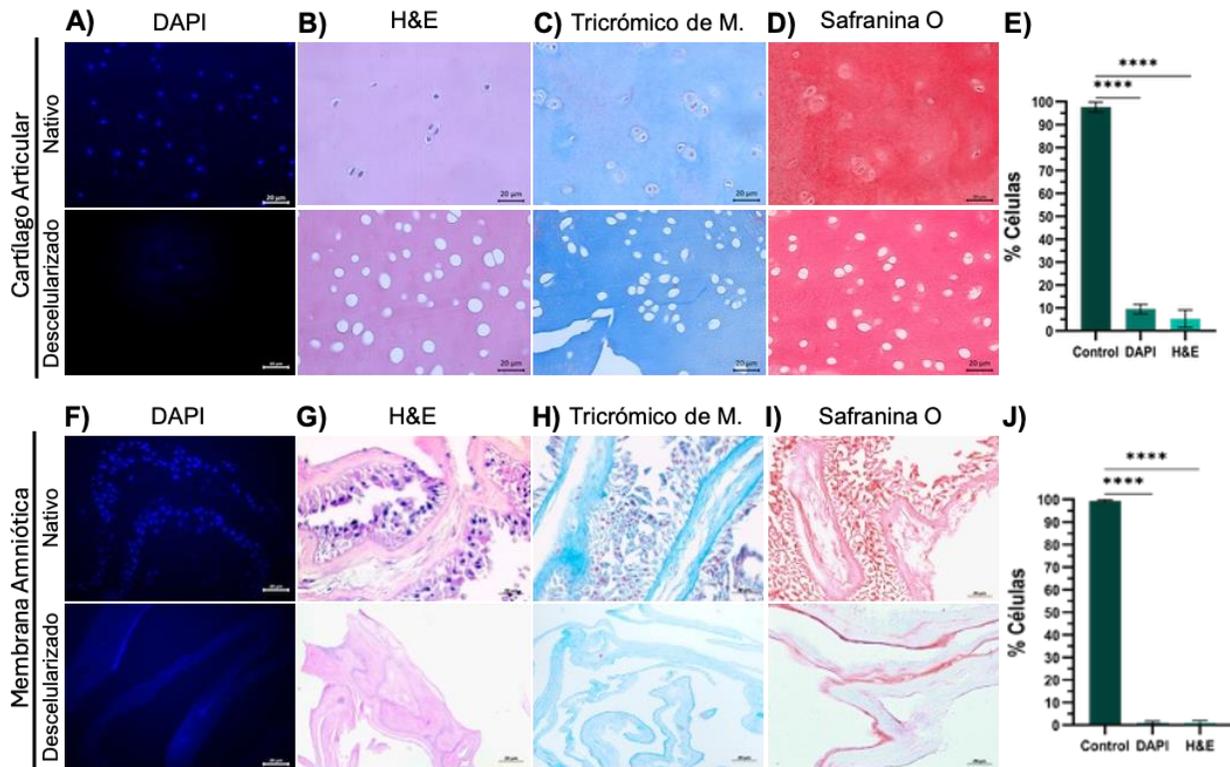


Figura 4. Caracterización histológica del cartílago articular (CA) y la membrana amniótica (MA) antes y después de la descelularización. (A) Tinción con DAPI del CA; (B) Tinción con hematoxilina y eosina del CA; (C) Tinción con tricrómico de Masson del CA; (D) Tinción con safranina O del CA; (E) Cuantificación de la descelularización del CA; (F) Tinción con DAPI de la MA; (G) Tinción con hematoxilina y eosina del MA; (H) Tinción con tricrómico de Masson del MA; (I) Tinción con safranina O del MA; (J) Cuantificación de la descelularización del MA. **** = valor p de la prueba $t \leq 0.0001$.

8.4. Conservación del colágeno y agrecano en las matrices en polvo

Para evaluar la preservación de componentes clave como el colágeno y el agrecano en las matrices en polvo, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas específicas para colágeno tipo II y agrecano en el caso del cartílago, y para colágeno tipo IV y agrecano en el caso de la membrana amniótica (Figuras 4A, 4B para cartílago; Figuras 4E y 4F para membrana amniótica).

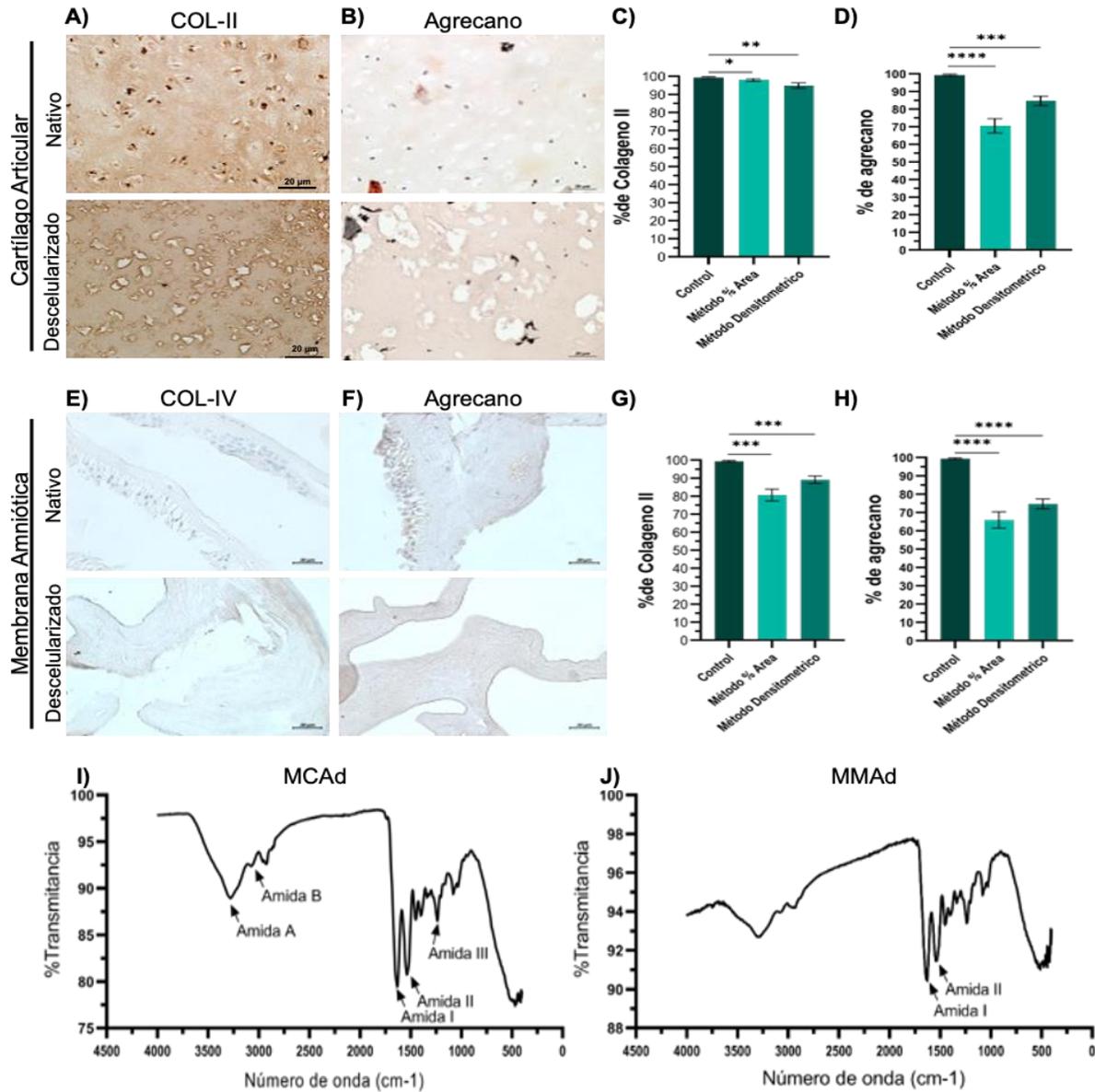


Figura 5. Caracterización del cartilago articular (CA) y la membrana amniótica (MA) antes y después de la descellularización. (A) IHQ anti-col II del CA; (B) IHQ anti-agrecan del CA; (C) Cuantificación de la conservación de colágeno del CA; (D) Cuantificación de la conservación de agrecano del CA; (E) IHQ anti-col IV del MA; (F) IHQ anti-agrecan del MA; (G) Cuantificación de la conservación de colágeno del MA; (H) Cuantificación de la conservación de agrecan del MA; (I) Espectro FT-IR de MCAAd; (J) Espectro FT-IR de MMAAd. *** = valor p de la prueba t ≤ 0.001 ; **** = valor p de la prueba t ≤ 0.0001 .

El análisis de las imágenes de inmunohistoquímica reveló que la MCAAd conservó casi el 100% del colágeno tipo II presente en el cartilago nativo (Figura 4C). No obstante, se observó una disminución del 30% en la cantidad de agrecano en comparación con el tejido nativo (Figura 4D). Por su parte, la MMAAd mostró una retención aproximada del

89% del colágeno tipo IV y del 75% del agregano respecto a la membrana amniótica nativa (Figuras 4G y 4H, respectivamente).

Para validar la conservación de los componentes estructurales principales, se analizaron los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). En el caso de la MCA_d, el espectro mostró picos característicos a 3276 cm⁻¹ y 2928 cm⁻¹ asociados a grupos N-H, un pico a 1632 cm⁻¹ relacionado con grupos C=O, otro a 1536 cm⁻¹ vinculado a la flexión de N-H acoplada a C-N, y un pico a 1236 cm⁻¹ atribuido a grupos C-N, N-H y CH₂ (Figura 4I). Estos picos corresponden a las amidas A, B, I, II y III del colágeno tipo II estructural, respectivamente.

En el caso de la MMA_d, los espectros de FT-IR identificaron picos a 1628 cm⁻¹ asociados con grupos C=O de amida I, 1536 cm⁻¹ (amida II) correspondientes a grupos N-H, y 1236 cm⁻¹ asociados a N-H de amida III (Figura 4J). Estos picos confirmaron la presencia de colágeno tipo IV en la MMA_d, lo que demuestra la conservación de este componente esencial en la matriz.

8.5. Los extractos de MCA_d y MMA_d inducen la proliferación de condrocitos humanos

Se evaluó el efecto de los extractos de MCA_d y MMA_d sobre la proliferación de condrocitos humanos, así como la concentración óptima para obtener un mayor efecto biológico. En el caso del extracto de MCA_d, no se observaron cambios significativos respecto al control a las 24 y 48 horas de cultivo. Sin embargo, a las 72 horas, todas las concentraciones evaluadas lograron duplicar o casi duplicar el número de células presentes en comparación con el control, lo que evidenció un efecto positivo del extracto en este tiempo (Figura 5A).

Por su parte, el extracto de MMA_d tampoco mostró efectos sobre la proliferación celular a las 24 horas de cultivo. No obstante, a las 48 horas se observó un incremento del 30% en el número de células, con diferencias significativas respecto al control en tres de las cuatro concentraciones analizadas. Finalmente, a las 72 horas, todas las concentraciones de MMA_d generaron un aumento del 40% en la proliferación celular en comparación con

el control sin tratamiento, con resultados consistentes entre las concentraciones evaluadas (Figura 5D).

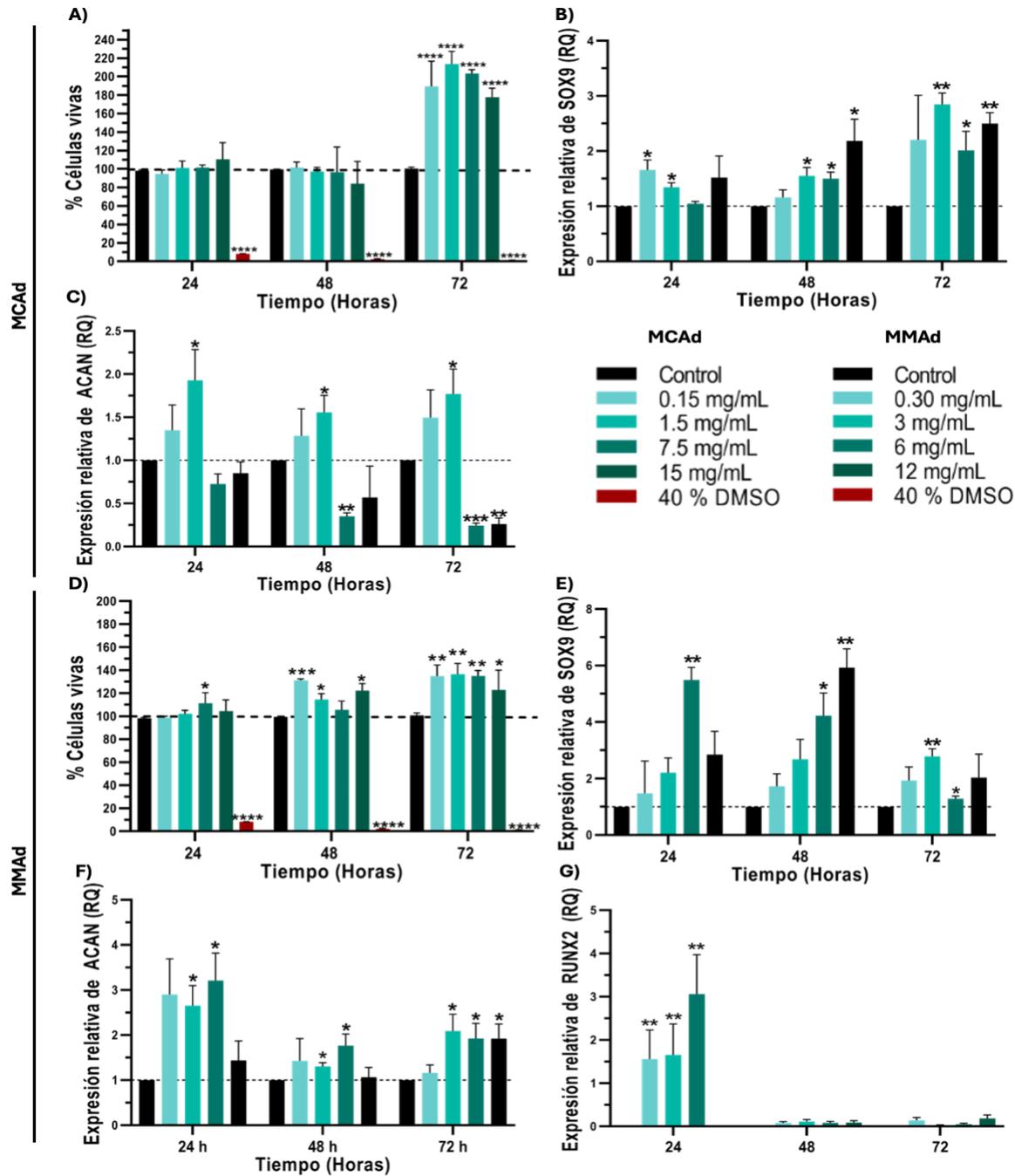


Figura 6. Efecto de MCAAd y MMAAd en el cultivo de condrocitos in vitro. (A) Efecto de MCAAd sobre la proliferación celular; (B) Efecto de MCAAd sobre la expresión de SOX9; (C) Efecto de MCAAd sobre la expresión de ACAN; (D) Efecto de MMAAd sobre la proliferación celular; (E) Efecto de MMAAd sobre la expresión de SOX9; (F) Efecto de MMAAd sobre la expresión de ACAN; (G) Efecto de MCAAd sobre la expresión de RUNX. * = valor p de la prueba $t \leq 0.05$; ** = valor p de la prueba $t \leq 0.005$; *** = valor p de la prueba $t \leq 0.001$; **** = valor p de la prueba $t \leq 0.0001$.

8.6. Los extractos solubles de MCAd y MMAd favorecen la expresión de marcadores condrogénicos

Se analizó el efecto de los extractos de MCAd y MMAd sobre la expresión de genes relacionados con la condrogénesis: SOX9, marcador de diferenciación condrogénica; COL2A1 y ACAN, asociados a la producción de componentes de la matriz cartilaginosa; y RUNX2, marcador de diferenciación osteogénica.

En cuanto a la expresión de SOX9, el extracto de MCAd no mostró un efecto aparente a las 24 horas. A las 48 horas, los niveles disminuyeron, pero a las 72 horas se observó un incremento significativo, alcanzando niveles 2.5 veces mayores que el control no tratado en ese tiempo (Figura 5B). Por otro lado, el extracto de MMAd tuvo un efecto temprano, con un aumento en la expresión de SOX9 desde las 24 horas, siendo más notable a concentraciones de 6 y 12 mg/mL. Este efecto se mantuvo a las 48 horas, pero a las 72 horas solo la concentración de 6 mg/mL mostró diferencias significativas respecto al control (Figura 5E).

Respecto a la expresión de ACAN, el extracto de MCAd solo mostró un aumento significativo en las concentraciones de 0.15 y 1.5 mg/mL, manteniendo niveles más altos que el control en los tres tiempos evaluados. La concentración de 1.5 mg/mL fue la más efectiva, mostrando las mayores diferencias significativas respecto al control (Figura 5C). En el caso del extracto de MMAd, todas las concentraciones probadas aumentaron significativamente la expresión de ACAN a las 24 horas, aunque solo las concentraciones de 0.3, 3 y 6 mg/mL presentaron diferencias significativas respecto al control. A las 48 horas, los niveles de ACAN disminuyeron, pero se mantuvieron diferencias significativas con el control en las concentraciones de 3 y 6 mg/mL. A las 72 horas, los niveles aumentaron ligeramente, siendo las concentraciones de 3, 6 y 12 mg/mL las que mostraron diferencias significativas con el control (Figura 5F).

Finalmente, en la evaluación de RUNX2, se encontró que el extracto de MCAd no indujo la expresión de este marcador, ya que no se detectaron niveles significativos en ninguno de los grupos tratados. En contraste, el extracto de MMAd indujo una expresión transitoria

de RUNX2 a las 24 horas en los grupos tratados con concentraciones de 0.3, 3 y 6 mg/mL. No obstante, a las 48 horas la expresión disminuyó significativamente, y a las 72 horas prácticamente desapareció en todos los grupos experimentales (Figura 5G).

8.7. La combinación de MCA_d y MMA_d potencia la expresión de genes condrogénicos

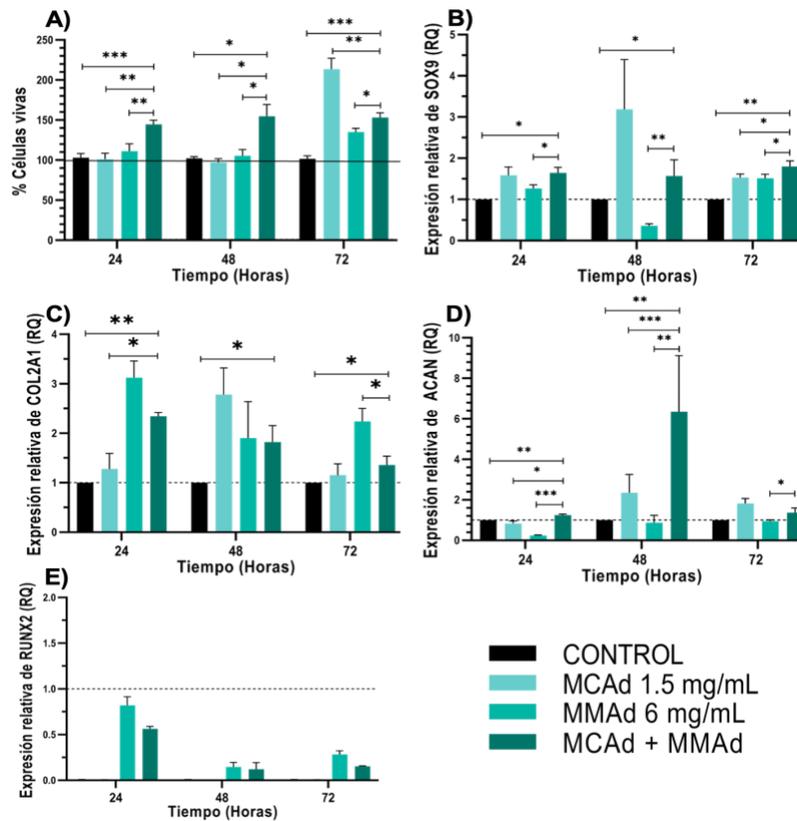
Para evaluar el efecto de la combinación de las matrices MCA_d y MMA_d, se seleccionaron las concentraciones que en los experimentos previos mostraron mayor índice proliferativo e indujeron mayores niveles de expresión de SOX9 y ACAN en los condrocitos. Las concentraciones elegidas fueron 1.5 mg/mL de MCA_d y 6 mg/mL de MMA_d.

Respecto al efecto de las matrices combinadas en la proliferación celular, durante las primeras 24 y 48 horas, el comportamiento del grupo tratado con ambas matrices fue similar al de los grupos tratados con una sola matriz. Sin embargo, a las 72 horas, el efecto observado en los grupos tratados con matrices individuales se contrarrestó en el grupo combinado, ya que no se encontraron diferencias significativas con los grupos tratados con una sola matriz ni con el grupo control (Figura 6A).

En cuanto a la expresión de SOX9, a las 24 horas, el grupo tratado con ambas matrices mostró niveles de expresión más altos que los grupos tratados con una sola matriz y que el control, aunque las diferencias significativas solo se encontraron con el grupo tratado exclusivamente con MMA_d y con el grupo control. A las 48 horas, la expresión de SOX9 fue mayor en el grupo combinado en comparación con el control y el grupo tratado únicamente con MMA_d, mientras que el grupo tratado con MCA_d mostró niveles más altos, pero sin diferencias significativas respecto al grupo combinado. No obstante, a las 72 horas, la combinación de matrices generó una expresión de SOX9 significativamente mayor que en todos los grupos, incluyendo los tratados con matrices individuales y el control (Figura 6B).

Para ACAN, la expresión fue más alta en el grupo combinado a las 24 y 48 horas, con diferencias significativas respecto a todos los grupos experimentales ($p < 0.001$ a las 24 h, $p < 0.005$ a las 48 h y $p < 0.01$ a las 72 h). La combinación de ambas matrices aumentó la

expresión de COL2A1 a las 24, 48 y 72 h; sin embargo, esta expresión disminuyó con el tiempo, y a las 72 h, la mezcla mostró diferencias significativas con respecto al control no tratado y al grupo MMAd (Figura 6C). A las 48 h, MMAd exhibió una mayor expresión de ACAN en comparación con MCAd; no obstante, a las 72 h, el grupo mixto mostró la mayor expresión de ACAN en comparación con el control no tratado o con MCAd o MMAd por separado (Figura 6D). Es importante destacar que todos los experimentos que involucraron MCAd y MMAd, ya sea individualmente o en combinación, mostraron una reducción en la expresión de RUNX, un marcador osteogénico.



