

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

**DISEÑO, GENERACIÓN Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE  
SUSTITUTOS BIOMIMÉTICOS DE CARTÍLAGO HIALINO BASADOS  
EN LA COMBINACIÓN DE MICROTEJIDOS, CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES Y BIOMATERIALES**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



Tesis Doctoral de:

**David Sánchez Porras**

Realizado bajo la dirección de:

**Dr. Víctor Carriel Araya**

**Dr. Fernando Campos Sánchez**

**2023**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: David Sánchez Porras  
ISBN: 978-84-1195-105-0  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/85751>

**DISEÑO, GENERACIÓN Y EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE  
SUSTITUTOS BIOMIMÉTICOS DE CARTÍLAGO HIALINO BASADOS  
EN LA COMBINACIÓN DE MICROTEJIDOS, CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES Y BIOMATERIALES**

Memoria presentada por **D. David Sánchez Porras**, Graduado en Bioquímica con  
mención en Biotecnología y Máster en Ingeniería Tisular para aspirar al título de  
**Doctor por la Universidad de Granada con Mención Internacional**

***Fdo.: David Sánchez Porras***

***Fdo.: Víctor Carriel Araya***

*Doctor en Biomedicina  
Universidad de Granada, España  
Doctor en Health Sciences  
Universidad de Gante, Bélgica*

***Fdo.: Fernando Campos Sánchez***

*Doctor en Biomedicina  
Universidad de Granada, España*

**Departamento de Histología**

**Universidad de Granada**

**2023**

El doctorando/ *The doctoral candidate*, **David Sánchez Porras**, y los directores de la tesis/ *and the tesis supervisors*, **D. Víctor Carriel Araya y/ and D. Fernando Campos Sánchez**,

Garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Granada a 28 de julio de 2023

***Fdo.: David Sánchez Porras***  
*Doctorando/doctoral candidate*

***Fdo.: Víctor Carriel Araya***  
*Director de Tesis/Thesis supervisor*

***Fdo.: Fernando Campos Sánchez***  
*Director de Tesis/Thesis supervisor*



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular CTS-115 del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Los estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por el grupo de Investigación CTS-115 y por los siguientes proyectos de investigación:

- PI-0257-2017 y PE-0395-2019 de la Consejería de Salud y Familias; Junta de Andalucía, España.
- FIS PI17/0393, FIS PI20/00318, FIS PI20/0317 y FIS PI21/0980 del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, España.
- B-CTS-450-UGR20 y A-CTS-498-UGR18 de la Universidad de Granada, Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades, Junta de Andalucía, España y Unión Europea.

El período de investigación predoctoral del doctorando ha sido financiado por los siguientes proyectos de investigación:

- AC17/00013 NanoGSkin y FIS PI20/00318 (beca predoctoral de formación en Salud (PFIS) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, España (Id de expediente: FI21/00158).
- P18-RT-5059 de la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad; Junta de Andalucía.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos originales:

**1. Sánchez-Porras D, Durand-Herrera D, Paes AB, Chato-Astrain J, Verplancke R, Vanfleteren J, Sánchez-López JD, García-García ÓD, Campos F, Carriel V. Ex Vivo Generation and Characterization of Human Hyaline and Elastic Cartilaginous Microtissues for Tissue Engineering Applications. Biomedicines. 2021 Mar 12;9(3):292. doi: 10.3390/biomedicines9030292**  
**Factor de Impacto: 4,757 Categoría: Pharmacology & Pharmacy. Cuartil: 2; Percentil: 69,35**

**2. Sánchez-Porras D, Durand-Herrera D, Carmona R, Blanco-Elices C, Garzón I, Pozzobon M, San Martín S, Alaminos M, García-García ÓD, Chato-Astrain J, Carriel V. Expression of Basement Membrane Molecules by Wharton Jelly Stem Cells (WJSC) in Full-Term Human Umbilical Cords, Cell Cultures and Microtissues. Cells. 2023 Feb 15;12(4):629. doi: 10.3390/cells12040629.**  
**Factor de Impacto: 6,00; Categoría: Cell Biology; Cuartil: 2; Percentil: 68,80.**

Otros trabajos y colaboraciones desarrollados por el doctorando, como autor preferente, durante su período como investigador predoctoral:

**1. Sánchez-Porras D**, Caro-Magdaleno M, González-Gallardo C, García-García OD, Garzón I, Carriel V, Campos F, Alaminos M. **Generation of a Biomimetic Substitute of the Corneal Limbus Using Decellularized Scaffolds**. *Pharmaceutics*. 2021 Oct 17;13(10):1718. doi: 10.3390/pharmaceutics13101718. **Factor de Impacto:** 6,525; **Categoría:** Pharmacology & Pharmacy; **Cuartil:** 1; **Percentil:** 86,20.

**2.** Irastorza-Lorenzo A, **Sánchez-Porras D**, Ortiz-Arrabal O, de Frutos MJ, Esteban E, Fernández J, Janer A, Campos A, Campos F and Alaminos M. Evaluation of Marine Agarose Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 15;22(4):1923. doi: 10.3390/ijms22041923. **Factor de Impacto:** 6,208; **Categoría:** Biochemistry and Molecular Biology; **Cuartil:** 1; **Percentil:** 76,94.

Autor de capítulos de libro:

**1. Sánchez-Porras D**, Varas J, Godoy-Guzmán C, Bermejo-Casares F, San Martín S and Carriel V. **Histochemical and immunohistochemical methods for the identification of proteoglycans**. *Histochemistry of single molecules*. *Methods Mol Biol*. 2023;2566:85-98. doi: 10.1007/978-1-0716-2675-7\_7. Editorial: Springer (**Ranking SPI internacional:** 4).