8.8 Diseño del Andamio FCMA

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de las matrices MCAd y MMAd (1.5 y 6 mg/mL, respectivamente), se procedió a la fabricación de los andamios de fibrina: un

andamio control (formulado únicamente con fibrina) y el andamio FCMA, en el cual se incorporaron ambas matrices a la formulación. Para estandarizar el proceso de polimerización, se evaluaron diferentes concentraciones de trombina (200, 185 y 125 UI), con el objetivo de optimizar el tiempo de formación del andamio. La cinética de polimerización para cada concentración fue registrada y se muestra en la Figura 8A. Se determinó que la concentración de 125 UI de trombina era la más adecuada, ya que proporcionaba una ventana de aproximadamente 10 segundos para vaciar la formulación en el molde y manipularla antes de su solidificación, lo que resultó en una consistencia más firme y homogénea (Figuras 8A y 8B). Los andamios obtenidos presentaron una forma cilíndrica con dimensiones estándar de 7.5 mm de altura por 6 mm de diámetro. El andamio control tuvo un peso promedio de 200 ± 3 mg, mientras que el andamio FCMA presentó un peso ligeramente mayor de 208 ± 5 mg.

8.9 Evaluación de la degradación y Citocompatibilidad del andamio FCMA

Para evaluar la velocidad de degradación del andamio FCMA, se realizaron cultivos en condiciones con y sin células durante un periodo de 28 días. El porcentaje de degradación fue medido a los días 7, 14, 21 y 28, y los resultados se muestran en la Figura 8D. En dicha figura se presentan las curvas de degradación correspondientes al andamio control y al andamio FCMA, tanto en presencia como en ausencia de condrocitos. Los datos obtenidos muestran que el andamio FCMA presentó un menor porcentaje de degradación en comparación con el andamio control, independientemente de la presencia celular. Al día 28, el andamio FCMA sembrado con condrocitos presentó una degradación del 7.5 ± 1.3 %, mientras que el andamio control alcanzó un valor de 10 ± 2.7 %. En condiciones acelulares, el comportamiento fue similar: el andamio FCMA mostró una degradación mínima de 0.5 ± 0.3 %, en contraste con el andamio control, que presentó un 3 ± 0.9 % de degradación al mismo tiempo de evaluación.

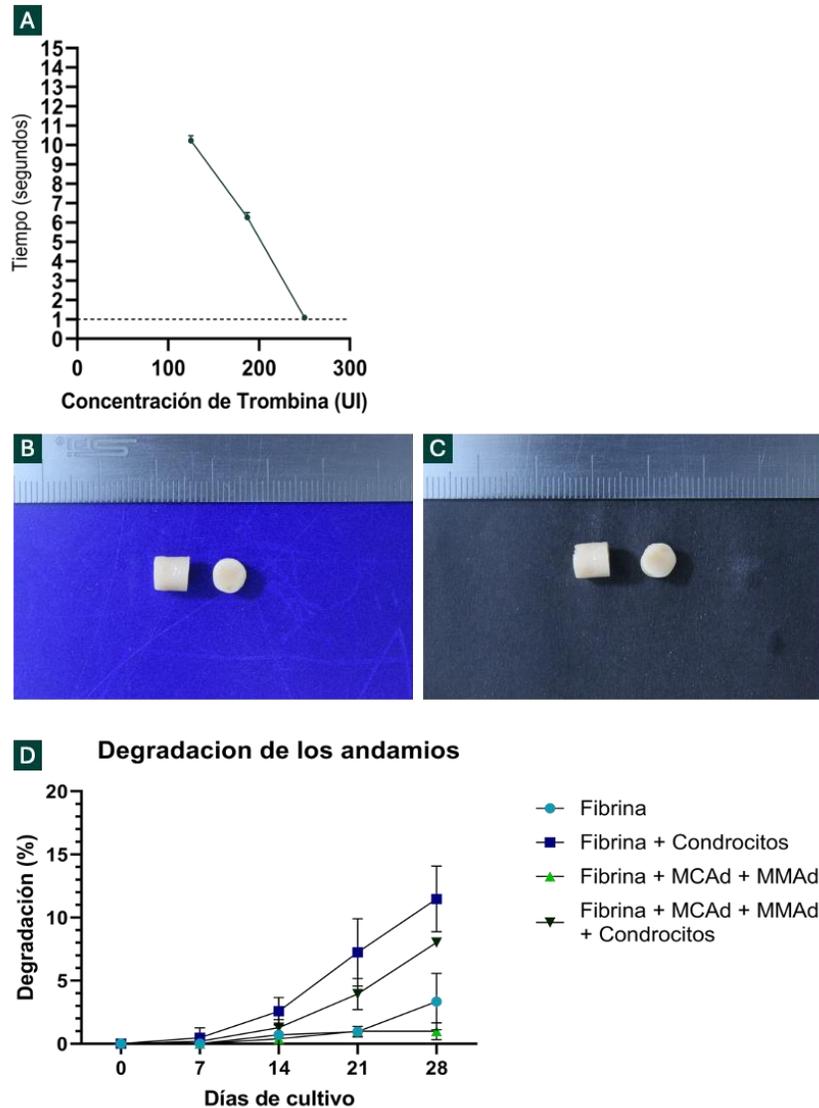


Figura 8. Evaluación de la polimerización, morfología y degradación de los andamios. A) Cinética de polimerización en función de la concentración de trombina; B) Vista lateral y superior del andamio control; C) Vista lateral y superior del andamio FCMA; D) Cinética de degradación del andamio control y FCMA durante el cultivo en presencia y ausencia de condrocitos.

Además de evaluar la degradación del andamio, se analizó si los condrocitos sembrados eran capaces de sobrevivir y adaptarse al ambiente generado por el andamio FCMA. Para ello, se empleó una tinción con fluorescencia diferencial para células vivas y muertas, aplicada a los días 1, 7, 14, 21 y 28 de cultivo. Mediante análisis de imagen, se cuantificaron las células vivas (señal verde) y las células muertas (señal roja) presentes en los andamios, y se calculó el porcentaje relativo de cada población. Durante los días 1, 7 y 14, el andamio control presentó un porcentaje de células vivas de aproximadamente

90 ± 3.2 %, el cual se incrementó ligeramente hasta alcanzar valores cercanos al 95 % entre los días 14 y 28. En el caso del andamio FCMA, se observó una alta viabilidad celular en todos los tiempos analizados, manteniéndose cerca del 99 % durante las cuatro semanas de cultivo. No obstante, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ninguno de los puntos evaluados. Al observar las imágenes de fluorescencia (Figura 9 A-J), se evidenció un incremento notable en la intensidad de la señal verde en los andamios FCMA, correspondiente a una mayor densidad de células vivas. Esta observación fue cuantificada expresando el número de células por micrómetro cuadrado (μm^2). Al día 1 y 7, el andamio control mostró una densidad promedio de aproximadamente 500 células/ μm^2 , mientras que el andamio FCMA alcanzó valores cercanos a 650 células/ μm^2 . Al día 21, se registró un aumento significativo en el número de células en el andamio FCMA, con un valor cercano a 800 células/ μm^2 , mientras que en el andamio control se observó una reducción hasta 300 células/ μm^2 . Finalmente, al día 28, el andamio FCMA alcanzó un total aproximado de 1200 células/ μm^2 , lo que representa un incremento del 220 % con respecto al valor inicial del día 1. En contraste, el andamio control mantuvo una densidad similar a la registrada en el día 21, con un promedio de 350 células/ μm^2 .

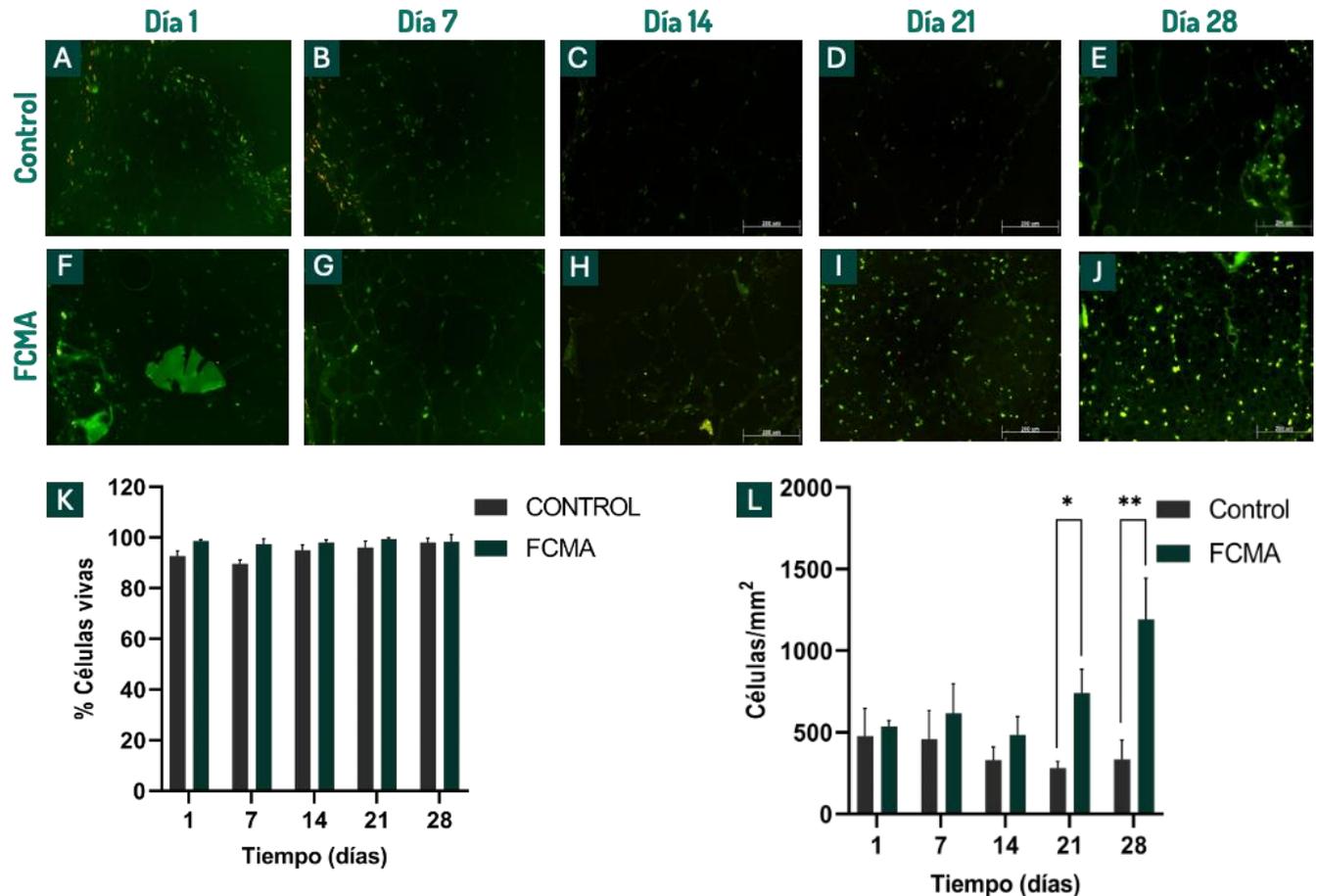


Figura 9. Evaluación de la viabilidad celular y distribución de condrocitos en los andamios. A–E) Imágenes representativas de fluorescencia del andamio control en los días 1, 7, 14, 21 y 28; F–J) Imágenes correspondientes al andamio FCMA en los mismos días. Las células vivas se observan en verde y las muertas en rojo/amarillo; K) Porcentaje de células vivas a lo largo del cultivo; L) Cuantificación de la densidad celular (células/mm²) en los andamios control y FCMA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

8.10 Evaluación de la expresión de genes condrogénicos

Para evaluar la funcionalidad del andamio FCMA se midió la expresión del gen marcador de linaje condrogénico SOX9, los genes marcadores de producción de MEC de cartílago hialino COL2A1, ACAN, el gen marcador de hipertrofia en condrocitos COL10A2, el gen marcador de generación de cartílago fibroso COL1A2 y el gen de diferenciación osteogénica RUNX2 a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo.

En la figura 10A se observa que la expresión de SOX9 mostró una tendencia ascendente sostenida en los andamios FCMA. A partir del día 21, la expresión se incrementó aproximadamente el doble en comparación con el grupo control, alcanzando un valor más de tres veces superior al día 28. En contraste, en los andamios del grupo control los niveles de SOX9 se mantuvieron bajos y relativamente constantes durante todo el periodo. Este comportamiento sugiere que el andamio FCMA favorece la activación progresiva del linaje condrogénico, especialmente en etapas tardías del cultivo. En cuanto a la expresión del gen COL2A1, que codifica colágeno tipo II, en la imagen 10B se puede observar que la expresión fue entre 1.5 y 2 veces mayor en el andamio FCMA que en el andamio control en todos los puntos evaluados. Aunque no se observó una tendencia claramente ascendente en el tiempo, la expresión fue consistentemente elevada, lo cual indica una producción mantenida de matriz de cartílago y el mantenimiento del fenotipo hialino de los condrocitos a lo largo del cultivo. El gen ACAN, que codifica el proteoglicano agregano, presentó un aumento marcado desde el inicio del experimento. En el día 7, el grupo FCMA mostró una expresión aproximadamente cinco veces mayor que el control. Aunque esta diferencia disminuyó ligeramente con el tiempo, los niveles se mantuvieron elevados hasta el día 28, superando al andamio del grupo control por al menos tres veces figura 10C. Estos datos indican una activación temprana y prolongada de la síntesis de proteoglicanos en el andamio FCMA, lo que favorece el desarrollo de una matriz de cartílago.

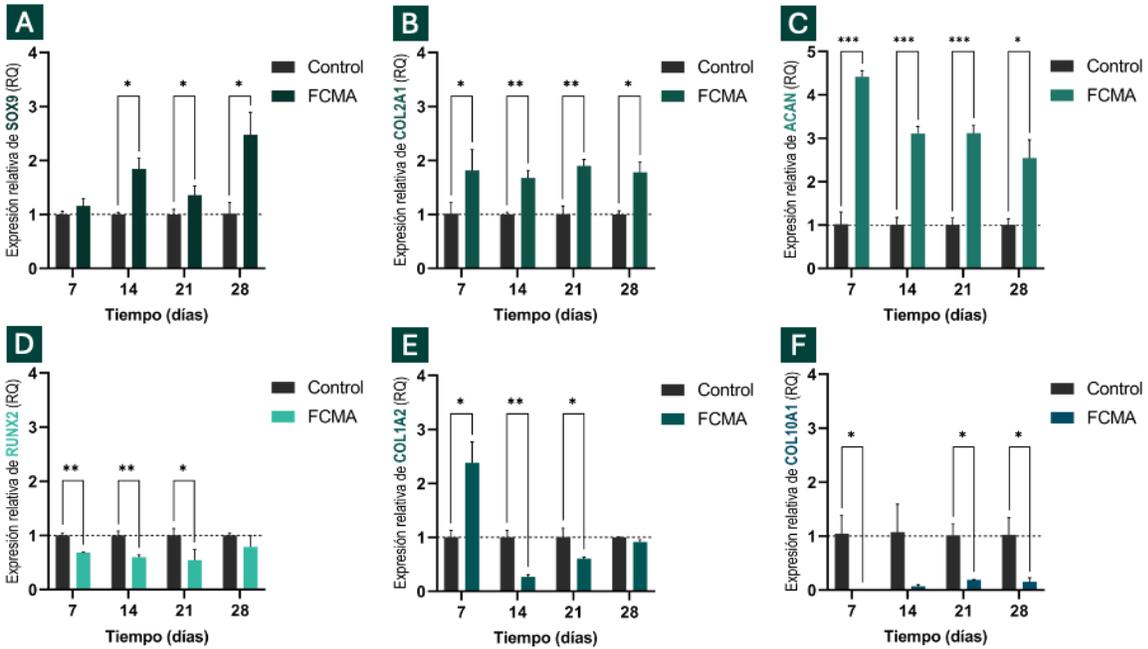


Figura 10. Expresión relativa de genes asociados al fenotipo condrogénico. A–D) Expresión relativa de SOX9, COL2A1, ACAN y RUNX2, respectivamente, en los andamios control y FCMA a los días 7, 14, 21 y 28 de cultivo; E–F) Expresión de COL1A2 y COL10A1 como marcadores de cartílago fibroide e hipertrofia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En contraste con los genes condrogénicos, el marcador RUNX2, relacionado con la diferenciación osteogénica, presentó niveles más altos en el andamio control en todos los tiempos analizados. En el grupo FCMA, la expresión fue aproximadamente un 50 % menor, y no mostró cambios significativos a lo largo del tiempo (figura 10D). Esta disminución relativa de RUNX2 en el andamio FCMA lo que sugiere una supresión parcial de la diferenciación osteogénica. Como se observa en la imagen 10E el gen COL1A2, asociado con la síntesis de colágeno tipo I, se mantuvo en niveles bajos en ambos grupos. No obstante, en el grupo control se observó un ligero incremento al día 14, con una expresión aproximadamente 1.3 veces mayor respecto al andamio FCMA. En este último, la expresión disminuyó paulatinamente después del día 7, lo que indican que el andamio FCMA podrían estar limitando la producción de cartílago fibroso, lo cual resulta beneficioso para conservar las características biomecánicas del cartílago hialino y evitar la formación de tejido fibroso. Finalmente, la expresión de COL10A1, marcador de hipertrofia en condrocitos, fue prácticamente indetectable en ambos grupos durante los 28 días de cultivo. En el andamio FCMA, los niveles fueron cercanos a cero en todos los puntos evaluados, y en el grupo control se observaron niveles ligeramente mayores pero

aún muy bajos, sin superar el 10 % de los valores observados para los genes condrogénicos (figura 10F). La baja expresión de este gen sugiere que no se produjo un proceso de hipertrofia celular, lo cual es indicativo de una diferenciación condrogénica estable

8.13 Evaluación de la producción de elementos de la MEC en el andamio FCMA

Posteriormente validamos la producción de la producción de colágeno tipo II , agrecano y colágeno tipo I mediante tinciones inmunohistoquímica, el análisis semicuantitativo se realizó mediante la determinación de Histscore (H-score) para cada condición y tiempo experimental. Las Figuras 11, 12 y 13 muestran las inmunotinciones para colágeno tipo II, agrecano y colágeno tipo I respectivamente para los andamios FCMA y control, analizados a los días 1, 14 y 28 de cultivo. Las imágenes corresponden a cortes histológicos teñidos con un anticuerpo específico, visualizados mediante microscopía de campo claro. A la derecha, se presenta el análisis semicuantitativo de la expresión mediante el Histscore (H-score).

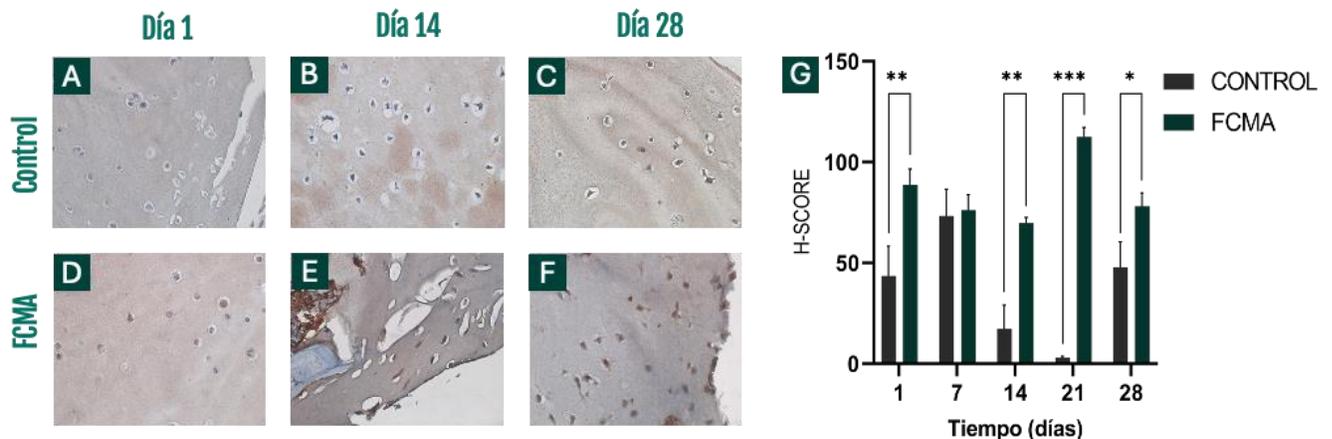


Figura 11. Evaluación inmunohistoquímica de colágeno tipo II en los andamios. A–C) Tinción en andamio control a los días 1, 14 y 28 de cultivo; D–F) Tinción correspondiente al andamio FCMA en los mismos días. Se observa mayor intensidad de marcaje en el grupo FCMA, especialmente en día 28; G) Cuantificación del H-SCORE para colágeno tipo II. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En la figura 11 se pueden observar las inmunotinciones contra colágeno tipo II. En los andamios control (figuras 11A, 11B Y 11C), se observaron niveles bajos de inmunorreactividad para colágeno tipo II en todos los tiempos analizados. Las células mostraron escasa tinción citoplasmática y la MEC adyacente careció de señal detectable, lo que se refleja en valores de H-score bajos y sin variaciones marcadas entre los días evaluados (figura 11G). En contraste, los cultivos sobre andamio FCMA (figuras 11D, 11E Y 11F) presentaron una progresión temporal en la intensidad y distribución de la señal IHC. Al día 1, la tinción fue leve y comparable a la observada en el grupo control. Sin embargo, al día 14, se evidenció un aumento notorio en la señal, con presencia de regiones positivas en la matriz circundante, especialmente en zonas de contacto directo con el biomaterial. Para el día 28, se observó una tinción intensa y homogénea, tanto en el citoplasma de los condrocitos como en la MEC, indicando una producción aumentada y organizada de colágeno tipo II (figura 11F). El análisis de Histoscore confirmó estas observaciones (figura 11G). Al día 28, el andamio FCMA mostró una puntuación cercana al valor máximo registrado en la serie, aproximadamente cuatro veces superior al valor observado en el andamio control. En los días 14 y 28, las diferencias entre condiciones fueron notorias, destacando el efecto del andamio FCMA en la promoción de la síntesis y acumulación de colágeno tipo II.

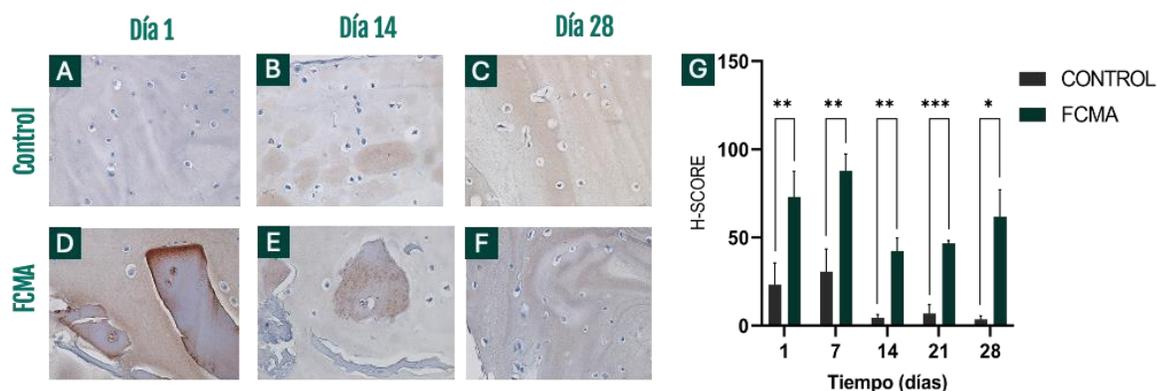


Figura 12. Evaluación inmunohistoquímica de agrecano en los andamios. A–C) Tinción en el andamio control a los días 1, 14 y 28 de cultivo; D–F) Tinción correspondiente al andamio FCMA en los mismos días. Se observa mayor acumulación del marcador en el grupo FCMA desde los primeros días de cultivo; G) Cuantificación del H-SCORE para agrecano. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En los andamios control, la inmunorreactividad para agregcano fue baja durante todo el periodo de cultivo (figuras 12A, 12B y 12C). La tinción fue escasa, principalmente limitada al citoplasma de algunas células, sin evidencia clara de acumulación en la MEC. Esta baja intensidad se mantuvo sin cambios relevantes entre los días 1, 14 y 28, lo que se reflejó en valores bajos y constantes de H-score en esta condición. En contraste, los cultivos sobre andamios FCMA mostraron un aumento progresivo en la intensidad de tinción para agregcano a lo largo del tiempo (figuras 12D, 12E y 12F). Al día 1, ya se observó una mayor inmunorreactividad en comparación con el control, con presencia de tinción leve a moderada en el citoplasma de los condrocitos y regiones adyacentes del andamio. Esta señal aumentó visiblemente al día 14, con áreas localizadas de tinción intensa y acumulación en la matriz pericelular. Para el día 28, la señal de agregcano fue intensa y generalizada, observándose tanto en las células como en extensas regiones de matriz extracelular (figura 12F). El análisis semicuantitativo mediante Histoscore confirmó las observaciones microscópicas (figura 12G). A partir del día 1, el andamio FCMA presentó un valor de H-score más del doble que el registrado en el control. Esta diferencia se incrementó en los días 14 y 28, alcanzando al final del cultivo una puntuación aproximadamente cuatro veces superior en comparación con el andamio control.

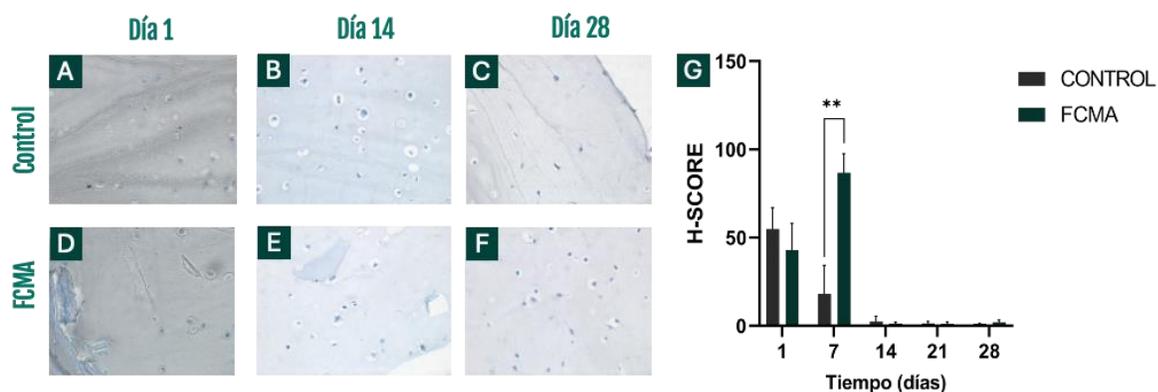


Figura 13. Evaluación inmunohistoquímica de colágeno tipo I en los andamios. A–C) Tinción en el andamio control a los días 1, 14 y 28 de cultivo; D–F) Tinción correspondiente al andamio FCMA en los mismos días. Se observa una disminución progresiva del marcador en ambos grupos; G) Cuantificación del H-SCORE para colágeno tipo I. ** $p < 0.01$.

En los cultivos sobre andamio control, se observó una expresión moderada de colágeno tipo I desde el día 1, con tinción positiva distribuida principalmente en el citoplasma de los condrocitos y algunas áreas de la matriz (figura 13A, 13B y 13C). Esta señal se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo, sin diferencias visibles entre los días 14 y 28. El análisis de H-score confirmó esta estabilidad, con valores similares entre los distintos tiempos (figura 13G). En contraste, el andamio FCMA mostraron una disminución progresiva en la inmunorreactividad para colágeno tipo I (figuras 13D, 13E y 13F). Al día 1, la intensidad de la tinción fue comparable a la observada en el grupo control; sin embargo, al día 14 se observó una reducción marcada en la señal, la cual fue aún más evidente al día 28, donde prácticamente no se detectó tinción específica. Esta tendencia fue cuantificada por el análisis de H-score, que reveló una disminución de más del 70 % en la puntuación entre los días 1 y 28 (figura 13G). Estos resultados sugieren que el entorno proporcionado por el andamio FCMA contribuye a preservar el linaje condrogénico y a reducir la producción de MEC de fibrocartilago durante el cultivo tridimensional.

8.14 Caracterización histológica del andamio FCMA

La Figura 14 muestra el análisis histológico de los andamios FCMA y control a través de tinciones con H&E y safranina O/Verde rapido, realizadas a los días 1, 14 y 28 de cultivo. Las imágenes obtenidas permiten evaluar la morfología celular, la disposición de los condrocitos y la organización del microambiente extracelular a lo largo del tiempo. En los andamios control, las células mostraron una distribución dispersa, con morfología redondeada y localizadas de forma individual dentro del material (figuras 14A, 14B y 14C). Esta organización celular se mantuvo a lo largo del cultivo, sin evidencias claras de interacción celular o formación de estructuras características del cartílago. Al día 28, aunque las células aún eran visibles, no se observaron agrupamientos ni disposición en estructuras lagunares, lo que sugiere una escasa reorganización tisular en esta condición. Por el contrario, en los andamios FCMA, se observó una evolución progresiva en la organización celular. Desde el día 1, los condrocitos mostraban una disposición más cercana entre sí y estaban inmersos en una matriz de aspecto homogéneo (figuras 14D, 14E y 14F). A partir del día 14 (figura 14E), comenzaron a distinguirse agrupamientos

celulares con disposición concéntrica, rodeados por un halo claro correspondiente a MEC, indicativo de una formación inicial de lagunas condrocíticas. Esta organización se hizo más evidente al día 28 (figura 14F), donde se observaron múltiples regiones con condrocitos agrupados dentro de estructuras lagunares bien definidas, semejantes a las encontradas en el cartílago hialino nativo. Las imágenes ampliadas incluidas en la figura permiten apreciar con mayor detalle estas lagunas, que presentan condrocitos viables embebidos en una matriz que parece a la matriz pericelular natural. Estas observaciones indican que el andamio FCMA favorece la reorganización tridimensional de los condrocitos y promueve la formación de microambientes similares a los del cartílago nativo, en contraste con el andamio control, donde no se observó dicha organización.

La tinción histológica con Safranina O / Verde Rápido realizada a los días 1, 14 y 28 de los andamios FCMA y control permitió detectar la señal específica de glucosaminoglicanos (GAGs), los cuales se tiñen de color naranja a rojo, mientras que el verde rápido contrasta el fondo tisular. En las micrografías correspondientes al andamio control, la tinción con Safranina O fue escasa en todos los tiempos evaluados (figuras 14G, 14H y 14I). Durante los días 1, 14 y 28, la mayoría de los condrocitos presentaron una coloración débil o nula en el citoplasma, lo que sugiere una baja o nula síntesis y acumulación de GAGs en la matriz pericelular. En las imágenes ampliadas del día 28 (figura 14I) se observa que, aunque algunas células muestran una leve señal anaranjada, esta es tenue y limitada, sin evidencia de formación de una matriz rica en proteoglicanos. En contraste, en los andamios FCMA (figuras 14J, 14K y 14L), se observó una señal positiva desde los primeros días de cultivo. A pesar de que se identificaron fragmentos naranjas de mayor intensidad embebidos dentro del andamio, correspondientes a MCAAd, a partir del día 14 (figura 14K), y de forma más evidente al día 28 (figura 14L), numerosos condrocitos mostraron intensa tinción intracelular y pericelular de color naranja claro a rojizo, indicativa de una producción activa de GAGs. Esta señal fue especialmente marcada en las células localizadas en regiones donde la MCAAd estaba presente, lo cual sugiere una influencia directa del microambiente matricial en la activación del fenotipo condrogénico. Las imágenes de alta magnificación refuerzan esta observación, mostrando condrocitos rodeados por una matriz teñida intensamente, lo que evidencia la presencia de GAGs recién sintetizados.

En conjunto, los hallazgos de ambas tinciones parecen indicar que los andamios FCMA ofrecen un microambiente más favorable para la diferenciación condrogénica, promoviendo tanto la organización celular en estructuras características del cartílago como la síntesis de matriz rica en GAGs. La presencia de lagunas bien definidas y la intensa señal de Safranina O sugieren que estos andamios no solo permiten el mantenimiento del fenotipo condrocítico, sino que también podrían estimular la generación de un tejido similar al cartílago hialino.

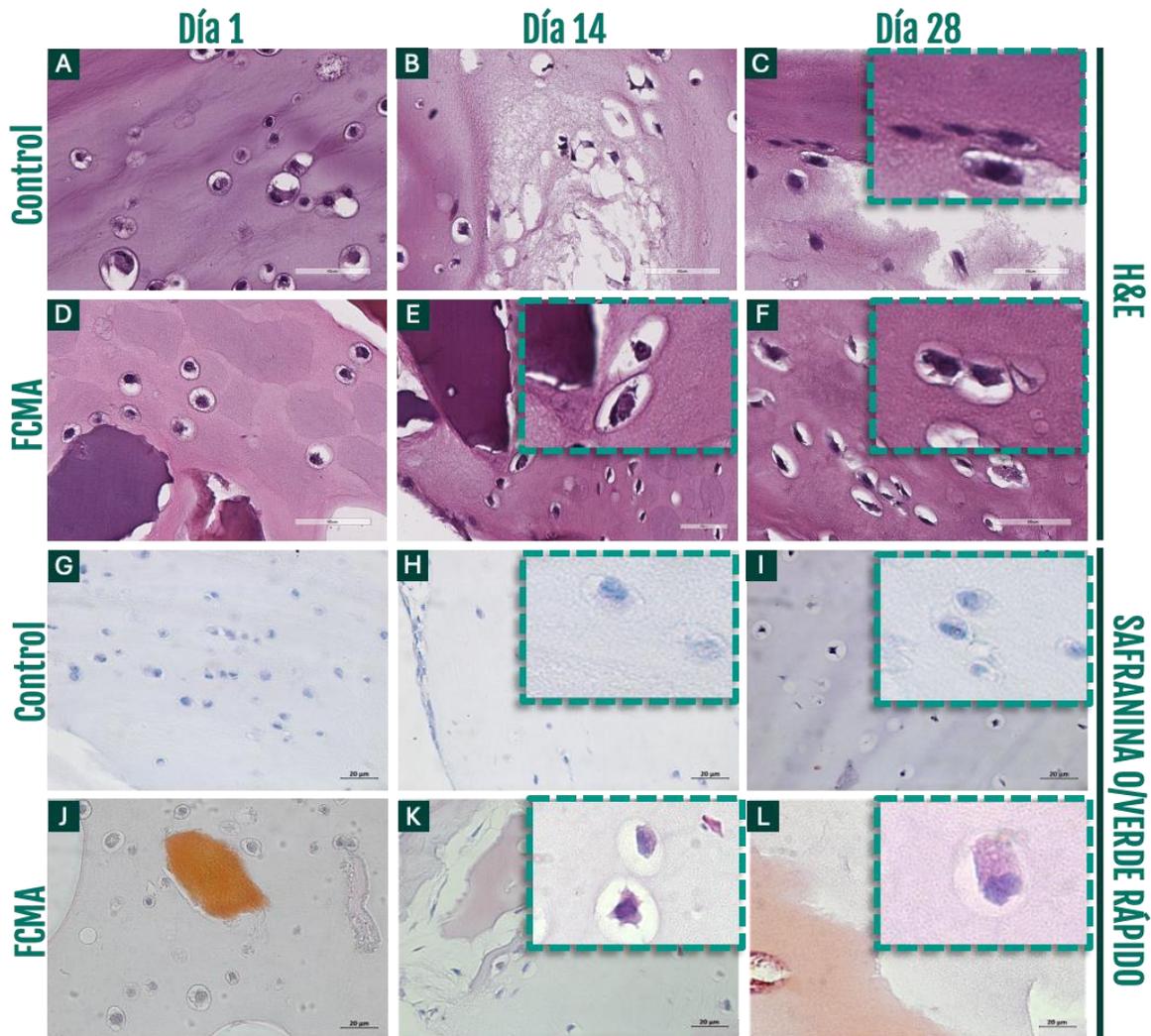


Figura 14. Evaluación histológica de los andamios mediante H&E y Safranina O/Verde Rápido. A–C) Tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en el andamio control a los días 1, 14 y 28 de cultivo; D–F) Tinción correspondiente al andamio FCMA en los mismos días. Se observa mayor formación de lagunas celulares y mejor organización tisular en el grupo FCMA; G–I) Tinción con Safranina O/Verde Rápido en el grupo control, sin señal evidente de matriz rica en glucosaminoglicanos; J–L) Tinción correspondiente al andamio FCMA, con señal naranja/rojiza indicativa de acumulación de matriz cartilaginosa. Imágenes tomadas a 40× de aumento.

9. DISCUSIÓN

Las matrices extracelulares descelularizadas se han utilizado ampliamente en la ingeniería de tejidos para tratar lesiones tisulares, evitando la formación de cicatrices y promoviendo la regeneración [210]. Este tipo de biomateriales han captado gran atención debido a su capacidad para mantener la actividad biológica, conservar factores de crecimiento y proteínas importantes después de procesos de descelularización química/física [180]. En la ingeniería de tejidos, las MEC derivadas de tejidos nativos a menudo se pulverizan en polvos que pueden ser procesados en diversas formas, como hidrogeles, espumas, nanofibras, recubrimientos y estructuras impresas en 3D [211]. Esta versatilidad en el procesamiento de MEC en polvo permite la fabricación de andamiajes adaptados a necesidades específicas de ingeniería de tejidos, promoviendo la regeneración tisular [212]. En este trabajo, evaluamos el potencial de mezclar MCAd y MMAd para su uso en ingeniería de tejidos de cartílago.

Un aspecto fundamental al trabajar con tejidos biológicos es asegurar la eliminación completa de los componentes celulares. Existen tres criterios esenciales para una descelularización exitosa: (a) la MECd debe contener menos de 50 ng/mg de DNA de doble cadena (dsDNA) en tejido seco, (b) los fragmentos de DNA restantes deben ser menores a 200 pares de bases, y (c) la MECd no debe mostrar material nuclear visible cuando se tiñe con DAPI o hematoxilina y eosina [213,214]. En nuestro estudio, la MCAd mostró una descelularización superior al 95%, sin núcleos observados en las tinciones de DAPI o H&E, lo que es consistente con otros protocolos reportados utilizando diferentes tiempos y métodos de descelularización [206,215,216]. En el caso de la MMAd se logró una eliminación casi completa (99.5%) de los componentes celulares, igualmente sin mostrar núcleos visibles en las tinciones y con resultados consistentes a los publicados en otros trabajos [207,217,218]. Sin embargo, para cumplir completamente con el tercer criterio, futuros estudios deben incluir el análisis de concentración de DNA en las matrices descelularizadas, lo cual no se realizó en nuestro estudio.

Las técnicas de descelularización son cruciales para eliminar los componentes celulares mientras se preservan las proteínas de la MEC y los GAGs, manteniendo así las

propiedades estructurales y funcionales esenciales para el potencial regenerativo [180,203]. Además, la preservación de las interacciones proteína–GAG y proteína–proteína durante los procesos de descelularización ayuda a mantener la estructura nativa de la MEC [219]. Nuestras matrices retuvieron componentes importantes como el colágeno tipo II y el agregano, como lo confirmaron las tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. Si bien la conservación del colágeno fue casi del 100% en ambas matrices, se notó una pérdida significativa de agregano durante la descelularización, probablemente debido a su localización en las moléculas de hialuronato dentro de la estructura 3D de la MEC [220]. Sin embargo, se observaron niveles de retención superiores al 70% tanto en MCAAd como en MMAAd, consistente con los hallazgos de Guo et al. [38], donde la conservación del colágeno fue casi completa, mientras que los niveles de GAG's variaron dependiendo del método de descelularización [221,222]. El análisis FT-IR confirmó la presencia de colágeno tipo II en MCAAd y colágeno tipo IV en MMAAd.

Diversos estudios han destacado que el tamaño de las partículas de matriz extracelular (MEC) tiene un impacto significativo en la respuesta celular y en el destino del tejido regenerado, independientemente de la composición específica del biomaterial utilizado [222,223]. En particular, se ha demostrado que las partículas en rangos nanométricos o micrométricos pequeños pueden mejorar la proliferación, la diferenciación y la síntesis de matriz extracelular en cultivos celulares, actuando como inductores biofísicos de señalización celular [224]. En este estudio, tanto la MCAAd como la MMAAd mostraron una distribución heterogénea de tamaños de partícula, abarcando desde fracciones submicrométricas hasta partículas mayores de 1000 μm . Esta heterogeneidad puede considerarse una ventaja, ya que proporciona una microarquitectura más compleja que favorece múltiples niveles de interacción con las células hospedadoras, además de una liberación más gradual y sostenida de factores de crecimiento atrapados en la matriz, como se ha propuesto en otros algunos trabajos [225]. Además, se ha reportado que las microestructuras porosas derivadas de MEC, especialmente aquellas con poros y partículas de tamaños variados, pueden mejorar la maduración condrogénica y la deposición de nueva matriz extracelular al ofrecer nichos con diferente accesibilidad, densidad y capacidad de retención de biomoléculas [226,227]. A diferencia de estudios donde se emplearon matrices con tamaños uniformes y restringidos, las matrices

obtenidas en el presente trabajo aportan una ventaja significativa al integrar esta heterogeneidad desde la etapa de diseño. Esta característica no solo favorece la integración celular y la mecanotransducción, sino que también permite una adaptación más efectiva del andamio al entorno dinámico del cartílago en regeneración [10,228]. En conjunto, el perfil de tamaños obtenido en nuestras matrices representa una propiedad funcional valiosa que refuerza su aplicabilidad en estrategias de ingeniería de tejidos cartilagosos.

Al analizar el extracto soluble de las matrices descelularizadas, confirmamos que nuestros biomateriales derivados de MEC poseen actividad biológica, ya que fueron capaces de inducir la proliferación de condrocitos en cultivo después de 48 h como se había reportado previamente para la MCA_d por Chang et. Al 2014 y para MMA_d por Ryzhuk et. Al 2017 [208,229], lo que está asociado con la proliferación de condrocitos y el mantenimiento de la línea celular condrogénica. Esto puede deberse a la presencia de factores de crecimiento solubles, como bFGF, factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- β 1, proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) y factor de diferenciación de crecimiento 7 (GDF-7) en MCA_d [183,230] o EGF, KGF, HGF, TGF- β 1, TNF- α , EGF, IGF-1, PDGF-BB, HGF, VEGF y bFGF, los cuales se pueden encontrar en la MMA_d [231]. Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es la falta de caracterización de los factores de crecimiento solubles presentes en MCA_d y MMA_d.

Nuestros resultados demostraron que los extractos solubles MCA_d y MMA_d fueron capaces de aumentar los niveles de expresión de SOX9 y mantener el linaje condrogénico. El principal componente del cartílago hialino es el colágeno tipo II; la combinación de MCA_d y MMA_d mostró ser capaz de mejorar la expresión de COL2A1 en los condrocitos; sin embargo, aunque el grupo MMA_d mostró inducir niveles más altos a las tres veces medidas y MCA_d mostró inducir niveles más altos a las 48 h, estos muestran una tendencia a disminuir la expresión con el paso del tiempo; esto podría indicar que la combinación de MCA_d y MMA_d podría generar resultados más estables y mantenibles a lo largo del tiempo, pero se necesitan más pruebas para confirmar esto.

Diversos estudios reportan un aumento significativo de la expresión de COL2A1 en cultivos de células madre mesenquimales expuestas a matrices descelularizadas de distintas fuentes, como cartílago articular, cartílago auricular y tendón, a concentraciones inferiores a 50 mg/mL y con exposiciones de 7 a 14 días [232–234]. No obstante, nuestros resultados podrían diferir porque empleamos una línea celular ya diferenciada (condrocitos), la cual no atraviesa una fase de diferenciación, y en este contexto los patrones de expresión de COL2A1 pueden variar [235]. En consecuencia, los componentes bioactivos de los extractos podrían modular esta línea celular de manera distinta.

En cuanto a la síntesis de componentes de la matriz extracelular, se observó un incremento notable en los niveles de expresión de ACAN cuando se utilizó la combinación de MCA_d y MMA_d, alcanzando valores casi cuatro veces superiores a los registrados con el tratamiento exclusivo de MMA_d, lo que evidencia un efecto sinérgico en la estimulación de la producción de MEC. Además, uno de los principales retos en el uso de condrocitos *in vitro* es su tendencia a desdiferenciarse tras varios pases de cultivo; por ello, deben emplearse en los primeros tres pasajes para mantener su fenotipo condrogénico funcional [236]. En este sentido, el microambiente proporcionado por la combinación MCA_d + MMA_d parece contribuir a preservar dicha identidad celular. Asimismo, la ausencia de expresión de RUNX2 en los grupos tratados con MCA_d, ya sea solo o en combinación con MMA_d, sugiere que este sistema no favorece la diferenciación osteogénica, lo cual es crucial para evitar una mineralización no deseada. En cuanto a la comparación individual, MMA_d indujo mayores niveles de ACAN que MCA_d, lo que puede atribuirse a las concentraciones más altas de TGF- β presentes en la membrana amniótica en comparación con el cartílago articular [12,15].

Otro aspecto relevante a considerar es la diferencia en el modo de incorporación de las matrices descelularizadas en los sistemas de cultivo. En múltiples estudios previos [208,233,234,237,238], las matrices descelularizadas se integraron directamente dentro de andamios tridimensionales, lo que puede limitar la disponibilidad inmediata de sus componentes bioactivos. En estos modelos, la liberación de factores funcionales depende del grado de degradación y remodelación del biomaterial, por lo que los efectos sobre las

células suelen manifestarse de forma más gradual [239,240], reportándose cambios relevantes en la expresión génica entre los días 7 y 14 de cultivo [241]. En contraste, el enfoque utilizado en este estudio consistió en aplicar extractos solubles de las matrices directamente en cultivo 2D, lo que permitió una exposición inmediata de los condrocitos a los componentes activos, como proteínas de matriz, factores de crecimiento y glicoproteínas biofuncionales. Esta diferencia metodológica podría explicar por qué en nuestros resultados la mayoría de los genes evaluados mostraron un pico de expresión alrededor de las 48 horas, seguido de una disminución progresiva. La respuesta rápida sugiere una activación inmediata de rutas anabólicas inducida por la biodisponibilidad temprana de señales microambientales contenidas en la MCAAd y la MMAAd [242].

En conjunto, los resultados obtenidos indican que las matrices descelularizadas derivadas de cartílago articular y membrana amniótica no solo son capaces de promover la proliferación celular, sino que también favorecen el mantenimiento del linaje condrogénico de los condrocitos humanos en condiciones *in vitro*. Más aún, la combinación de ambas matrices generó un efecto aditivo en la expresión de marcadores condrogénicos clave como SOX9, ACAN y COL2A1, al tiempo que suprimió la expresión de genes asociados con rutas no deseadas como RUNX2, COL1A2 y COL10A1. Esta respuesta integrada sugiere que la interacción sinérgica entre los componentes bioactivos de la MMAAd y la MCAAd ofrece un microambiente funcionalmente superior al de cada matriz por separado.

La formulación exitosa del andamio FCMA, que integra las concentraciones óptimas de MCAAd y MMAAd, resalta la relevancia de los andamios compuestos para replicar las señales bioquímicas y mecánicas del cartílago nativo. Las concentraciones finales de 1.5 mg/mL para la MCAAd y 6 mg/mL para la MMAAd fueron seleccionadas por su capacidad para mantener la viabilidad celular y el linaje condrogénico, en concordancia con estudios previos que destacan el papel de los componentes derivados de la MEC en la modulación del comportamiento celular [207,208].

La evaluación de diferentes concentraciones de trombina durante el proceso de polimerización fue crucial para estandarizar la fabricación del andamio. La elección de

125 UI de trombina proporcionó un intervalo de tiempo manipulable y resultó en constructos con mayor consistencia, lo cual coincide con reportes que indican que el control preciso de las condiciones de polimerización mejora la homogeneidad y las propiedades mecánicas de los andamios [243]. El ligero incremento en el peso observado en el andamio FCMA en comparación con el control de fibrina sugiere una integración efectiva de las matrices, una modificación que se ha asociado con una mayor bioactividad y complejidad estructural de los biomateriales [244,245]. Estas características son fundamentales para replicar el microambiente nativo del cartílago hialino y favorecer los procesos condrogénicos subsecuentes.

La evaluación del perfil de degradación del andamio FCMA bajo condiciones celulares y acelulares durante 28 días demostró una estabilidad superior en comparación con el andamio de control. La menor tasa de degradación observada en el andamio FCMA, tanto en presencia como en ausencia de condrocitos, sugiere una mayor resistencia estructural atribuida a la incorporación de las matrices de cartílago y membrana amniótica. Esta mayor estabilidad es fundamental en aplicaciones de ingeniería de tejidos, ya que proporciona un soporte temporal adecuado para la maduración celular y la producción de MEC [215,246]. En particular, la degradación reducida en condiciones acelulares ($0.5 \pm 0.3\%$ en FCMA frente a $3.0 \pm 0.9\%$ en el control al día 28) indica que la composición del andamio limita la hidrólisis espontánea y la descomposición proteolítica no mediada por células [247]. Asimismo, en condiciones celulares, la degradación más lenta del andamio FCMA ($7.5 \pm 1.3\%$) respecto al control ($10 \pm 2.7\%$) sugiere una mejor interacción con los condrocitos y una posible modulación de la actividad enzimática local, factores que han sido previamente relacionados con la incorporación de componentes de matriz nativa en biomateriales [248,249]. Estos resultados respaldan la idea que el FCMA ofrece un microambiente más estable que favorece los procesos condrogénicos a largo plazo, sin comprometer la integridad estructural durante las primeras etapas de diferenciación y síntesis de matriz.

Además de evaluar la degradación del andamio, se analizó la capacidad de los condrocitos humanos sembrados (1×10^6 células/andamio) para sobrevivir y adaptarse al microambiente generado por el andamio FCMA. Los resultados obtenidos mediante

tinción diferencial por fluorescencia revelaron una alta viabilidad celular en ambos grupos a lo largo de los 28 días de cultivo, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. No obstante, el andamio FCMA mostró de manera consistente una viabilidad superior al 98 %, manteniéndose cercana al 99 % en todos los puntos evaluados, lo que indica un entorno altamente citocompatible que favorece la estabilidad celular a largo plazo. Este comportamiento es comparable con lo reportado por Xie et al. (2022), quienes utilizaron andamios compuestos por micropartículas de matriz descelularizada de cartílago combinada con gelatina metacrilada (GelMA), observando tasas de viabilidad elevadas durante 21 días de cultivo en condrocitos humanos [250].

La alta citocompatibilidad observada en el presente estudio podría atribuirse a la presencia de componentes bioactivos conservados en la matriz de cartílago (MCAd) y la membrana amniótica (MMAd), los cuales han demostrado modular positivamente la respuesta celular. En línea con esto, Zeng et al. (2022) reportaron que compuestos derivados de matriz descelularizada de cartílago inducen una respuesta más estable en condrocitos a partir del día 14 de cultivo [251], mientras que Cao et al. (2021) observaron una mayor expresión de genes asociados a la supervivencia y al mantenimiento del fenotipo condrogénico cuando se empleaban biomateriales ricos en factores bioactivos derivados de la membrana amniótica, con efectos sostenidos hasta el día 28 [200].

El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia permitió confirmar las observaciones cualitativas sobre viabilidad, revelando un aumento progresivo y sostenido en la densidad celular dentro del andamio FCMA. Desde los primeros días del cultivo, se evidenció una mayor cantidad de células vivas por unidad de área en comparación con el grupo control, diferencia que se acentuó con el tiempo hasta alcanzar un incremento aproximado del 220 % al día 28. Estos resultados indican que el andamio funcionalizado no solo ofrece un microambiente favorable para la supervivencia celular, sino que también estimula de manera activa la proliferación de condrocitos en condiciones tridimensionales *in vitro*. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Mao et al. (2019), quienes demostraron que la inclusión de matriz extracelular descelularizada en sistemas de cultivo promueve la expansión celular y mejora la integridad fenotípica de condrocitos durante periodos superiores a 21 días [252]. De manera similar,

Bhattacharjee et al. (2020) observaron que la incorporación de membrana amniótica humana en hidrogeles reducía significativamente los niveles de apoptosis y favorecía una mayor densidad celular en cultivos de condrocitos mantenidos por más de dos semanas [247].

Asimismo, la disminución en la densidad celular observada en el grupo control a partir del día 14 podría estar relacionada con una menor capacidad del andamio de fibrina puro para sostener la proliferación celular en etapas tardías, posiblemente debido a una mayor degradación estructural y ausencia de señales bioactivas específicas [253]. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de que el andamio FCMA no solo mantiene la viabilidad celular, sino que también crea un microambiente dinámico que favorece la expansión y organización de los condrocitos, condiciones necesarias para la regeneración efectiva del cartílago.

La evaluación de la funcionalidad del andamio FCMA a través de la expresión génica de marcadores condrogénicos clave evidenció una fuerte capacidad para inducir y mantener la diferenciación de condrocitos humanos in vitro. En particular, la expresión de SOX9 mostró un aumento progresivo a partir del día 21, alcanzando niveles más de tres veces superiores a los del grupo control al día 28. Este comportamiento indica no solo una activación sostenida del linaje condrogénico, sino también una intensificación del mismo, atribuida a las señales bioactivas presentes en la matriz de cartílago articular y la membrana amniótica. Aunque estudios previos como los de Yeung et al. (2019) y Dufour et al. (2021) también han reportado un aumento en la expresión de SOX9 en andamios condrogénicos [254,255], en general, estos incrementos suelen ser más modestos (1.5 a 2 veces respecto al control), lo que destaca la mayor eficacia del FCMA en inducir este marcador clave. Esta activación es coherente con el papel ampliamente reconocido de SOX9 como regulador maestro de la condrogénesis, responsable tanto de iniciar el programa transcripcional condrogénico como de inhibir vías de diferenciación alternativas, como la diferenciación osteogénica, regulada por RUNX2 como se ha descrito previamente [256].

El mantenimiento de niveles elevados de COL2A1 a lo largo del cultivo en los andamios FCMA refuerza la capacidad de este enfoque para preservar el fenotipo condrogénico de los condrocitos humanos. A diferencia del grupo control, en el que la expresión de este gen se mantuvo en niveles consistentemente bajos, los condrocitos cultivados en el andamio funcionalizado conservaron una expresión sostenida de COL2A1, codificante del colágeno tipo II, principal componente estructural de la matriz del cartílago hialino. Este comportamiento contrasta con lo reportado por Liang et al. (2017) y Rikkers et al. (2020), quienes observaron una disminución progresiva de la expresión de COL2A1 en cultivos tridimensionales cuando no se incorporaban señales bioactivas específicas en el microambiente [257,258]. De igual forma, Witt et al. (2017) documentaron una pérdida significativa del linaje condrogénico en condrocitos cultivados sin estímulos adecuados, evidenciada precisamente por la reducción de este marcador [259]. Frente a ello, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la inclusión sinérgica de MCAd y MMAd dentro del andamio FCMA ofrece un entorno más competente para mantener la expresión de genes clave, evitando la desdiferenciación típica que suele ocurrir en condiciones no óptimas de cultivo.

La expresión elevada de ACAN, observada desde los primeros días de cultivo en los andamios FCMA, indica una activación temprana de los procesos biosintéticos asociados a la formación de matriz cartilaginosa. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que estudios previos han demostrado que la expresión de ACAN, codificante del proteoglicano agregcano, está directamente asociada con una alta actividad anabólica en condrocitos funcionales y con la preservación de las propiedades biomecánicas del cartílago hialino [260–262]. A diferencia de lo reportado en otros modelos, donde los niveles de ACAN tienden a disminuir significativamente después de la primera semana de cultivo, en este estudio se mantuvieron elevados hasta el día 28, aunque con una leve disminución progresiva. Esto sugiere que el andamio FCMA no solo induce una respuesta anabólica temprana, sino que también logra sostenerla en el tiempo, proporcionando un entorno bioactivo que favorece la regeneración de una matriz similar a la del cartílago hialino nativo.

Por otro lado, la expresión marcadamente baja de RUNX2 en el grupo FCMA, en comparación con el grupo control, sugiere una inhibición parcial pero sostenida de la vía osteogénica. Este resultado es deseable, ya que la activación de RUNX2 se ha asociado con la transición hacia una diferenciación osteoblástica y con el riesgo de osificación endocondral, un evento no deseado en estrategias de regeneración cartilaginosa [263,264]. En diversos estudios, se ha demostrado que la represión de RUNX2 favorece la estabilidad del fenotipo condrogénico y previene cambios hipertróficos o mineralizantes [256,265]. En este contexto, los datos obtenidos en el presente estudio refuerzan la idea de que el andamio FCMA no solo promueve marcadores anabólicos clave, sino que también evita la activación de rutas de diferenciación no deseadas.

En cuanto a la expresión de COL1A2, marcador asociado a la formación de cartílago fibroso, esta se mantuvo en niveles bajos en ambos grupos durante todo el periodo de cultivo. Sin embargo, el ligero aumento observado en el grupo control al día 14 podría estar indicando una transición fenotípica no deseada, posiblemente relacionada con condiciones de cultivo subóptimas o con la ausencia de señales regulatorias específicas. Este tipo de comportamiento ha sido descrito en ausencia de estímulos inhibidores adecuados, donde los condrocitos tienden a expresar genes vinculados con fenotipos fibróticos [266]. En contraste, el andamio funcionalizado con matriz de cartílago articular y membrana amniótica (FCMA) no solo estimuló consistentemente la expresión de marcadores condrogénicos, sino que también pareció ejercer un efecto reductor selectivo sobre genes relacionados con tejidos no hialinos. Esta doble acción, promotora de condrogénesis e inhibidora de rutas fibróticas, es fundamental para favorecer una regeneración específica del cartílago articular, como ha sido señalado recientemente por Armiento et al. (2019) en modelos de reparación tisular donde la especificidad fenotípica es determinante para el éxito funcional a largo plazo [267].

Finalmente, la expresión de COL10A1 en nuestros andamios fue prácticamente indetectable a lo largo de los 28 días. COL10A1 es un marcador de hipertrofia condrocítica, su ausencia indica que no se activaron rutas que conduzcan a la mineralización o hipertrofia terminal, eventos comúnmente asociados con una diferenciación no controlada [268,269]. Este hallazgo es relevante, ya que la hipertrofia

representa uno de los principales desafíos en estrategias de ingeniería de cartílago, y su supresión es un criterio esencial para validar la estabilidad del fenotipo condrogénico inducido por un biomaterial [270,271].

En conjunto, los resultados de expresión génica demuestran que el andamio FCMA cumple una doble función: estimula activamente la vía condrogénica y, al mismo tiempo, reprime rutas osteogénicas e indeseables, lo cual resulta fundamental para el desarrollo de tejido cartilaginoso funcional. Estos efectos son consistentes con los beneficios previamente atribuidos al uso de matrices derivadas de cartílago y membrana amniótica como componentes bioactivos en la ingeniería de tejidos [188,248,251].

La validación de la funcionalidad del andamio FCMA a nivel proteico mediante inmunohistoquímica reveló una expresión diferencial y regulada en el tiempo de componentes clave de la matriz extracelular del cartílago hialino. En particular, la señal inmunorreactiva para colágeno tipo II fue robusta y progresiva en los cultivos sobre el andamio FCMA, con marcación tanto intracitoplasmática como en la matriz circundante. Esta expresión aumentó visiblemente a partir del día 14 y alcanzó su punto máximo al día 28, reflejando no solo una síntesis activa del colágeno tipo II, sino también una adecuada secreción y organización en el entorno extracelular. En contraste, los andamios de control mostraron una inmunorreactividad débil y limitada a unas pocas células, sin evidencia clara de depósito en la matriz, lo cual sugiere una deficiente capacidad de inducción condrogénica en ausencia de señales bioactivas. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Goldberg-Bockhorn et al. (2022) quienes utilizaron matrices descelularizadas derivadas de cartílago porcino para estimular condrocitos humanos [272]. En sus estudios, se observó un aumento en la expresión de colágeno tipo II a partir del día 14, aunque el depósito extracelular fue menos evidente que en el presente trabajo. Por su parte, Cheng et al. (2011) y Lin et al. (2020) reportaron que la inclusión de matrices descelularizadas en sistemas tridimensionales favorece la acumulación de colágeno tipo II entre los días 21 y 28 [273,274], lo cual coincide estrechamente con la cinética observada en nuestros cultivos. Sin embargo, a diferencia de estos trabajos, el andamio FCMA mostró una señal homogénea e intensa desde etapas intermedias del cultivo, lo que sugiere que la combinación de MCA_d y MMA_d

ofrece un entorno microambiental más eficaz para la producción y organización del colágeno tipo II en condrocitos humanos.

De manera similar, la tinción de agrecano mostró un patrón temporal creciente en cultivos sobre el andamio FCMA, alcanzando una acumulación intensa y homogénea en la matriz para el día 28, en contraste con la señal débil y citoplasmática del grupo control. Dado que el agrecano es fundamental para la integridad biomecánica del cartílago y su función de amortiguación [261], su abundancia en el grupo FCMA sugiere una activación funcional del fenotipo condrogénico. Estudios recientes han destacado la importancia de estimular la síntesis de proteoglicanos para lograr una regeneración cartilaginosa efectiva, particularmente en condiciones de cultivo tridimensional [275,276].

Por otro lado, la expresión de colágeno tipo I, marcador característico de cartílago fibroso, mostró una disminución significativa en los cultivos con FCMA, lo que indica una supresión de rutas no deseadas asociadas a un fenotipo fibrocartilaginoso. Mientras que en el grupo control se mantuvo estable y moderada, en el FCMA se redujo más del 70% entre los días 1 y 28. Esta disminución refleja la capacidad del andamio para restringir la diferenciación hacia tejidos de menor calidad mecánica, un fenómeno también observado en modelos que incorporan señales inhibitorias o matrices biomiméticas específicas de cartílago hialino [183,277].

Los resultados de la puntuación semicuantitativa (H-score) confirmaron estas observaciones microscópicas, revelando diferencias significativas a favor del andamio FCMA en los marcadores de cartílago hialino (colágeno tipo II y agrecano) y una reducción progresiva en la expresión de colágeno tipo I. En comparación con otros sistemas de andamios, los valores de H-score obtenidos para colágeno tipo II en el grupo FCMA son superiores a los reportados por otros estudios que utilizaron fibrina pura [254] o biomateriales sintéticos [278] sin componentes extracelulares nativos. Este comportamiento podría explicarse por el carácter bioactivo del FCMA, el cual replica señales estructurales y bioquímicas propias del cartílago, facilitando la síntesis ordenada de MEC y la maduración fenotípica de los condrocitos.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de que el andamio FCMA no solo favorece la activación de programas de diferenciación condrogénica a nivel transcripcional, sino que también traduce dicha activación en la producción efectiva y organizada de componentes esenciales del cartílago hialino. Al mismo tiempo, limita la síntesis de colágeno tipo I, lo que sugiere un perfil fenotípico más estable y específico del tejido objetivo. Esta dualidad funcional es clave para el desarrollo de estrategias efectivas de ingeniería de tejidos orientadas a la reparación del cartílago articular.

El análisis histológico realizado mediante tinciones de hematoxilina/eosina (H&E) y Safranina O/Verde Rápido permitió evaluar la organización tridimensional de los condrocitos y el entorno extracelular en los andamios FCMA en comparación con el control. En los andamios de control, la morfología celular permaneció esférica y la distribución fue dispersa e individualizada, sin evidencia de formación de estructuras características del cartílago hialino. Este patrón coincide con lo reportado en sistemas tridimensionales donde la matriz no proporciona señales estructurales o bioquímicas que guíen la reorganización celular [278,279].

Por el contrario, los cultivos en andamios FCMA mostraron una evolución morfológica marcada y progresiva, evidenciando la formación de estructuras organizadas similares a lagunas condrocíticas desde el día 14. Esta reorganización celular es indicativa de un microambiente favorable que promueve interacciones célula-matriz y célula-célula necesarias para imitar la arquitectura del cartílago nativo [280]. Diversos estudios han demostrado que la formación de lagunas es un criterio esencial para validar el mantenimiento del fenotipo condrogénico en condiciones de cultivo tridimensional [281].

La presencia de matrices homogéneas y halos pericelulares en los cortes teñidos con Safranina O sugiere una activa síntesis de proteoglicanos y componentes de matriz rica en glicosaminoglucanos, componentes claves del cartílago hialino [282]. Estas características han sido relacionadas directamente con la capacidad de ciertos biomateriales de emular la rigidez, porosidad y composición bioquímica del cartílago articular, lo cual facilita la reconstitución estructural del tejido [283].

Además, estudios con andamios enriquecidos con matriz de cartílago descelularizada o derivados amnióticos han demostrado que estos materiales no solo promueven la viabilidad y diferenciación condrogénica, sino que también inducen una reconfiguración del entorno tridimensional que favorece la formación de estructuras lagunares y zonas isógenas en cultivo prolongado [284,285]. El comportamiento observado en el FCMA se alinea con estas observaciones, lo cual indica que la combinación de fibrina con matriz de cartílago y membrana amniótica puede inducir señales mecánicas y químicas que estimulan la condensación celular y la formación de dominios organizados [188,200].

La evolución estructural observada en los cortes histológicos también sugiere un acoplamiento funcional entre la producción de matriz extracelular y la reestructuración de la arquitectura celular, reflejando un proceso de maduración que emula el desarrollo endógeno del cartílago [286,287]. Este fenómeno es poco frecuente en cultivos tridimensionales in vitro y se considera un indicador de éxito en sistemas de ingeniería de tejidos orientados a la regeneración del cartílago articular.

En conjunto, estos hallazgos histológicos refuerzan la hipótesis de que el andamio FCMA no solo proporciona un entorno biocompatible, sino que además crea condiciones que favorecen la reestructuración celular y la producción organizada de matriz específica de cartílago hialino. Este comportamiento diferencial en comparación con el control pone de manifiesto la importancia de incorporar componentes bioactivos derivados del tejido nativo para lograr una regeneración estructural y funcional más cercana a la fisiología articular natural [188,251].

La tinción histológica con Safranina O/Verde Rápido permitió evaluar la producción y acumulación de GAGs, componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago hialino. En los andamios de control, la señal fue débil o ausente en todos los puntos de análisis, lo que sugiere una limitada capacidad para inducir la síntesis de proteoglicanos por parte de los condrocitos. Este comportamiento ha sido previamente reportado en cultivos tridimensionales con biomateriales que carecen de señales bioactivas específicas, resultando en un fenotipo celular inestable o parcialmente desdiferenciado [278].

Por el contrario, los cultivos realizados en los andamios FCMA mostraron una intensa tinción positiva desde etapas tempranas, la cual se intensificó progresivamente hacia el día 28, especialmente en las zonas adyacentes a la matriz de cartílago descelularizada (MCAAd). Este patrón sugiere una activación fenotípica condrogénica potenciada por la interacción directa con componentes del microambiente extracelular. La fuerte tinción intracelular y pericelular observada en la mayoría de los condrocitos es indicativa de una biosíntesis activa de GAGs, proceso indispensable para el ensamblaje de una matriz funcional de cartílago [288].

La acumulación de GAGs ha sido ampliamente asociada con la preservación de las propiedades biomecánicas del cartílago y con la funcionalidad de los condrocitos en cultivo tridimensional. Su detección mediante Safranina O es considerada un marcador clave de diferenciación y maduración condrogénica, incluso más sensible que algunos genes tradicionales cuando se evalúan resultados a nivel tisular [289]. La intensidad de la señal observada en el FCMA coincide con lo reportado en estudios donde se emplearon matrices naturales o hidrogeles enriquecidos con señales condrogénicas, los cuales promovieron la expresión fenotípica madura y la secreción de matriz rica en proteoglicanos [290,291].

La localización predominante de la señal en regiones donde se encontraba presente la MCAAd refuerza la hipótesis de que la matriz nativa actúa como un reservorio de señales inductoras de diferenciación, posiblemente a través de la liberación controlada de proteínas de la matriz o la presentación espacial de componentes estructurales [10]. Este tipo de retroalimentación entre célula y matriz ha sido identificado como un mecanismo clave en la consolidación del fenotipo condrogénico, particularmente en plataformas biomiméticas tridimensionales [53].

Finalmente, de acuerdo a nuestros resultados la presencia simultánea de lagunas bien definidas e intensa señal de Safranina O en el grupo FCMA sugiere no solo una preservación del linaje, sino un entorno que favorece la regeneración estructural del tejido cartilaginoso, acercándose a una arquitectura similar a la del cartílago articular nativo. Este nivel de organización celular y síntesis de matriz ha sido escasamente reportado en

modelos in vitro y representa un indicador de alto valor para la validación funcional de un andamio en aplicaciones de ingeniería de tejidos [292].

10. CONCLUSIONES

Se logró producir dos tipos de matrices descelularizadas y pulverizadas, una a partir de cartílago articular (MCA_d) y otra a partir de membrana amniótica (MMA_d), logrando eliminar más del 95% del contenido celular sin comprometer la integridad de la MEC. Ambas matrices conservaron los componentes estructurales y bioactivos esenciales del tejido nativo, como los colágenos, agreganos y GAGs, lo cual es clave para mantener la actividad biológica necesaria para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

Mediante estudios de viabilidad y proliferación celular, se determinó que las concentraciones óptimas de 1.5 mg/mL de MCA_d y 6 mg/mL de MMA_d fueron capaces de inducir una proliferación celular significativa a partir de las 72 horas, además de estimular la expresión de genes condrogénicos como SOX9 y ACAN, lo que sugiere un efecto sinérgico favorable sobre el fenotipo condrogénico. Estas condiciones fueron empleadas en la formulación de un andamio funcional compuesto por 110 mg de fibrina, 125 UI de trombina, y las concentraciones previamente mencionadas de MCA_d y MMA_d.

El andamio desarrollado, denominado FCMA, permitió mantener la viabilidad celular desde el primer día de cultivo, observándose un incremento progresivo en la proliferación celular que alcanzó un 250% al día 28. Además, este andamio demostró ser eficaz en preservar el linaje condrogénico de los condrocitos durante 28 días mediante la expresión sostenida de los genes SOX9 y COL2A1, y en revertir la expresión del marcador de fibrocartílago COL1A2 desde el día 14, lo cual indica una redirección del fenotipo celular hacia características propias del cartílago hialino.

El entorno tridimensional generado por el andamio permitió la formación de estructuras lagunares típicas del cartílago, replicando así un microambiente similar al del tejido nativo. Finalmente, se indujo de manera exitosa la producción de componentes específicos de la MEC de cartílago dentro del propio andamio, reforzando el potencial de esta estrategia como una alternativa prometedora para la regeneración de lesiones focales del cartílago articular.

11. PERSPECTIVAS

Uno de los pasos fundamentales para validar el potencial clínico de nuestra formulación es confirmar la eficacia de la descelularización mediante la cuantificación del ADN residual, asegurando así el cumplimiento de los criterios establecidos para el uso de biomateriales derivados de la matriz extracelular. Además, es necesario caracterizar las moléculas bioactivas presentes, identificando y cuantificando los factores de crecimiento y otras moléculas relevantes en la MCA_d y la MMA_d.

El siguiente paso de la caracterización del andamio FCMA consiste en la caracterización mecánica de sus propiedades estructurales. Dado que el cartílago articular está sometido a cargas mecánicas constantes en su entorno fisiológico, es crucial evaluar parámetros como la resistencia a la compresión, el módulo de elasticidad y la capacidad de recuperación elástica. Estos ensayos permitirán determinar si la formulación actual del andamio puede soportar las fuerzas articulares y mantener su integridad durante el tiempo necesario para la regeneración tisular, lo cual es esencial para su aplicación en defectos articulares de carga.

Además, será necesario realizar ensayos preclínicos en modelos animales para validar la seguridad y eficacia del andamio en condiciones fisiológicas reales. Estos estudios permitirán evaluar aspectos clave como la biocompatibilidad a largo plazo, la integración tisular, la inducción de respuestas inmunes locales, así como la capacidad del andamio para promover la regeneración del cartílago hialino *in vivo*. La elección del modelo animal deberá considerar características anatómicas y biomecánicas similares al cartílago humano, lo cual aumentará la validez translacional de los resultados obtenidos.

Por otro lado, con el fin de comprender en mayor profundidad los mecanismos biológicos que regulan el comportamiento celular dentro del andamio, se propone realizar un análisis de genes asociados con la remodelación de la MEC. En particular, la cuantificación de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), así como de otros genes relacionados con la síntesis y degradación de componentes cartilaginosos, proporcionará información valiosa sobre el equilibrio dinámico entre degradación y

regeneración del tejido. Estos análisis permitirán evaluar si el microambiente generado por el andamio favorece un proceso de remodelación controlado y adecuado para la restauración del cartílago articular.

Finalmente, los hallazgos obtenidos sientan las bases para la proyección del andamio FCMA hacia aplicaciones clínicas, particularmente en el tratamiento de lesiones focales del cartílago articular. Para ello, será necesario optimizar el diseño del sistema como una plataforma adaptable a diferentes tipos de defectos y pacientes, incluyendo la posibilidad de incorporar células autólogas o factores bioactivos según las necesidades terapéuticas específicas. Esta estrategia se alinea con el enfoque de medicina regenerativa personalizada, donde el uso de biomateriales funcionales puede representar una alternativa menos invasiva y más eficaz frente a los tratamientos convencionales.

REFERENCIAS

- [1] P. Karami, A. Laurent, V. Philippe, L.A. Applegate, D.P. Pioletti, R. Martin, Cartilage Repair: Promise of Adhesive Orthopedic Hydrogels, *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 9984 25 (2024) 9984. <https://doi.org/10.3390/IJMS25189984>.
- [2] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function, *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* 1 (2009) 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
- [3] L. Zhou, J. Xu, A. Schwab, W. Tong, J. Xu, L. Zheng, Y. Li, Z. Li, S. Xu, Z. Chen, L. Zou, X. Zhao, G.J.V.M. van Osch, C. Wen, L. Qin, Engineered biochemical cues of regenerative biomaterials to enhance endogenous stem/progenitor cells (ESPCs)-mediated articular cartilage repair, *Bioact Mater* 26 (2023) 490. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2023.03.008>.
- [4] H. Kutaish, A. Klopfenstein, S.N.O. Adorasio, P.M. Tscholl, S. Fucentese, Current trends in the treatment of focal cartilage lesions: a comprehensive review, *EFORT Open Rev* 10 (2025) 203–212. <https://doi.org/10.1530/EOR-2024-0083>.
- [5] K. Robson, R. Pope, R. Orr, Incidence and Risk Factors for Acute Articular Cartilage Tears in Military and Other Occupational Settings: A Systematic Review, *Healthcare* 2024, Vol. 12, Page 595 12 (2024) 595. <https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE12050595>.
- [6] J. Chahla, B.T. Williams, A.B. Yanke, J. Farr, The Large Focal Isolated Chondral Lesion, *Journal of Knee Surgery* 36 (2023) 368–381. <https://doi.org/10.1055/S-0041-1735278/ID/JR19DEC0027SSA-28/BIB>.
- [7] J. Naranda, M. Bračić, U. Maver, T. Trojner, Recent Advancements in Smart Hydrogel-Based Materials in Cartilage Tissue Engineering, *Materials* 2025, Vol. 18, Page 2576 18 (2025) 2576. <https://doi.org/10.3390/MA18112576>.
- [8] C.: Savsani, K.; Aitchison, A.H.; Allen, N.B.; Adams, E.A.; Adams, K. Savsani, A.H. Aitchison, N.B. Allen, E.A. Adams, S.B. Adams, The Use of Gelatin Methacrylate (GelMA) in Cartilage Tissue Engineering: A Comprehensive Review, *Bioengineering* 2025, Vol. 12, Page 700 12 (2025) 700. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING12070700>.
- [9] J.A.J.A. Rojas-Murillo, M.A.M.A. Simental-Mendía, N.K.N.K. Moncada-Saucedo, P. Delgado-Gonzalez, J.F.J.F. Islas, J.A.J.A. Roacho-Pérez, E.N.E.N. Garza-Treviño, Physical, Mechanical, and Biological Properties of Fibrin Scaffolds for Cartilage Repair, *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 9879 23 (2022) 9879. <https://doi.org/10.3390/IJMS23179879>.
- [10] F. Hashemi-Afzal, H. Fallahi, F. Bagheri, M.N. Collins, M.B. Eslaminejad, H. Seitz, Advancements in hydrogel design for articular cartilage regeneration: A comprehensive review, *Bioact Mater* 43 (2025) 1–31. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2024.09.005>.

- [11] S. Zhang, Y. Guo, Y. Lu, F. Liu, B.C. Heng, X. Deng, The considerations on selecting the appropriate decellularized ECM for specific regeneration demands, *Mater Today Bio* 29 (2024) 101301. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2024.101301>.
- [12] Q. Zhang, Y. Hu, X. Long, L. Hu, Y. Wu, J. Wu, X. Shi, R. Xie, Y. Bi, F. Yu, P. Li, Y. Yang, Preparation and Application of Decellularized ECM-Based Biological Scaffolds for Articular Cartilage Repair: A Review, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022) 908082. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.908082/PDF>.
- [13] J. Xu, N. Jiang, S. Zhu, M. Alini, S. Grad, J. Geurts, Z. Li, Decellularized extracellular matrix-based hydrogels for cartilage repair and regeneration, *Advanced Orthopaedics* 1 (2025) 83–97. <https://doi.org/10.1016/J.ADVOP.2024.12.002>.
- [14] F. Alibabaei-Omran, N. Javanmehr, A. Al-e-Ahmad, E. Zabihi, T. Najafi, Viewing Decellularized Amniotic Membrane Through the Lens of Coupled Scaffolding and Drug Delivery Systems in Regenerative Medicine, *J Tissue Eng Regen Med* 2025 (2025) 8818058. <https://doi.org/10.1155/TERM/8818058>.
- [15] Z. Macečková, J. Pergner, M. Krbec, M. Urban, M. Zahradníček, Application of amniotic membrane in osteoarthritis management, *Journal of Cartilage & Joint Preservation* 5 (2025) 100174. <https://doi.org/10.1016/J.JCJP.2024.100174>.
- [16] A. Rojas-Murillo, J. Lara-Arias, H. Leija-Gutiérrez, R. Franco-Márquez, N.K. Moncada-Saucedo, A. Guzmán-López, F. Vilchez-Cavazos, E.N. Garza-Treviño, M. Simental-Mendía, The Combination of Decellularized Cartilage and Amniotic Membrane Matrix Enhances the Production of Extracellular Matrix Elements in Human Chondrocytes, *Coatings* 14 (2024) 1083. <https://doi.org/10.3390/COATINGS14091083>.
- [17] X. Lin, Y. Zhang, J. Li, B.G. Oliver, B. Wang, H. Li, K.T. Yong, J.J. Li, Biomimetic multizonal scaffolds for the reconstruction of zonal articular cartilage in chondral and osteochondral defects, *Bioact Mater* 43 (2025) 510–549. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2024.10.001>.
- [18] L. March, C. Little, ARTICULAR CARTILAGE IN HEALTH AND DISEASE, in: *The Musculoskeletal System*, Elsevier, 2010: pp. 77–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3377-3.00006-8>.
- [19] A. Karimizade, E. Hasanzadeh, M. Abasi, S.E. Enderami, E. Mirzaei, N. Annabi, A. Mellati, Collagen short nanofiber-embedded chondroitin sulfate–hyaluronic acid nanocomposite: A cartilage-mimicking in situ-forming hydrogel with fine-tuned properties, *Int J Biol Macromol* 266 (2024) 131051. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.131051>.
- [20] Z. Chen, C. Du, S. Liu, J. Liu, Y. Yang, L. Dong, W. Zhao, W. Huang, Y. Lei, Progress in biomaterials inspired by the extracellular matrix, *Giant* 19 (2024) 100323. <https://doi.org/10.1016/J.GIANT.2024.100323>.
- [21] X. Wang, H. Xu, Y. Huang, S. Gu, J.X. Jiang, Coupling Effect of Water and Proteoglycans on the In Situ Toughness of Bone, *Journal of Bone and Mineral Research* 31 (2016) 1026–1029. <https://doi.org/10.1002/JBMR.2774>.

- [22] A.A. Cederlund, R.M. Aspden, Walking on water: revisiting the role of water in articular cartilage biomechanics in relation to tissue engineering and regenerative medicine, *J R Soc Interface* 19 (2022). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2022.0364>.
- [23] T. Minas, J. Glowacki, Cartilage Repair and Regeneration, *A Primer in Cartilage Repair and Joint Preservation of the Knee* (2011) 8–21. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6654-5.00002-X>.
- [24] A. Nahian, A. Sapra, *Histology, Chondrocytes*, 2025.
- [25] A.C. Shieh, K.A. Athanasiou, Biomechanics of single zonal chondrocytes, *J Biomech* 39 (2006) 1595–1602. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2005.05.002>.
- [26] E. Vinod, K. Padmaja, A. Livingston, J.V. James, S.M. Amirtham, S. Sathishkumar, B. Ramasamy, G. Rebekah, A.J. Daniel, U. Kachroo, Prospective Isolation and Characterization of Chondroprogenitors from Human Chondrocytes Based on CD166/CD34/CD146 Surface Markers, *Cartilage* 13 (2021) 808S-817S. https://doi.org/10.1177/19476035211042412/SUPPL_FILE/SJ-TIF-1-CAR-10.1177_19476035211042412.TIF.
- [27] H. Akkiraju, A. Nohe, R.W. Dettman, A. Wessels, Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration, *Journal of Developmental Biology* 2015, Vol. 3, Pages 177-192 3 (2015) 177–192. <https://doi.org/10.3390/JDB3040177>.
- [28] S.R. Herlofsen, A.M. K uchler, J.E. Melvik, J.E. Brinchmann, Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Self-Gelling Alginate Discs Reveals Novel Chondrogenic Signature Gene Clusters, <https://Home.Liebertpub.Com/Tea> 17 (2010) 1003–1013. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2010.0499>.
- [29] M. Kondo, K. Yamaoka, Y. Tanaka, Acquiring Chondrocyte Phenotype from Human Mesenchymal Stem Cells under Inflammatory Conditions, *International Journal of Molecular Sciences* 2014, Vol. 15, Pages 21270-21285 15 (2014) 21270–21285. <https://doi.org/10.3390/IJMS151121270>.
- [30] K. Zhang, L. Wang, Z. Liu, B. Geng, Y. Teng, X. Liu, Q. Yi, D. Yu, X. Chen, D. Zhao, Y. Xia, Mechanosensory and Mechanotransductive Processes Mediated by Ion Channels in Articular Chondrocytes: Potential Therapeutic Targets for Osteoarthritis, *Channels* (2021). <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1903184>.
- [31] J. Chaumel, M. Schotte, J.J. Bizzarro, P. Zaslansky, P. Fratzl, D. Baum, M.N. Dean, Co-aligned chondrocytes: Zonal morphological variation and structured arrangement of cell lacunae in tessellated cartilage, *Bone* 134 (2020) 115264. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2020.115264>.
- [32] T. Dehne, C. Karlsson, J. Ringe, M. Sittinger, A. Lindahl, Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation, *Arthritis Res Ther* 11 (2009) 1–14. <https://doi.org/10.1186/AR2800/FIGURES/5>.

- [33] V. Lefebvre, M. Dvir-Ginzberg, SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage, *Connect Tissue Res* 58 (2017) 2–14.
<https://doi.org/10.1080/03008207.2016.1183667>.
- [34] L. Zheng, Z. Zhang, P. Sheng, A. Mobasher, The role of metabolism in chondrocyte dysfunction and the progression of osteoarthritis, *Ageing Res Rev* 66 (2021) 101249.
<https://doi.org/10.1016/J.ARR.2020.101249>.
- [35] Y.Y. Chu, A. Hikita, Y. Asawa, K. Hoshi, Advancements in chondrocyte 3-dimensional embedded culture: Implications for tissue engineering and regenerative medicine, *Biomed J* 48 (2025) 100786. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2024.100786>.
- [36] J. Lu, Y. Gao, C. Cao, H. Wang, Y. Ruan, K. Qin, H. Liu, Y. Wang, P. Yang, Y. Liu, Y. Ma, Z. Yu, Y. Wang, Z. Zhong, F. Chang, 3D bioprinted scaffolds for osteochondral regeneration: advancements and applications, *Mater Today Bio* 32 (2025) 101834.
<https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2025.101834>.
- [37] E.R. Onainor, *Articular Cartilage*, Second Edition, CRC Press, 2017.
<https://doi.org/10.1201/9781315194158>.
- [38] L. Luo, J.Y.J. Chu, R. Eswaramoorthy, K.J. Mulhall, D.J. Kelly, Engineering Tissues That Mimic the Zonal Nature of Articular Cartilage Using Decellularized Cartilage Explants Seeded with Adult Stem Cells, *ACS Biomater Sci Eng* 3 (2017) 1933–1943.
https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.6B00020/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB-2016-00020C_0011.GIF.
- [39] X. Chen, J. Li, E. Wang, Q. Zhao, Z. Kong, X. Yuan, Dynamic compression combined with SOX-9 overexpression in rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in a three-dimensional gradual porous PLGA composite scaffold upregulates HIF-1 α expression, *J Biomed Mater Res A* 103 (2015) 3886–3895. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.35530>.
- [40] T. Mange, W. Lai, D. Wang, Cell biology and pathology of cartilage and meniscus, *Cartilage Tissue and Knee Joint Biomechanics: Fundamentals, Characterization and Modelling* (2024) 47–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90597-8.00036-0>.
- [41] D. Zhu, P. Trinh, E.K. Liu, F. Yang, Biochemical and Mechanical Gradients Synergize to Enhance Cartilage Zonal Organization in 3D, *ACS Biomater Sci Eng* (2018).
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00775>.
- [42] C. Müller, A. Khabut, J. Dudhia, F.P. Reinholt, A. Aspberg, D. Heinegård, P. Önnerfjord, Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution, *Matrix Biology* 40 (2014) 34–45.
<https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2014.08.013>.
- [43] L. Guo, P. Li, X. Rong, X. Wei, Key roles of the superficial zone in articular cartilage physiology, pathology, and regeneration, *Chin Med J (Engl)* (2024).
<https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000003319>.

- [44] J. Hu, K. Zheng, B.E. Sherlock, J. Zhong, J. Mansfield, E. Green, A.D. Toms, C.P. Winlove, J. Chen, Zonal Characteristics of Collagen Ultrastructure and Responses to Mechanical Loading in Articular Cartilage, *Acta Biomater* 195 (2025) 104–116. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2025.01.047>.
- [45] N.K. Dubey, W.-P. Deng, Polymeric gels for cartilage tissue engineering, *Polymeric Gels* (2018) 505–525. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102179-8.00020-X>.
- [46] P. Krakowski, A. Rejniak, J. Sobczyk, R. Karpiński, Cartilage Integrity: A Review of Mechanical and Frictional Properties and Repair Approaches in Osteoarthritis, *Healthcare* 2024, Vol. 12, Page 1648 12 (2024) 1648. <https://doi.org/10.3390/HEALTHCARE12161648>.
- [47] L.T. Brody, Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function, *Physical Therapy in Sport* 16 (2015) 301–316. <https://doi.org/10.1016/J.PTSP.2014.12.001>.
- [48] G.D. Jay, K.A. Waller, The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion, *Matrix Biology* 39 (2014) 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2014.08.008>.
- [49] Y. Lee, J. Choi, N.S. Hwang, Regulation of lubricin for functional cartilage tissue regeneration: A review, *Biomater Res* 22 (2018). <https://doi.org/10.1186/S40824-018-0118-X/ASSET/9787B64C-0964-48A0-8357-D5F3324577FE/ASSETS/GRAPHIC/S40824-018-0118-X.FIG.004.GIF>.
- [50] Y. Gao, S. Liu, J. Huang, W. Guo, J. Chen, L. Zhang, B. Zhao, J. Peng, A. Wang, Y. Wang, W. Xu, S. Lu, M. Yuan, Q. Guo, The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes, *Biomed Res Int* 2014 (2014) 648459. <https://doi.org/10.1155/2014/648459>.
- [51] D. Chen, L.R. Smith, G. Khandekar, P. Patel, C.K. Yu, K. Zhang, C.S. Chen, L. Han, R.G. Wells, Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization, *BioRxiv* (2020) 2020.08.30.274001. <https://doi.org/10.1101/2020.08.30.274001>.
- [52] R. Karpí Nski, A. Prus, J. Baj, S. Radej, M. Prz, Adka, P. Krakowski, K. Jonak, Articular Cartilage: Structure, Biomechanics, and the Potential of Conventional and Advanced Diagnostics, *Applied Sciences* 2025, Vol. 15, Page 6896 15 (2025) 6896. <https://doi.org/10.3390/APP15126896>.
- [53] N. Wang, Y. Lu, B.B. Rothrauff, A. Zheng, A. Lamb, Y. Yan, K.E. Lipa, G. Lei, H. Lin, Mechanotransduction pathways in articular chondrocytes and the emerging role of estrogen receptor- α , *Bone Research* 2023 11:1 11 (2023) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00248-x>.
- [54] E. del Río, Rethinking Osteoarthritis Management: Synergistic Effects of Chronoexercise, Circadian Rhythm, and Chondroprotective Agents, *Biomedicines* 2025, Vol. 13, Page 598 13 (2025) 598. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES13030598>.

- [55] A.C. Hall, The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype— Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering, *Curr Rheumatol Rep* 21 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11926-019-0837-6/FIGURES/1>.
- [56] Y. Tsuyuguchi, T. Nakasa, M. Ishikawa, S. Miyaki, R. Matsushita, M. Kanemitsu, N. Adachi, The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration, *Cartilage* (2018). <https://doi.org/10.1177/1947603518805205>.
- [57] J.A. Choi, G.E. Gold, MR Imaging of Articular Cartilage Physiology, *Magn Reson Imaging Clin N Am* 19 (2011) 249. <https://doi.org/10.1016/J.MRIC.2011.02.010>.
- [58] L. Alcaide-Ruggiero, V. Molina-Hernández, M.M. Granados, J.M. Domínguez, Main and Minor Types of Collagens in the Articular Cartilage: The Role of Collagens in Repair Tissue Evaluation in Chondral Defects, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 13329. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413329>.
- [59] A.H.K. Plaas, M.M. Moran, J.D. Sandy, V.C. Hascall, Aggrecan and Hyaluronan: The Infamous Cartilage Polyelectrolytes – Then and Now, *Adv Exp Med Biol* 1402 (2023) 3–29. https://doi.org/10.1007/978-3-031-25588-5_1/FIGURES/5.
- [60] K.A. Athanasiou, E.M. Darling, J.C. Hu, *Articular Cartilage Tissue Engineering*, (2010). <https://doi.org/10.1007/978-3-031-02578-5>.
- [61] D.E. Anderson, B. Johnstone, Dynamic Mechanical Compression of Chondrocytes for Tissue Engineering: A Critical Review, *Front Bioeng Biotechnol* 5 (2017) 76. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2017.00076>.
- [62] H.Y. Ng, K.-X.A. Lee, Y.-F. Shen, *Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair*, *JSM Bone and Joint Diseases*,;1(2):1-6 1 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.47739/1010>.
- [63] J.P.K. Armstrong, E. Pchelintseva, S. Treumuth, C. Campanella, C. Meinert, T.J. Klein, D.W. Hutmacher, B.W. Drinkwater, M.M. Stevens, Tissue Engineering Cartilage with Deep Zone Cytoarchitecture by High-Resolution Acoustic Cell Patterning, *Adv Healthc Mater* 11 (2022) 2200481. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202200481>.
- [64] J. Eschweiler, N. Horn, B. Rath, M. Betsch, A. Baroncini, M. Tingart, F. Migliorini, The Biomechanics of Cartilage—An Overview, *Life* 2021, Vol. 11, Page 302 11 (2021) 302. <https://doi.org/10.3390/LIFE11040302>.
- [65] E. Han, S.S. Chen, S.M. Klisch, R.L. Sah, Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage, *Biophys J* 101 (2011) 916–924. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2011.07.006/ATTACHMENT/4820D624-0418-46DE-8DC1-A5D97373A8B7/MMC1.PDF>.
- [66] S. Davis, M. Roldo, G. Blunn, G. Tozzi, T. Roncada, Influence of the Mechanical Environment on the Regeneration of Osteochondral Defects, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 603408. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.603408/XML/NLM>.

- [67] N. Chen, R.W.H. Wu, Y. Lam, W.C.W. Chan, D. Chan, Hypertrophic chondrocytes at the junction of musculoskeletal structures, *Bone Rep* 19 (2023) 101698. <https://doi.org/10.1016/J.BONR.2023.101698>.
- [68] T. Han, T. Zhu, Y. Lu, Q. Wang, H. Bian, J. Chen, L. Qiao, T.-C. He, Q. Zheng, Collagen type X expression and chondrocyte hypertrophic differentiation during OA and OS development, *Am J Cancer Res* 14 (2024) 1784. <https://doi.org/10.62347/JWGW7377>.
- [69] B. Kurz, T. Lange, M. Voelker, M.L. Hart, B. Rolauffs, Articular Cartilage—From Basic Science Structural Imaging to Non-Invasive Clinical Quantitative Molecular Functional Information for AI Classification and Prediction, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 14974 24 (2023) 14974. <https://doi.org/10.3390/IJMS241914974>.
- [70] X. Ahmadpoor, J. Sun, N. Douglas, W. Zhu, H. Lin, Hydrogel-Enhanced Autologous Chondrocyte Implantation for Cartilage Regeneration—An Update on Preclinical Studies, *Bioengineering* 2024, Vol. 11, Page 1164 11 (2024) 1164. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING11111164>.
- [71] M.A.J. Finnilä, S. Das Gupta, M.J. Turunen, I. Hellberg, A. Turkiewicz, V. Lutz-Bueno, E. Jonsson, M. Holler, N. Ali, V. Hughes, H. Isaksson, J. Tjörnstrand, P. Önnarfjord, M. Guizar-Sicairos, S. Saarakkala, M. Englund, Mineral Crystal Thickness in Calcified Cartilage and Subchondral Bone in Healthy and Osteoarthritic Human Knees, *Journal of Bone and Mineral Research* 37 (2022) 1700. <https://doi.org/10.1002/JBMR.4642>.
- [72] Y. Zhang, F. Wang, H. Tan, G. Chen, L. Guo, L. Yang, Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone, *Int J Med Sci* 9 (2012) 353. <https://doi.org/10.7150/IJMS.4276>.
- [73] M. Mendler, S.G. Eich-Bender, L. Vaughan, K.H. Winterhalter, P. Bruckner, Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI, *J Cell Biol* 108 (1989) 191. <https://doi.org/10.1083/JCB.108.1.191>.
- [74] L.A.E. Evans, A.A. Pitsillides, Structural clues to articular calcified cartilage function: A descriptive review of this crucial interface tissue, *J Anat* 241 (2022) 875. <https://doi.org/10.1111/JOA.13728>.
- [75] Y. Zhang, F. Wang, H. Tan, G. Chen, L. Guo, L. Yang, Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone, *Int J Med Sci* 9 (2012) 353–360. <https://doi.org/10.7150/IJMS.4276>.
- [76] T.J. Lyons, R.W. Stoddart, S.F. McClure, J. McClure, The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint, *J Mol Histol* 36 (2005) 207–215. <https://doi.org/10.1007/S10735-005-3283-X/METRICS>.
- [77] J.H. Cheng, W.Y. Chou, C.J. Wang, K.K. Siu, J.M. Peng, Y.N. Wu, M.S. Lee, C.Y. Huang, J.Y. Ko, S.W. Jhan, Pathological, Morphometric and Correlation Analysis of the Modified Mankin Score, Tidemark Roughness and Calcified Cartilage Thickness in Rat Knee Osteoarthritis after Extracorporeal Shockwave Therapy, *Int J Med Sci* 19 (2022) 242–256. <https://doi.org/10.7150/IJMS.67741>.

- [78] H. Hu, W. Liu, C. Sun, Q. Wang, W. Yang, Z.C. Zhang, Z. Xia, Z. Shao, B. Wang, Endogenous Repair and Regeneration of Injured Articular Cartilage: A Challenging but Promising Therapeutic Strategy, *Aging Dis* 12 (2021) 886. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0902>.
- [79] S. ur Rehman, S. Iqbal, M.U. Shahid, M.S. Jahangir, A.L. Malik, S. ur Rehman, S. Iqbal, M.U. Shahid, M.S. Jahangir, A.L. Malik, Cartilage: Structure, Function, and the Pathogenesis of Osteoarthritis, *Advancements in Synovial Joint Science - Structure, Function, and Beyond* (2024). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.1003264>.
- [80] X.L. Yuan, H.Y. Meng, Y.C. Wang, J. Peng, Q.Y. Guo, A.Y. Wang, S.B. Lu, Bone–cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies, *Osteoarthritis Cartilage* 22 (2014) 1077–1089. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2014.05.023>.
- [81] G. Merkely, J. Ackermann, C. Lattermann, Articular Cartilage Defects: Incidence, Diagnosis, and Natural History, *Oper Tech Sports Med* 26 (2018) 156–161. <https://doi.org/10.1053/J.OTSM.2018.06.008>.
- [82] S. Grässel, J. Lorenz, Tissue-Engineering Strategies to Repair Chondral and Osteochondral Tissue in Osteoarthritis: Use of Mesenchymal Stem Cells, *Curr Rheumatol Rep* 16 (2014) 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11926-014-0452-5/TABLES/2>.
- [83] M. Mohammad Sadeghi, E. Aşık, P. Emans, F. Zijta, N. Tümer, G. Tuijthof, A. Roth, Knee focal cartilage defect location heat map and local surface morphology characterisation: Insights for focal knee resurfacing implant design, *J Exp Orthop* 12 (2025) e70216. <https://doi.org/10.1002/JEO2.70216>.
- [84] B.C. Marchi, E.M. Arruda, R.M. Coleman, The Effect of Articular Cartilage Focal Defect Size and Location in Whole Knee Biomechanics Models, *J Biomech Eng* 142 (2020). <https://doi.org/10.1115/1.4044032/955399>.
- [85] Y. Dabiri, L. Li, Focal cartilage defect compromises fluid-pressure dependent load support in the knee joint, *Int J Numer Method Biomed Eng* 31 (2015). <https://doi.org/10.1002/CNM.2713>.
- [86] Y. Liu, K.M. Shah, J. Luo, Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 770655. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.770655>.
- [87] K.R. Gratz, B.L. Wong, W.C. Bae, R.L. Sah, The Effects of Focal Articular Defects on Cartilage Contact Mechanics, *J Orthop Res* 27 (2009) 584. <https://doi.org/10.1002/JOR.20762>.
- [88] Y. He, Z. Li, P.G. Alexander, B.D. Ocasio-Nieves, L. Yocum, H. Lin, R.S. Tuan, Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models, *Biology (Basel)* 9 (2020) 194. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9080194>.
- [89] K.P.H. Pritzker, S. Gay, S.A. Jimenez, K. Ostergaard, J.P. Pelletier, K. Revell, D. Salter, W.B. van den Berg, Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging, *Osteoarthritis Cartilage* 14 (2006) 13–29. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2005.07.014>.

- [90] L. Zhang, J. Hu, K.A. Athanasiou, The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration, *Crit Rev Biomed Eng* 37 (2009) 1. <https://doi.org/10.1615/CRITREVBIOEMEDENG.V37.I1-2.10>.
- [91] J.A. Buckwalter, H.J. Mankin, A.J. Grodzinsky, Articular cartilage and osteoarthritis., *Instr Course Lect* 54 (2005) 465–80.
- [92] J.S. Everhart, M.M. Abouljoud, J.C. Kirven, D.C. Flanigan, Full-Thickness Cartilage Defects Are Important Independent Predictive Factors for Progression to Total Knee Arthroplasty in Older Adults with Minimal to Moderate Osteoarthritis: Data from the Osteoarthritis Initiative, *Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume* 101 (2019) 56–63. <https://doi.org/10.2106/JBJS.17.01657>.
- [93] H. Kutaish, A. Klopfenstein, S.N.O. Adorisio, P.M. Tscholl, S. Fucentese, Current trends in the treatment of focal cartilage lesions: a comprehensive review, *EFORT Open Rev* 10 (2025) 203–212. <https://doi.org/10.1530/EOR-2024-0083>.
- [94] K. Solanki, S. Shanmugasundaram, N. Shetty, S.J. Kim, Articular cartilage repair & joint preservation: A review of the current status of biological approach, *J Clin Orthop Trauma* 22 (2021) 101602. <https://doi.org/10.1016/J.JCOT.2021.101602>.
- [95] T.L. Fernandes, J.P.C. SantAnna, M.S. Boff, C.G. Tabet, B.B. Hinckel, S.L. Sherman, C. Lattermann, Age-related surgical management of chondral and osteochondral lesions, *Journal of Cartilage & Joint Preservation* 4 (2024) 100172. <https://doi.org/10.1016/J.JCJP.2024.100172>.
- [96] M. Falah, G. Nierenberg, M. Soudry, M. Hayden, G. Volpin, Treatment of articular cartilage lesions of the knee, *Int Orthop* 34 (2010) 621. <https://doi.org/10.1007/S00264-010-0959-Y>.
- [97] C.W. Hunter, T.R. Deer, M.R. Jones, G.C. Chang Chien, R.S. D'souza, T. Davis, E.R. Eldon, M.F. Esposito, J.H. Goree, L. Hewan-Lowe, J.A. Maloney, A.J. Mazzola, J.S. Michels, A. Layno-Moses, S. Patel, J. Tari, J.S. Weisbein, K.A. Goulding, A. Chhabra, J. Hassebrock, C. Wie, D. Beall, D. Sayed, N. Strand, Consensus Guidelines on Interventional Therapies for Knee Pain (STEP Guidelines) from the American Society of Pain and Neuroscience, *J Pain Res* 15 (2022) 2683. <https://doi.org/10.2147/JPR.S370469>.
- [98] S. Marlovits, T.C. Mamisch, G. Vekszler, C. Resinger, S. Trattnig, Magnetic resonance imaging for diagnosis and assessment of cartilage defect repairs, *Injury* 39 Suppl 1 (2008) 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2008.01.043>.
- [99] Z.S. Aman, A.A. Champagne, E.T. Hurley, R.M. Danilkowicz, M.G. Ciccotti, M.T. Hirschmann, F. Figueroa, K.J. Jones, I.R. Murray, F.J. Shannon, L.M. Jazrawi, Diagnosis of knee cartilage injuries—an international Delphi consensus statement, *Journal of Cartilage & Joint Preservation* 4 (2024) 100196. <https://doi.org/10.1016/J.JCJP.2024.100196>.
- [100] S.B. Elmholt, K.C. Hede, B.B. Christensen, J.S. Thomsen, M. Lind, The Effect of Bone Marrow Stimulation for Cartilage Repair on the Subchondral Bone Plate, *Cartilage* 13 (2022) 19476035221074012. <https://doi.org/10.1177/19476035221074011>.

- [101] A.R. Memon, J.F. Quinlan, Surgical Treatment of Articular Cartilage Defects in the Knee: Are We Winning?, *Adv Orthop* 2012 (2012) 528423. <https://doi.org/10.1155/2012/528423>.
- [102] G.C. Gracitelli, V.Y. Moraes, C.E.S. Franciozi, M. V. Luzo, J.C. Belloti, Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults, *Cochrane Database Syst Rev* 2016 (2016) CD010675. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010675.PUB2>.
- [103] D. Douleh, R.M. Frank, Marrow Stimulation: Microfracture, Drilling, and Abrasion, *Oper Tech Sports Med* 26 (2018) 170–174. <https://doi.org/10.1053/J.OTSM.2018.06.004>.
- [104] B. Kacprzak, M. Stańczak, B. Bielenda, A.A. Yarmohammadi, M. Hagner-Derengowska, Molecular Aspects of Cartilage Microfracturation: Rehabilitation Insights., *Orthop Rev (Pavia)* 17 (2025) 129917. <https://doi.org/10.52965/001c.129917>.
- [105] J. Donaldson, F. Tudor, I.D. McDermott, (iv) Treatment options for articular cartilage damage in the knee, *Orthop Trauma* 29 (2015) 24–30. <https://doi.org/10.1016/J.MPORTH.2014.11.009>.
- [106] M. Cucchiaroni, H. Madry, F. Guilak, D.B. Saris, M.J. Stoddart, M. Koon Wong, P.J. Roughley, A vision on the future of articular cartilage repair, *Eur Cell Mater* 27 (2014) 12–16. <https://doi.org/10.22203/ECM.V027SA03>.
- [107] T.F. Moyad, Cartilage Injuries in the Adult Knee: Evaluation and Management, *Cartilage* 2 (2011) 226. <https://doi.org/10.1177/1947603510383973>.
- [108] J.K. Hoffman, S. Geraghty, N.M. Protzman, Articular Cartilage Repair Using Marrow Stimulation Augmented with a Viable Chondral Allograft: 9-Month Postoperative Histological Evaluation, *Case Rep Orthop* 2015 (2015) 617365. <https://doi.org/10.1155/2015/617365>.
- [109] R. Treuting, Minimally Invasive Orthopedic Surgery: Arthroscopy, *Ochsner J* 2 (2000) 158. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3117522/> (accessed June 29, 2025).
- [110] B.B. Hinckel, D. Thomas, E.E. Vellios, K.J. Hancock, J.G. Calcei, S.L. Sherman, C.D. Eliasberg, T.L. Fernandes, J. Farr, C. Lattermann, A.H. Gomoll, Algorithm for Treatment of Focal Cartilage Defects of the Knee: Classic and New Procedures, *Cartilage* 13 (2021) 473S. <https://doi.org/10.1177/1947603521993219>.
- [111] G.M. Branam, A.Y. Saber, Osteochondral Autograft Transplantation, 2025.
- [112] M.A. Focsa, S. Florescu, A. Gogulescu, Emerging Strategies in Cartilage Repair and Joint Preservation, *Medicina* 2025, Vol. 61, Page 24 61 (2024) 24. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA61010024>.
- [113] C.A. Valdivia Zúñiga, F.L. De Cicco, Osteochondral Allograft, 2025.
- [114] H. Yabumoto, Y. Nakagawa, S. Mukai, Surgical Technique and Clinical Outcomes of Osteochondral Autograft Transplantation for Large Osteonecrotic Lesions of the Femoral Condyle With Residual Normal Cartilage: The Eyeglass Technique, *Orthop J Sports Med* 7 (2019) 2325967119872446. <https://doi.org/10.1177/2325967119872446>.

- [115] F. Migliorini, N. Maffulli, A. Baroncini, J. Eschweiler, M. Knobe, M. Tingart, H. Schenker, Allograft Versus Autograft Osteochondral Transplant for Chondral Defects of the Talus: Systematic Review and Meta-analysis, *Am J Sports Med* 50 (2021) 3447. <https://doi.org/10.1177/03635465211037349>.
- [116] B. Zylińska, P. Silmanowicz, A. Sobczyńska-Rak, Ł. Jarosz, T. Szponder, Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering, *In Vivo (Brooklyn)* 32 (2018) 1289–1300. <https://doi.org/10.21873/INVIVO.11379>.
- [117] K.J. Schmidt, L.E. Tírico, J.C. McCauley, W.D. Bugbee, Fresh Osteochondral Allograft Transplantation: Is Graft Storage Time Associated With Clinical Outcomes and Graft Survivorship?, *Am J Sports Med* 45 (2017) 2260–2266. <https://doi.org/10.1177/0363546517704846>.
- [118] C.L. Camp, M.J. Stuart, A.J. Krych, Current Concepts of Articular Cartilage Restoration Techniques in the Knee, *Sports Health* 6 (2014) 265. <https://doi.org/10.1177/1941738113508917>.
- [119] M.J. Makarczyk, Cell Therapy Approaches for Articular Cartilage Regeneration, *Organogenesis* 19 (2023) 2278235. <https://doi.org/10.1080/15476278.2023.2278235>.
- [120] T. Minas, T. Ogura, T. Bryant, Autologous Chondrocyte Implantation, *JBJS Essent Surg Tech* 6 (2016) e24. <https://doi.org/10.2106/JBJS.ST.16.00018>.
- [121] K.E. Wilk, M.M. Reinold, Rehabilitation After Articular Cartilage Procedures, *Noyes' Knee Disorders: Surgery, Rehabilitation, Clinical Outcomes* (2017) 936–955. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32903-3.00033-0>.
- [122] C.R. Fellows, C. Matta, R. Zakany, I.M. Khan, A. Mobasheri, Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair, *Front Genet* 7 (2016) 213. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2016.00213>.
- [123] W.Y. wai Lee, B. Wang, Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives, *J Orthop Translat* 9 (2017) 76–88. <https://doi.org/10.1016/J.JOT.2017.03.005>.
- [124] G. Milano, M. Sánchez, C.H. Jo, M.F. Saccomanno, B.P. Thampatty, J.H.-C. Wang, Platelet-rich plasma in orthopaedic sports medicine: state of the art, *Journal of ISAKOS* 4 (2019) 188–195. <https://doi.org/10.1136/JISAKOS-2019-000274>.
- [125] A.T. Wang, Y. Feng, H.H. Jia, M. Zhao, H. Yu, Application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of osteoarthritis of the knee: A concise review, *World J Stem Cells* 11 (2019) 222. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V11.I4.222>.
- [126] P. Angele, D. Docheva, G. Pattappa, J. Zellner, Cell-based treatment options facilitate regeneration of cartilage, ligaments and meniscus in demanding conditions of the knee by a whole joint approach, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 30 (2021) 1138. <https://doi.org/10.1007/S00167-021-06497-9>.
- [127] P. Guillén-García, I. Guillén-Vicente, E. Rodríguez-Iñigo, M. Guillén-Vicente, T.F. Fernández-Jaén, R. Navarro, L. Aboli, R. Torres, S. Abelow, J.M. López-Alcorocho, Cartilage Defect

Treatment Using High-Density Autologous Chondrocyte Implantation (HD-ACI), *Bioengineering* 10 (2023) 1083. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10091083>.

- [128] A. Zelinka, A.J. Roelofs, R.A. Kandel, C. De Bari, Cellular therapy and tissue engineering for cartilage repair, *Osteoarthritis Cartilage* 30 (2022) 1547–1560. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2022.07.012>.
- [129] M. Husen, R.J.H. Custers, M. Hevesi, A.J. Krych, D.B.F. Saris, Size of cartilage defects and the need for repair: a systematic review, *Journal of Cartilage & Joint Preservation* 2 (2022) 100049. <https://doi.org/10.1016/J.JCJP.2022.100049>.
- [130] P. Niemeyer, D. Albrecht, S. Andereya, P. Angele, A. Ateschrang, M. Aurich, M. Baumann, U. Bosch, C. Erggelet, S. Fickert, H. Gebhard, K. Gelse, D. Günther, A. Hoburg, P. Kasten, T. Kolombe, H. Madry, S. Marlovits, N.M. Meenen, P.E. Müller, U. Nöth, J.P. Petersen, M. Pietschmann, W. Richter, B. Rolauffs, K. Rhunau, B. Schewe, A. Steinert, M.R. Steinwachs, G.H. Welsch, W. Zinser, J. Fritz, Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group “Clinical Tissue Regeneration” of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU), *Knee* 23 (2016) 426–435. <https://doi.org/10.1016/J.KNEE.2016.02.001/ASSET/74166DF7-1033-48D7-94AC-89938C5673A6/MAIN.ASSETS/GR3.JPG>.
- [131] D. Camacho, R. Mardones, Cartilage Restoration and Use of Orthobiologics, *Techniques in Orthopaedics* 36 (2021) 247–251. <https://doi.org/10.1097/BTO.0000000000000511>.
- [132] F.R. Costa, L. Pires, R.A. Martins, M. Santos, G.S. Santos, J.V. Lana, B.R. Costa, N. Santos, A.P. de Macedo, A. Krueel, J.F. Lana, Orthobiologics Revisited: A Concise Perspective on Regenerative Orthopedics, *Current Issues in Molecular Biology* 2025, Vol. 47, Page 247 47 (2025) 247. <https://doi.org/10.3390/CIMB47040247>.
- [133] J.W. Belk, M.J. Kraeutler, D.A. Houck, J.A. Goodrich, J.L. Dragoo, E.C. McCarty, Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials, *American Journal of Sports Medicine* 49 (2021) 249–260. <https://doi.org/10.1177/0363546520909397>.
- [134] R.E. Marx, Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP?, *Implant Dent* 10 (2001) 225–228. <https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>.
- [135] P. Everts, K. Onishi, P. Jayaram, J.F. Lana, K. Mautner, Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 7794. <https://doi.org/10.3390/IJMS21207794>.
- [136] A. Atwal, T.P. Dale, M. Snow, N.R. Forsyth, P. Davoodi, Injectable hydrogels: An emerging therapeutic strategy for cartilage regeneration, *Adv Colloid Interface Sci* 321 (2023) 103030. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2023.103030>.
- [137] S. Wang, Y. Qiu, L. Qu, Q. Wang, Q. Zhou, Hydrogels for Treatment of Different Degrees of Osteoarthritis, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022) 858656. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.858656/FULL>.

- [138] E.J. Cotter, K.C. Wang, A.B. Yanke, S. Chubinskaya, Bone Marrow Aspirate Concentrate for Cartilage Defects of the Knee: From Bench to Bedside Evidence, *Cartilage* 9 (2018) 161–170. <https://doi.org/10.1177/1947603517741169>.
- [139] D. Park, H.S. Koh, Y.H. Choi, I. Park, Bone Marrow Aspirate Concentrate (BMAC) for Knee Osteoarthritis: A Narrative Review of Clinical Efficacy and Future Directions, *Medicina* 2025, Vol. 61, Page 853 61 (2025) 853. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA61050853>.
- [140] M. Jeyaraman, N. Jeyaraman, S. Ramasubramanian, R. Ranjan, S.K. Jha, A. Gupta, Bone Marrow Aspirate Concentrate for Treatment of Primary Knee Osteoarthritis: A Prospective, Single-Center, Non-randomized Study with 2-Year Follow-Up, *Indian J Orthop* 58 (2024) 894. <https://doi.org/10.1007/S43465-024-01168-6>.
- [141] N.C. Budhiparama, D. Putramega, I. Lumban-Gaol, Orthobiologics in knee osteoarthritis, dream or reality?, *Arch Orthop Trauma Surg* 144 (2024) 3937. <https://doi.org/10.1007/S00402-024-05310-9>.
- [142] A. Moreno-Garcia, E.C. Rodriguez-Merchan, Orthobiologics: Current role in Orthopedic Surgery and Traumatology, *Archives of Bone and Joint Surgery* 10 (2022) 536. <https://doi.org/10.22038/ABJS.2021.52770.2614>.
- [143] T. Thami, P. Kumar, A. Gupta, S. Patel, T. Thami, P. Kumar, A. Gupta, S. Patel, Orthobiologics for knee osteoarthritis: A review of current practice and future directions, *Journal of Arthroscopic Surgery and Sports Medicine* 5 (2024) 119–124. https://doi.org/10.25259/JASSM_22_2024.
- [144] M. Wang, Y. Wu, G. Li, Q. Lin, W. Zhang, H. Liu, J. Su, Articular cartilage repair biomaterials: strategies and applications, *Mater Today Bio* 24 (2024) 100948. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2024.100948>.
- [145] J.L. Cota Quintero, R. Ramos-Payán, J.G. Romero-Quintana, A. Ayala-Ham, M. Bermúdez, E.M. Aguilar-Medina, Hydrogel-Based Scaffolds: Advancing Bone Regeneration Through Tissue Engineering, *Gels* 2025, Vol. 11, Page 175 11 (2025) 175. <https://doi.org/10.3390/GELS11030175>.
- [146] E.A. Todd, N.A. Mirsky, B.L.G. Silva, A.R. Shinde, A.R.L. Arakelians, V.V. Nayak, R.A.C. Marcantonio, N. Gupta, L. Witek, P.G. Coelho, Functional Scaffolds for Bone Tissue Regeneration: A Comprehensive Review of Materials, Methods, and Future Directions, *Journal of Functional Biomaterials* 2024, Vol. 15, Page 280 15 (2024) 280. <https://doi.org/10.3390/JFB15100280>.
- [147] K. Wang, J. Li, Z. Li, B. Wang, Y. Qin, N. Zhang, H. Zhang, X. Su, Y. Wang, H. Zhu, Chondrogenic Progenitor Cells Exhibit Superiority Over Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes in Platelet-Rich Plasma Scaffold-Based Cartilage Regeneration, *American Journal of Sports Medicine* 47 (2019) 2200–2215. https://doi.org/10.1177/0363546519854219/SUPPL_FILE/DS_10.1177_0363546519854219.PDF.

- [148] C.S. Li, Y. Xu, J. Li, S.H. Qin, S.W. Huang, X.M. Chen, Y. Luo, C.T. Gao, J.H. Xiao, Ultramodern natural and synthetic polymer hydrogel scaffolds for articular cartilage repair and regeneration, *BioMedical Engineering OnLine* 2025 24:1 24 (2025) 1–26. <https://doi.org/10.1186/S12938-025-01342-3>.
- [149] M. Wasylęczko, W. Sikorska, A. Chwojnowski, Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering, *Membranes (Basel)* 10 (2020) 348. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES10110348>.
- [150] H.; Choi, W.-S.; Choi, J.-O.A. Jeong, D. Dupin, H. Choi, W.-S. Choi, J.-O. Jeong, A Review of Advanced Hydrogel Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery Systems as Biomaterials, *Gels* 2024, Vol. 10, Page 693 10 (2024) 693. <https://doi.org/10.3390/GELS10110693>.
- [151] D. Tang, H. Song, C. Yan, Y. Luo, X. Su, S. Ruan, Hydrogel composite scaffold repairs knee cartilage defects: a systematic review, *RSC Adv* 15 (2025) 10337. <https://doi.org/10.1039/D5RA01031D>.
- [152] M. Cui, Y. Sun, X. Zhang, P. Yang, W. Jiang, Osteochondral tissue engineering in translational practice: histological assessments and scoring systems, *Front Bioeng Biotechnol* 12 (2024) 1434323. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2024.1434323/XML/NLM>.
- [153] M. Chen, Z. Jiang, X. Zou, X. You, Z. Cai, J. Huang, Advancements in tissue engineering for articular cartilage regeneration, *Heliyon* 10 (2024) e25400. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E25400>.
- [154] A.R. Khan, A.D. Gholap, N.S. Grewal, Z. Jun, M. Khalid, H.J. Zhang, Advances in smart hybrid scaffolds: A strategic approach for regenerative clinical applications, *Engineered Regeneration* 6 (2025) 85–110. <https://doi.org/10.1016/J.ENGREG.2025.02.002>.
- [155] C. Yang, R. Chen, C. Chen, F. Yang, H. Xiao, B. Geng, Y. Xia, Tissue engineering strategies hold promise for the repair of articular cartilage injury, *BioMedical Engineering OnLine* 2024 23:1 23 (2024) 1–39. <https://doi.org/10.1186/S12938-024-01260-W>.
- [156] D.G. O’Shea, C.M. Curtin, F.J. O’Brien, Articulation inspired by nature: a review of biomimetic and biologically active 3D printed scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomater Sci* 10 (2022) 2462–2483. <https://doi.org/10.1039/D1BM01540K>.
- [157] A.M. Haleem, C.R. Chu, Advances in Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage Repair, *Oper Tech Orthop* 20 (2010) 76–89. <https://doi.org/10.1053/J.OTO.2009.10.004>.
- [158] K. Tur, Biomaterials and Tissue Engineering for Regenerative Repair of Articular Cartilage Defects, *Arch Rheumatol* 24 (2009) 206–217.
- [159] B. Huzum, B. Puha, R.M. Necoara, S. Gheorghevici, G. Puha, A. Filip, P.D. Sirbu, O. Alexa, Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review), *Exp Ther Med* 22 (2021) 1315. <https://doi.org/10.3892/ETM.2021.10750>.

- [160] I.M. Adel, M.F. Elmeligy, N.A. Elkasabgy, Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering, *Pharmaceutics* 2022, Vol. 14, Page 306 14 (2022) 306. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14020306>.
- [161] M.E. Grigore, Biomaterials for Cartilage Tissue Engineering, *J Tissue Sci Eng* 08 (2017). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000192>.
- [162] D. Yang, J. Xiao, B. Wang, L. Li, X. Kong, J. Liao, The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 104 (2019) 109927. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109927>.
- [163] A. Garcia-Garcia, S. Muñana-González, S. Lanceros-Mendez, L. Ruiz-Rubio, L.P. Alvarez, J.L. Vilas-Vilela, Biodegradable Natural Hydrogels for Tissue Engineering, Controlled Release, and Soil Remediation, *Polymers* 2024, Vol. 16, Page 2599 16 (2024) 2599. <https://doi.org/10.3390/POLYM16182599>.
- [164] F. Mukasheva, L. Adilova, A. Dyussenbinov, B. Yernaimanova, M. Aibilev, D. Akilbekova, Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types, *Front Bioeng Biotechnol* 12 (2024) 1444986. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2024.1444986/XML>.
- [165] N. Abbasi, S. Hamlet, R.M. Love, N.T. Nguyen, Porous scaffolds for bone regeneration, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* 5 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JSAM.2020.01.007>.
- [166] A. Cheng, Z. Schwartz, A. Kahn, X. Li, Z. Shao, M. Sun, Y. Ao, B.D. Boyan, H. Chen, Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration, *Tissue Eng Part B Rev* 25 (2019) 14–29. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2018.0119/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE7.JPEG>.
- [167] D. Rana, G. Ratheesh, S. Ramakrishna, M. Ramalingam, Nanofiber composites in cartilage tissue engineering, *Nanofiber Composites for Biomedical Applications* (2017) 325–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100173-8.00013-2>.
- [168] X. Cun, L. Hosta-Rigau, Topography: A Biophysical Approach to Direct the Fate of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering Applications, *Nanomaterials* 2020, Vol. 10, Page 2070 10 (2020) 2070. <https://doi.org/10.3390/NANO10102070>.
- [169] W. Wei, Y. Ma, X. Yao, W. Zhou, X. Wang, C. Li, J. Lin, Q. He, S. Leptihn, H. Ouyang, Advanced hydrogels for the repair of cartilage defects and regeneration, *Bioact Mater* 6 (2021) 998–1011. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2020.09.030>.
- [170] A. Aazmi, D. Zhang, C. Mazzaglia, M. Yu, Z. Wang, H. Yang, Y.Y.S. Huang, L. Ma, Biofabrication methods for reconstructing extracellular matrix mimetics, *Bioact Mater* 31 (2024) 475–496. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2023.08.018>.
- [171] S. Li, X. Dan, H. Chen, T. Li, B. Liu, Y. Ju, Y. Li, L. Lei, X. Fan, Developing fibrin-based biomaterials/scaffolds in tissue engineering, *Bioact Mater* 40 (2024) 597–623. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2024.08.006>.

- [172] D.M. Radulescu, E. Andronescu, O.R. Vasile, A. Ficai, B.S. Vasile, Silk fibroin-based scaffolds for wound healing applications with metal oxide nanoparticles, *J Drug Deliv Sci Technol* 96 (2024) 105689. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2024.105689>.
- [173] X. Zhao, D.A. Hu, D. Wu, F. He, H. Wang, L. Huang, D. Shi, Q. Liu, N. Ni, M. Pakvasa, Y. Zhang, K. Fu, K.H. Qin, A.J. Li, O. Hagag, E.J. Wang, M. Sabharwal, W. Wagstaff, R.R. Reid, M.J. Lee, J.M. Wolf, M. El Dafrawy, K. Hynes, J. Strelzow, S.H. Ho, T.C. He, A. Athiviraham, Applications of Biocompatible Scaffold Materials in Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.603444>.
- [174] R. Sanz-Horta, A. Matesanz, A. Gallardo, H. Reinecke, J.L. Jorcano, P. Acedo, D. Velasco, C. Elvira, Technological advances in fibrin for tissue engineering, *J Tissue Eng* 14 (2023). https://doi.org/10.1177/20417314231190288/ASSET/146E3CC4-AC61-4CBD-BAD5-8E5211BF32EA/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_20417314231190288-FIG7.JPG.
- [175] S.T.B. Ho, S.M. Cool, J.H. Hui, D.W. Hutmacher, The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biomaterials* 31 (2010) 38–47. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.09.021>.
- [176] M. Sheykhasan, R.T. Qomi, M. Ghiasi, Fibrin Scaffolds Designing in order to Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Chondrocytes in the Presence of TGF- β 3, *Int J Stem Cells* 8 (2015) 219–227. <https://doi.org/10.15283/IJSC.2015.8.2.219>.
- [177] B. Bujoli, J.C. Scimeca, E. Verron, Fibrin as a Multipurpose Physiological Platform for Bone Tissue Engineering and Targeted Delivery of Bioactive Compounds, *Pharmaceutics* 2019, Vol. 11, Page 556 11 (2019) 556. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11110556>.
- [178] G. Filardo, M. Drobic, F. Perdisa, E. Kon, M. Hribernik, M. Marcacci, Fibrin glue improves osteochondral scaffold fixation: Study on the human cadaveric knee exposed to continuous passive motion, *Osteoarthritis Cartilage* 22 (2014) 557–565. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.01.004>.
- [179] E.A. Kiyotake, E.C. Beck, M.S. Detamore, Cartilage extracellular matrix as a biomaterial for cartilage regeneration, *Ann N Y Acad Sci* 1383 (2016) 139–159. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13278>.
- [180] A.A. Golebiowska, J.T. Intraivaia, V.M. Sathe, S.G. Kumbar, S.P. Nukavarapu, Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects, *Bioact Mater* 32 (2024) 98–123. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2023.09.017>.
- [181] M. Nouri Barkestani, S. Naserian, G. Uzan, S. Shamdani, Post-decellularization techniques ameliorate cartilage decellularization process for tissue engineering applications, *J Tissue Eng* 12 (2021). https://doi.org/10.1177/2041731420983562/ASSET/E6DF4DFB-6D55-45BA-93AD-04A3D4180908/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_2041731420983562-FIG3.JPG.

- [182] S.P. Grogan, X. Chen, S. Sovani, N. Taniguchi, C.W. Colwell, M.K. Lotz, D.D. D’Lima, Influence of Cartilage Extracellular Matrix Molecules on Cell Phenotype and Neocartilage Formation, *Tissue Eng Part A* 20 (2013) 264. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2012.0618>.
- [183] Y. Sun, L. Yan, S. Chen, M. Pei, Functionality of decellularized matrix in cartilage regeneration: A comparison of tissue versus cell sources, *Acta Biomater* 74 (2018) 56–73. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.04.048>.
- [184] Y. Kang, Y. Guan, S. Li, Innovative hydrogel solutions for articular cartilage regeneration: a comprehensive review, *Int J Surg* 110 (2024) 7984–8001. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000002076>.
- [185] D.O. Visscher, H. Lee, P.P.M. van Zuijlen, M.N. Helder, A. Atala, J.J. Yoo, S.J. Lee, A photo-crosslinkable cartilage-derived extracellular matrix bioink for auricular cartilage tissue engineering, *Acta Biomater* 121 (2021) 193–203. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.11.029>.
- [186] Y. Li, Y. Xu, Y. Liu, Z. Wang, W. Chen, L. Duan, D. Gu, Decellularized cartilage matrix scaffolds with laser-machined micropores for cartilage regeneration and articular cartilage repair, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 105 (2019). <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.110139>.
- [187] G. Tian, S. Jiang, J. Li, F. Wei, X. Li, Y. Ding, Z. Yang, Z. Sun, K. Zha, F.X. Wang, B. Huang, L. Peng, Q. Wang, Z. Tian, X. Yang, Z. Wang, Q. Guo, W. Guo, S. Liu, Cell-free decellularized cartilage extracellular matrix scaffolds combined with interleukin 4 promote osteochondral repair through immunomodulatory macrophages: In vitro and in vivo preclinical study, *Acta Biomater* 127 (2021) 131–145. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.03.054>.
- [188] H. V. Almeida, R. Eswaramoorthy, G.M. Cunniffe, C.T. Buckley, F.J. O’Brien, D.J. Kelly, Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration, *Acta Biomater* 36 (2016) 55–62. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.03.008>.
- [189] J. Liao, X. Guo, K.J. Grande-Allen, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 31 (2010) 8911–8920. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.07.110>.
- [190] A. Puiggali-Jou, I. Hui, L. Baldi, R. Frischknecht, M. Asadikorayem, J. Janiak, P. Chansoria, M.C. McCabe, M.J. Stoddart, K.C. Hansen, K.L. Christman, M. Zenobi-Wong, Biofabrication of anisotropic articular cartilage based on decellularized extracellular matrix, *Biofabrication* 17 (2025) 015044. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/AD9CC2>.
- [191] K.T. Gomes, P.R. Prasad, J.S. Sandhu, A. Kumar, N.A.N. Kumar, N.B. Shridhar, B. Bisht, M.K. Paul, Decellularization techniques: unveiling the blueprint for tracheal tissue engineering, *Front Bioeng Biotechnol* 13 (2025) 1518905. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2025.1518905/XML>.
- [192] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A.M. Kajbafzadeh, M. Majidi Zolbin, Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification,

- and Application Methods, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022) 805299. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.805299/XML>.
- [193] Z. Hu, Y. Luo, R. Ni, Y. Hu, F. Yang, T. Du, Y. Zhu, Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine, *Mater Today Bio* 22 (2023) 100790. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2023.100790>.
- [194] F. Dadkhah Tehrani, A. Firouzeh, I. Shabani, A. Shabani, A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2021) 606982. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.606982/XML>.
- [195] A.L. Ingraldi, T. Allen, J.N. Tinghitella, W.C. Merritt, T. Becker, A.J. Tabor, Characterization of Amnion-Derived Membrane for Clinical Wound Applications, *Bioengineering* 11 (2024) 953. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING11100953>.
- [196] M. Fenelon, D. B Maurel, R. Siadous, A. Gremare, S. Delmond, M. Durand, S. Brun, S. Catros, F. Gindraux, N. L'Heureux, J.C. Fricain, Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C* 104 (2019) 109903. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109903>.
- [197] M. Fénelon, S. Catros, C. Meyer, J.C. Fricain, L. Obert, F. Auber, A. Louvrier, F. Gindraux, Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering, *Membranes* 2021, Vol. 11, Page 387 11 (2021) 387. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES11060387>.
- [198] M. Hafezi, S.N. Khorasani, M. Zare, R.E. Neisiany, P. Davoodi, Advanced Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering: Recent Progress and Future Directions, *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 4199 13 (2021) 4199. <https://doi.org/10.3390/POLYM13234199>.
- [199] W. Bao, M. Li, Y. Yang, Y. Wan, X. Wang, N. Bi, C. Li, Advancements and Frontiers in the High Performance of Natural Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering, *Front Chem* 8 (2020) 511126. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2020.00053/XML>.
- [200] L. Cao, Y. Tong, X. Wang, Q. Zhang, Y. Qi, C. Zhou, X. Yu, Y. Wu, X. Miao, Effect of Amniotic Membrane/Collagen-Based Scaffolds on the Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells and Cartilage Repair, *Front Cell Dev Biol* 9 (2021) 3169. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.647166/BIBTEX>.
- [201] Z. Jun, W. Yuping, H. Yanran, L. Ziming, L. Yuwan, Z. Xizhong, W. Zhilin, L. Xiaoji, Human acellular amniotic membrane scaffolds encapsulating juvenile cartilage fragments accelerate the repair of rabbit osteochondral defects, *Bone Joint Res* 11 (2022) 349–361. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.116.BJR-2021-0490.R1/LETTERTOEDITOR>.
- [202] N.F.A. Abd Halim, A. Ab Aziz, S.L. Tan, V. Selvaratnam, T. Kamarul, A Systematic Review of Human Amnion Enhanced Cartilage Regeneration in Full-Thickness Cartilage Defects, *Biomimetics* 9 (2024) 383. <https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS9070383>.
- [203] S.K. Gupta, N.C. Mishra, A. Dhasmana, Decellularization Methods for Scaffold Fabrication, *Methods in Molecular Biology* 1577 (2017) 1–10. https://doi.org/10.1007/7651_2017_34.

- [204] R. Sarvari, P. Keyhanvar, S. Agbolaghi, L. Roshangar, E. Bahremani, N. Keyhanvar, M. Haghdooost, S.H. Keshel, A. Taghikhani, N. Firouzi, A. Valizadeh, E. Hamedi, M. Nouri, A comprehensive review on methods for promotion of mechanical features and biodegradation rate in amniotic membrane scaffolds, *J Mater Sci Mater Med* 33 (2022) 1–26. <https://doi.org/10.1007/S10856-021-06570-2/FIGURES/25>.
- [205] A. Miatmoko, B.S. Hariawan, D.M. Cahyani, S.S. Dewangga, K.K. Handoko, Purwati, R.K. Sahu, D.M. Hariyadi, Prospective use of amniotic mesenchymal stem cell metabolite products for tissue regeneration, *J Biol Eng* 17 (2023) 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13036-023-00331-1/FIGURES/1>.
- [206] V. Pérez-Silos, N.K. Moncada-Saucedo, V. Peña-Martínez, J. Lara-Arias, I.A. Marino-Martínez, A. Camacho, V.J. Romero-Díaz, M.L. Banda, A. García-Ruiz, A. Soto-Dominguez, H. Rodriguez-Rocha, N. López-Serna, R.S. Tuan, H. Lin, L. Fuentes-Mera, A Cellularized Biphasic Implant Based on a Bioactive Silk Fibroin Promotes Integration and Tissue Organization during Osteochondral Defect Repair in a Porcine Model, *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 5145 20 (2019) 5145. <https://doi.org/10.3390/IJMS20205145>.
- [207] A.C.V. Ballesteros, H.R.S. Puello, J.A. Lopez-Garcia, A. Bernal-Ballen, D.L.N. Mosquera, D.M.M. Forero, J.S.S. Charry, Y.A.N. Bejarano, Bovine Decellularized Amniotic Membrane: Extracellular Matrix as Scaffold for Mammalian Skin, *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 590 12 (2020) 590. <https://doi.org/10.3390/POLYM12030590>.
- [208] C.H. Chang, C.C. Chen, C.H. Liao, F.H. Lin, Y.M. Hsu, H.W. Fang, Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells, *J Biomed Mater Res A* 102 (2014) 2248–2257. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34897>.
- [209] J. Adamowicz, M. Pokrywczyńska, J. Tworkiewicz, T. Kowalczyk, S. V. van Breda, D. Tyloch, T. Kloskowski, M. Bodnar, J. Skopinska-Wisniewska, A. Marszałek, M. Frontczak-Baniewicz, T.A. Kowalewski, T. Drewa, New Amniotic Membrane Based Biocomposite for Future Application in Reconstructive Urology, *PLoS One* 11 (2016) e0146012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146012>.
- [210] C. Liu, M. Pei, Q. Li, Y. Zhang, Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration, *Front Med* 16 (2021) 56. <https://doi.org/10.1007/S11684-021-0900-3>.
- [211] L. Edgar, A. Altamimi, M. García Sánchez, R. Tamburrinia, A. Asthana, C. Gazia, G. Orlando, Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering, *Organogenesis* 14 (2018) 172–186. <https://doi.org/10.1080/15476278.2018.1503771>.
- [212] J. Noro, H. Vilaça-Faria, R.L. Reis, R.P. Pirraco, Extracellular matrix-derived materials for tissue engineering and regenerative medicine: A journey from isolation to characterization and application, *Bioact Mater* 34 (2024) 494–519. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2024.01.004>.

- [213] Y. Seon Kim, M. Majid, A.J. Melchiorri, A.G. Mikos, G. Mikos, K.E. Y W O R D S bioink, Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering, *Bioeng Transl Med* 4 (2019) 83–95. <https://doi.org/10.1002/BTM2.10110>.
- [214] E. Sehic, L. de Miguel-Gómez, Standardizing decellularization protocols for optimized uterine tissue bioengineering, *Regen Ther* 28 (2024) 183. <https://doi.org/10.1016/J.RETH.2024.12.011>.
- [215] P.C.O. Ching, F.H. Chen, I.H. Lin, D.T. Tran, L.L. Tayo, M.L. Yeh, Evaluation of Articular Cartilage Regeneration Properties of Decellularized Cartilage Powder/Modified Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds, *ACS Omega* 9 (2024) 33629–33642. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.4C01927/ASSET/IMAGES/LARGE/AO4C01927_0010.JPEG.
- [216] D. Gong, F. Yu, M. Zhou, W. Dong, D. Yan, S. Zhang, Y. Yan, H. Wang, Y. Tan, Y. Chen, B. Feng, W. Fu, Y. Fu, Y. Lu, Ex Vivo and In Vivo Properties of an Injectable Hydrogel Derived From Acellular Ear Cartilage Extracellular Matrix, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 740635. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.740635/BIBTEX>.
- [217] M. Saghizadeh, M.A. Winkler, A.A. Kramerov, D.M. Hemmati, C.A. Ghiam, S.D. Dimitrijevič, D. Sareen, L. Ornelas, H. Ghiasi, W.J. Brunken, E. Maguen, Y.S. Rabinowitz, C.N. Svendsen, K. Jirsova, A. V. Ljubimov, A Simple Alkaline Method for Decellularizing Human Amniotic Membrane for Cell Culture, *PLoS One* 8 (2013) e79632. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079632>.
- [218] S. Ashouri, S.A. Hosseini, S.J. Hoseini, F. Tara, A. Ebrahimzadeh-Bideskan, T.J. Webster, S. Kargozar, Decellularization of human amniotic membrane using detergent-free methods: Possibilities in tissue engineering, *Tissue Cell* 76 (2022) 101818. <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2022.101818>.
- [219] J.M. Aamodt, D.W. Grainger, Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response, *Biomaterials* 86 (2016) 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.003>.
- [220] P. Guo, N. Jiang, C. Mini, G. Miklosic, S. Zhu, A.J. Vernengo, M. D’Este, S. Grad, M. Alini, Z. Li, Decellularized extracellular matrix particle-based biomaterials for cartilage repair applications, *J Mater Sci Technol* 160 (2023) 194–203. <https://doi.org/10.1016/J.JMST.2023.03.019>.
- [221] J. Fernández-Pérez, M. Ahearne, The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels, *Scientific Reports* 2019 9:1 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49575-2>.
- [222] A. Szwed-Georgiou, P. Płociński, B. Kupikowska-Stobba, M.M. Urbaniak, P. Rusek-Wala, K. Szustakiewicz, P. Piszko, A. Krupa, M. Biernat, M. Gazińska, M. Kasprzak, K. Nawrotek, N.P. Mira, K. Rudnicka, Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery Systems, *ACS Biomater Sci Eng* 9 (2023) 5222–5254. https://doi.org/10.1021/ACSBIMATERIALS.3C00609/ASSET/IMAGES/LARGE/AB3C00609_003.JPEG.

- [223] M.C. Cramer, S.F. Badylak, Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior, *Ann Biomed Eng* 48 (2020) 2132–2153. <https://doi.org/10.1007/S10439-019-02408-9/METRICS>.
- [224] S. Zahiri, E. Masaeli, E. Poorazizi, M.H. Nasr-Esfahani, Chondrogenic response in presence of cartilage extracellular matrix nanoparticles, *J Biomed Mater Res A* 106 (2018) 2463–2471. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.36440>.
- [225] R.C.H. Gresham, C.S. Bahney, J.K. Leach, Growth factor delivery using extracellular matrix-mimicking substrates for musculoskeletal tissue engineering and repair, *Bioact Mater* 6 (2020) 1945–1956. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2020.12.012>.
- [226] G. Huang, F. Li, X. Zhao, Y. Ma, Y. Li, M. Lin, G. Jin, T.J. Lu, G.M. Genin, F. Xu, Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment, *Chem Rev* 117 (2017) 12764. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00094>.
- [227] Q. Zhang, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration, *Acta Biomater* 10 (2014) 2005–2013. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2013.12.042>.
- [228] P. Han, G.A. Gomez, G.N. Duda, S. Ivanovski, P.S.P. Poh, Scaffold geometry modulation of mechanotransduction and its influence on epigenetics, *Acta Biomater* 163 (2023) 259–274. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.01.020>.
- [229] V. Ryzhuk, X. Zeng, X. Wang, V. Melnychuk, L. Lankford, D. Farmer, A. Wang, Human amnion extracellular matrix derived bioactive hydrogel for cell delivery and tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 85 (2018) 191–202. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.12.026>.
- [230] J.D. Green, V. Tollemar, M. Dougherty, Z. Yan, L. Yin, J. Ye, Z. Collier, M.K. Mohammed, R.C. Haydon, H.H. Luu, R. Kang, M.J. Lee, S.H. Ho, T.C. He, L.L. Shi, A. Athiviraham, Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering, *Genes Dis* 2 (2015) 307. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2015.09.003>.
- [231] A. Rehman, A. Nigam, L. Laino, D. Russo, C. Todisco, G. Esposito, F. Svolacchia, F. Giuzio, V. Desiderio, G. Ferraro, Mesenchymal Stem Cells in Soft Tissue Regenerative Medicine: A Comprehensive Review, *Medicina (B Aires)* 59 (2023) 1449. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA59081449>.
- [232] H. Hanai, G. Jacob, S. Nakagawa, R.S. Tuan, N. Nakamura, K. Shimomura, Potential of Soluble Decellularized Extracellular Matrix for Musculoskeletal Tissue Engineering - Comparison of Various Mesenchymal Tissues, *Front Cell Dev Biol* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2020.581972>.
- [233] L. Luo, R. Eswaramoorthy, K.J. Mulhall, D.J. Kelly, Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells, *J Mech Behav Biomed Mater* 55 (2016) 21–31. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2015.10.002>.

- [234] N.C. Cheng, B.T. Estes, T.H. Young, F. Guilak, Genipin-Crosslinked Cartilage-Derived Matrix as a Scaffold for Human Adipose-Derived Stem Cell Chondrogenesis, <https://Home.Liebertpub.Com/Tea> 19 (2012) 484–496. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2012.0384>.
- [235] Y.B. Son, Y.I. Jeong, Y.W. Jeong, M.S. Hossein, P.O. Olsson, A. Tinson, K.K. Singh, S.Y. Lee, W.S. Hwang, Cell Source-Dependent In Vitro Chondrogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cell Established from Bone Marrow and Synovial Fluid of Camelus dromedarius, *Animals* 2021, Vol. 11, Page 1918 11 (2021) 1918. <https://doi.org/10.3390/ANI11071918>.
- [236] J. Lee, J.Y. Lee, B.C. Chae, J. Jang, E.A. Lee, Y. Son, Fully Dedifferentiated Chondrocytes Expanded in Specific Mesenchymal Stem Cell Growth Medium with FGF2 Obtains Mesenchymal Stem Cell Phenotype In Vitro but Retains Chondrocyte Phenotype In Vivo, *Cell Transplant* 26 (2017) 1673–1687. https://doi.org/10.1177/0963689717724794/ASSET/AE7B0F7A-4833-41D9-84E0-A666D6E25A9D/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_0963689717724794-FIG8.JPG.
- [237] M.H. Cha, S.H. Do, G.R. Park, P. Du, K.C. Han, D.K. Han, K. Park, Induction of Re-Differentiation of Passaged Rat Chondrocytes Using a Naturally Obtained Extracellular Matrix Microenvironment, <https://Home.Liebertpub.Com/Tea> 19 (2013) 978–988. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2012.0358>.
- [238] D.W. Youngstrom, I. Cakstina, E. Jakobsons, Cartilage-derived extracellular matrix extract promotes chondrocytic phenotype in three-dimensional tissue culture, *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44 (2016) 1040–1047. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1014091>.
- [239] H. V. Almeida, Y. Liu, G.M. Cunniffe, K.J. Mulhall, A. Matsiko, C.T. Buckley, F.J. O'Brien, D.J. Kelly, Controlled release of transforming growth factor- β 3 from cartilage-extra-cellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells, *Acta Biomater* 10 (2014) 4400–4409. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2014.05.030>.
- [240] L.T. Saldin, M.C. Cramer, S.S. Velankar, L.J. White, S.F. Badylak, Extracellular Matrix Hydrogels from Decellularized Tissues: Structure and Function, *Acta Biomater* 49 (2016) 1. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2016.11.068>.
- [241] N.W. Garrigues, D. Little, J. Sanchez-Adams, D.S. Ruch, F. Guilak, Electrospun Cartilage-Derived Matrix Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering, *J Biomed Mater Res A* 102 (2014) 3998. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.35068>.
- [242] J. Lei, L.B. Priddy, J.J. Lim, M. Masee, T.J. Koob, Identification of Extracellular Matrix Components and Biological Factors in Micronized Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane, *Adv Wound Care (New Rochelle)* 6 (2017) 43. <https://doi.org/10.1089/WOUND.2016.0699>.
- [243] S.L. Rowe, S.Y. Lee, J.P. Stegemann, Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels, *Acta Biomater* 3 (2007) 59–67. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2006.08.006>.

- [244] R.S. Hewawasam, R. Blomberg, P. Šerbedžija, C.M. Magin, Chemical Modification of Human Decellularized Extracellular Matrix for Incorporation into Phototunable Hybrid-Hydrogel Models of Tissue Fibrosis, *ACS Appl Mater Interfaces* 15 (2023) 15071–15083. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.2C18330/SUPPL_FILE/AM2C18330_SI_001.PDF.
- [245] A. Shridhar, B.G. Amsden, E.R. Gillies, L.E. Flynn, Investigating the Effects of Tissue-Specific Extracellular Matrix on the Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stromal Cells Within Composite Hydrogel Scaffolds, *Front Bioeng Biotechnol* 7 (2019) 499276. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00402/BIBTEX>.
- [246] J.L. Drury, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials* 24 (2003) 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5).
- [247] M. Bhattacharjee, J.L.E. Ivirico, H.M. Kan, R. Bordett, R. Pandey, T. Otsuka, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Preparation and characterization of amnion hydrogel and its synergistic effect with adipose derived stem cells towards IL1 β activated chondrocytes, *Scientific Reports* 2020 10:1 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75921-w>.
- [248] C. Chung, M. Masee, T.J. Koob, Human amniotic membrane modulates Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathways in articular chondrocytes in vitro, *Osteoarthr Cartil Open* 3 (2021) 100211. <https://doi.org/10.1016/J.OCATO.2021.100211>.
- [249] E. Boucard, L. Vidal, F. Coulon, C. Mota, J.Y. Hascoët, F. Halary, The degradation of gelatin/alginate/fibrin hydrogels is cell type dependent and can be modulated by targeting fibrinolysis, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022) 920929. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.920929/BIBTEX>.
- [250] X. Xie, S. Wu, S. Mou, N. Guo, Z. Wang, J. Sun, Microtissue-Based Bioink as a Chondrocyte Microshelter for DLP Bioprinting, *Adv Healthc Mater* 11 (2022) 2201877. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202201877>.
- [251] J. Zeng, L. Huang, H. Xiong, Q. Li, C. Wu, Y. Huang, H. Xie, B. Shen, Injectable decellularized cartilage matrix hydrogel encapsulating urine-derived stem cells for immunomodulatory and cartilage defect regeneration, *Npj Regenerative Medicine* 2022 7:1 7 (2022) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00269-w>.
- [252] Y. Mao, T. Block, A. Singh-Varma, A. Sheldrake, R. Leeth, S. Griffey, J. Kohn, Extracellular matrix derived from chondrocytes promotes rapid expansion of human primary chondrocytes in vitro with reduced dedifferentiation, *Acta Biomater* 85 (2019) 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2018.12.006>.
- [253] D. Eyrich, F. Brandl, B. Appel, H. Wiese, G. Maier, M. Wenzel, R. Staudenmaier, A. Goepferich, T. Blunk, Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering, *Biomaterials* 28 (2007) 55–65. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.08.027>.
- [254] A. Dufour, F. Mallein-gerin, E. Perrier-groult, Direct perfusion improves redifferentiation of human chondrocytes in fibrin hydrogel with the deposition of cartilage pericellular matrix, *Applied Sciences (Switzerland)* 11 (2021) 8923. <https://doi.org/10.3390/APP11198923/S1>.

- [255] P. Yeung, K.H. Cheng, C.H. Yan, B.P. Chan, Collagen microsphere based 3D culture system for human osteoarthritis chondrocytes (hOACs), *Scientific Reports* 2019 9:1 9 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47946-3>.
- [256] G. Zhou, Q. Zheng, F. Engin, E. Munivez, Y. Chen, E. Sebald, D. Krakow, B. Lee, Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 19004. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605170103>.
- [257] Y. Liang, E. Idrees, S.H.J. Andrews, K. Labib, A. Szojka, M. Kunze, A.D. Burbank, A. Mulet-Sierra, N.M. Jomha, A.B. Adesida, Plasticity of Human Meniscus Fibrochondrocytes: A Study on Effects of Mitotic Divisions and Oxygen Tension, *Scientific Reports* 2017 7:1 7 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12096-x>.
- [258] M. Rikkers, R. Levato, J. Malda, L.A. Vonk, Importance of Timing of Platelet Lysate-Supplementation in Expanding or Redifferentiating Human Chondrocytes for Chondrogenesis, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2020) 542607. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00804/BIBTEX>.
- [259] A. Witt, A. Salamon, D. Boy, D. Hansmann, A. Büttner, A. Wree, R. Bader, A. Jonitz-Heincke, Gene expression analysis of growth factor receptors in human chondrocytes in monolayer and 3D pellet cultures, *Int J Mol Med* 40 (2017) 10–20. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2017.2994/HTML>.
- [260] L. Alcaide-Ruggiero, R. Cugat, J.M. Domínguez, Proteoglycans in Articular Cartilage and Their Contribution to Chondral Injury and Repair Mechanisms, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 10824 24 (2023) 10824. <https://doi.org/10.3390/IJMS241310824>.
- [261] A.J. Hayes, J. Melrose, Aggrecan, the Primary Weight-Bearing Cartilage Proteoglycan, Has Context-Dependent, Cell-Directive Properties in Embryonic Development and Neurogenesis: Aggrecan Glycan Side Chain Modifications Convey Interactive Biodiversity, *Biomolecules* 2020, Vol. 10, Page 1244 10 (2020) 1244. <https://doi.org/10.3390/BIOM10091244>.
- [262] P. Alberton, H.C. Dugonitsch, B. Hartmann, P. Li, Z. Farkas, M.M. Saller, H. Clausen-Schaumann, A. Aszodi, Aggrecan Hypomorphism Compromises Articular Cartilage Biomechanical Properties and Is Associated with Increased Incidence of Spontaneous Osteoarthritis, *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 1008 20 (2019) 1008. <https://doi.org/10.3390/IJMS20051008>.
- [263] T. Komori, Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2, *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 1694 20 (2019) 1694. <https://doi.org/10.3390/IJMS20071694>.
- [264] X. Qin, Q. Jiang, K. Nagano, T. Moriishi, T. Miyazaki, H. Komori, K. Ito, K. von der Mark, C. Sakane, H. Kaneko, T. Komori, Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts, *PLoS Genet* 16 (2020) e1009169. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009169>.

- [265] R.B. Vega, K. Matsuda, J. Oh, A.C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J.M. Shelton, J.A. Richardson, G. Karsenty, E.N. Olson, Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis, *Cell* 119 (2004) 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.024>.
- [266] X. Hu, Z. Wu, Z. Zhang, H. Yao, D.A. Wang, Type II collagen scaffolds for tissue engineering, *Communications Materials* 2024 5:1 5 (2024) 1–17. <https://doi.org/10.1038/s43246-024-00598-x>.
- [267] A.R. Armiento, M. Alini, M.J. Stoddart, Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?, *Adv Drug Deliv Rev* 146 (2019) 289–305. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.12.015>.
- [268] Q. Zheng, G. Zhou, R. Morello, Y. Chen, X. Garcia-Rojas, B. Lee, Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo, *J Cell Biol* 162 (2003) 833–842. <https://doi.org/10.1083/JCB.200211089>.
- [269] J. Gu, Y. Lu, F. Li, L. Qiao, Q. Wang, N. Li, J.A. Borgia, Y. Deng, G. Lei, Q. Zheng, Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation, *Cell Death & Disease* 2014 5:10 5 (2014) e1469–e1469. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.444>.
- [270] C. Shigley, J. Trivedi, O. Meghani, B.D. Owens, C.T. Jayasuriya, Suppressing Chondrocyte Hypertrophy to Build Better Cartilage, *Bioengineering* 10 (2023) 741. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING10060741/S1>.
- [271] S. Chen, P. Fu, R. Cong, H.S. Wu, M. Pei, Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration, *Genes Dis* 2 (2015) 76–95. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2014.12.003>.
- [272] E. Goldberg-Bockhorn, U. Wenzel, M.N. Theodoraki, J. Döscher, R. Riepl, M.C. Wigand, C. Brunner, M. Heßling, T.K. Hoffmann, J. Kern, N. Rotter, Enhanced cellular migration and prolonged chondrogenic differentiation in decellularized cartilage scaffolds under dynamic culture conditions, *J Tissue Eng Regen Med* 16 (2022) 36–50. <https://doi.org/10.1002/TERM.3261>.
- [273] N.C. Cheng, B.T. Estes, T.H. Young, F. Guilak, Engineered cartilage using primary chondrocytes cultured in a porous cartilage-derived matrix, *Regenerative Med* 6 (2011) 81–93. <https://doi.org/10.2217/RME.10.87>.
- [274] I.C. Lin, T.J. Wang, C.L. Wu, D.H. Lu, Y.R. Chen, K.C. Yang, Chitosan-cartilage extracellular matrix hybrid scaffold induces chondrogenic differentiation to adipose-derived stem cells, *Regen Ther* 14 (2020) 238–244. <https://doi.org/10.1016/J.RETH.2020.03.014>.
- [275] E. Hodder, F. Guppy, D. Covill, P. Bush, The effect of hydrostatic pressure on proteoglycan production in articular cartilage in vitro: a meta-analysis, *Osteoarthritis Cartilage* 28 (2020) 1007–1019. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.03.021>.

- [276] Y. Ge, Y. Li, Z. Wang, L. Li, H. Teng, Q. Jiang, Effects of Mechanical Compression on Chondrogenesis of Human Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells in Agarose Hydrogel, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 697281. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.697281/FULL>.
- [277] B.D. Markway, H. Cho, B. Johnstone, Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes, *Arthritis Res Ther* 15 (2013) 1–14. <https://doi.org/10.1186/AR4272/FIGURES/7>.
- [278] C.S. Bahney, C.-W. Hsu, J.U. Yoo, J.L. West, B. Johnstone, A bioresponsive hydrogel tuned to chondrogenesis of human mesenchymal stem cells, *The FASEB Journal* 25 (2011) 1486. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-165514>.
- [279] S.J. Bryant, K.S. Anseth, Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels, *J Biomed Mater Res* 59 (2002) 63–72. <https://doi.org/10.1002/JBM.1217>.
- [280] I.S. Park, Y.J. Choi, H.S. Kim, S.H. Park, B.H. Choi, J.H. Kim, B.R. Song, B.H. Min, Development of three-dimensional articular cartilage construct using silica nano-patterned substrate, *PLoS One* 14 (2019) e0208291. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0208291>.
- [281] G.D. Nicodemus, S.J. Bryant, The role of hydrogel structure and dynamic loading on chondrocyte gene expression and matrix formation, *J Biomech* 41 (2008) 1528. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2008.02.034>.
- [282] J.T. Connelly, C.G. Wilson, M.E. Levenston, Characterization of proteoglycan production and processing by chondrocytes and BMSCs in tissue engineered constructs, *Osteoarthritis Cartilage* 16 (2008) 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2008.01.004>.
- [283] A. Matsiko, J.P. Gleeson, F.J. O’Brien, Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition, *Tissue Eng Part A* 21 (2015) 486–497. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2013.0545>.
- [284] S. Nürnberger, C. Schneider, C. Keibl, B. Schädler, P. Heimel, X. Monforte, A.H. Teuschl, M. Nalbach, P.J. Thurner, J. Grillari, H. Redl, S. Wolbank, Repopulation of decellularised articular cartilage by laser-based matrix engraving, *EBioMedicine* 64 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2020.103196>.
- [285] E. Özdemir, A. Emet, R. Hashemihesar, A.C.S. Yürüker, E. Kılıç, D. Uçkan Çetinkaya, E. Turhan, Articular Cartilage Regeneration Utilizing Decellularized Human Placental Scaffold, Mesenchymal Stem Cells and Platelet Rich Plasma, *Tissue Eng Regen Med* 17 (2020) 901–908. <https://doi.org/10.1007/S13770-020-00298-W/METRICS>.
- [286] J.C. Hu, K.A. Athanasiou, A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering, *Tissue Eng* 12 (2006) 969–979. <https://doi.org/10.1089/TEN.2006.12.969>.
- [287] S. Bhumiratana, R.E. Eton, S.R. Oungoulian, L.Q. Wan, G.A. Ateshian, G. Vunjak-Novakovic, Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by

mesenchymal condensation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (2014) 6940–6945.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1324050111>.

- [288] G.D. Nicodemus, S.C. Skaalure, S.J. Bryant, Gel structure impacts pericellular and extracellular matrix deposition which subsequently alters metabolic activities in chondrocyte-laden PEG hydrogels, *Acta Biomater* 7 (2010) 492.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2010.08.021>.
- [289] T. Gao, A.J. Boys, C. Zhao, K. Chan, L.A. Estroff, L.J. Bonassar, Non-Destructive Spatial Mapping of Glycosaminoglycan Loss in Native and Degraded Articular Cartilage Using Confocal Raman Microspectroscopy, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 744197.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.744197/BIBTEX>.
- [290] J. Huang, Z. Bu, W. Liu, Z. Zhou, J. Hu, J. Yu, H. Wang, S. Xu, P. Wu, Cartilage decellularized matrix hydrogel loaded with protocatechualdehyde for targeted epiphysean treatment of osteoarthritis, *Mater Today Bio* 27 (2024) 101124.
<https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2024.101124>.
- [291] T.L. Vincent, O. McClurg, L. Troeberg, The Extracellular Matrix of Articular Cartilage Controls the Bioavailability of Pericellular Matrix-Bound Growth Factors to Drive Tissue Homeostasis and Repair, *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 6003 23 (2022) 6003. <https://doi.org/10.3390/IJMS23116003>.
- [292] H. Li, T. Zhao, Z. Yuan, T. Gao, Y. Yang, R. Li, Q. Tian, P. Tang, Q. Guo, L. Zhang, Cartilage lacuna-biomimetic hydrogel microspheres endowed with integrated biological signal boost endogenous articular cartilage regeneration, *Bioact Mater* 41 (2024) 61.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2024.06.037>.

APÉNDICES