**2. Sánchez-Porras D**, Bermejo-Casares F, Carmona R, Weiss T, Campos F, Carriel V. **Tissue Fixation and Processing for the Histological Identification of Lipids**. *Histochemistry of single molecules*. *Methods Mol Biol*. 2023;2566:175-186. doi: 10.1007/978-1-0716-2675-7\_14. Editorial: Springer (**Ranking SPI internacional:** 4).

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el marco de una colaboración internacional, por lo que se opta al **Grado de Doctor con Mención Internacional**. El doctorando, D. David Sánchez Porras realizó una estancia de investigación predoctoral bajo la supervisión de la **Profa. Dra. Sandra Isabel Moreira Pinto Viera**, profesora del Departamento de Ciencias Médicas de la **Universidad de Aveiro, Portugal**, investigadora principal y directora del grupo de investigación “SPARK lab” del Instituto de Biomedicina de la Universidad de Aveiro (iBiMED/UA). Esta estancia se desarrolló en un periodo comprendido entre el 20 de Julio de 2021 y el 19 de octubre de 2021 (3 meses).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y, en especial, a mis padres Paquito y Ana. Por vuestro apoyo, cariño y sacrificio desde que me alcanza la memoria. Por estar siempre orgullosos de mí. Esta Tesis también es vuestra.

A mis directores Víctor Carriel y Fernando Campos, por haberme tendido la mano y apostar por mí desde el primer día que entre en el laboratorio. Por transmitirme vuestros conocimientos con paciencia, guiar mis pasos a lo largo de todo el camino y enseñarme lo bonito que puede ser el mundo de la investigación.

Al profesor Antonio Campos, por ser un ejemplo de pasión y determinación no solo el ámbito académico, sino en cualquier empresa que uno realice. A María del Carmen Sánchez, por la cercanía y ánimos recibidos durante todo este tiempo. Al profesor Miguel Alaminos, por preocuparse siempre por nosotros y responder con una sonrisa ante cualquier contratiempo.

Al resto de profesores del Departamento, Vicente, José Manuel, Cañizares, Ingrid, Miguel Ángel, Ismael, Aníbal... por todo vuestro apoyo y enseñanzas.

A Dani, por todos sus consejos, horas de trabajo y amistad sin las que habría sido imposible esta Tesis, que también es un poquito tuya.

A Jesús por estar ahí y enseñarme con paciencia y risas en mis inicios. Al resto de compañeros de laboratorio Ainhoa, Virginia, Óscar, Olimpia, Miguel, Etayo, Cristina, Paula, Marwa, Paloma y alumnos de máster sin los que el laboratorio no hubiera sido el mismo durante todos estos años.

A Fabi, por sus sabios consejos y mejores cortes. Por siempre sonreír. Por ser mi roca.

A nuestros vecinos de Aveiro, Sandra y Bárbara, por acogerme en momentos de necesidad.

A todos mis amigos del instituto y la carrera, que a pesar del tiempo y la distancia se que puedo contar con ellos.

Y a cualquiera que me haya podido dejar en el tintero, ¡Gracias!

## Abreviaciones

2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
AA	Azul alcían
ACI	Implante de condrocitos autólogos
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
BMP	Proteína morfogenética ósea
CEH	Condrocitos derivados de cartílago elástico humano
CEH-2D	Condrocitos derivados de cartílago elástico humano cultivados en dos dimensiones como control
CEH-MT	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago elástico humano
CEH-MT-MC	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago elástico humano en medio condrogénico
CEH-MT-ME	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago elástico humano en medio de expansión
CHH	Condrocitos derivados de cartílago hialino
CHH-2D	Condrocitos derivados de cartílago hialino humano cultivados en dos dimensiones como control
CHH-MT	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago hialino humano
CHH-MT-MC	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago hialino humano en medio condrogénico
CHH-MT-ME	Microtejidos derivados de condrocitos derivados de cartílago hialino humano en medio de expansión
Col	Colágeno
COMPs	Proteínas oligoméricas de matriz de cartílago
DEV	Desarrollo <i>ex vivo</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FA CHH	Fibrina-agarosa con condrocitos hialinos humanos
FA CHH-MT	Hidrogeles de fibrina-agarosa con microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos
FACITs	Colágenas asociadas a triples hélices interrumpidas
FBS	Suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAGs	Glucosaminoglucanos
GPs	Glucoproteínas
HE	Hematoxilina-eosina
HSPG2	Heparán sulfato o perlecano
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
IT	Ingeniería Tisular

LAM	Laminina
MACI	Implante de condrocitos autólogos asistido por matriz
MC	Medio condrogénico
ME	Medio de expansión
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MTs	Microtejidos
NID-1	Nidogenina-1
PAS	Ácido periyódico de Schiff
PBS	Tampón fosfato
PCNA	Antígeno de proliferación celular
PDMS	Polidimetilsiloxano
PGs	Proteoglucanos
PS	Rojo picrosirius
RER	Retículo endoplasmático rugoso
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
WJSC	Células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton
WJSC-2D	Células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton cultivadas en dos dimensiones como control
WJSC-MTs	Microtejidos derivado de células madre mesenquimales humanas de la gelatina de Wharton
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium</i>



## **ÍNDICE**

<b>I. RESUMEN</b> .....	16
1. Resumen .....	17
2. Summary .....	22
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	27
<b>III. ESTADO DEL ARTE</b> .....	30
1. Generalidades del tejido cartilaginoso .....	31
1.1. Concepto y características del tejido cartilaginoso .....	31
1.2. Elementos constituyentes del tejido cartilaginoso .....	31
- Población celular condrocítica .....	31
- Matriz extracelular .....	34
1.3 Pericondrio y nutrición del tejido cartilaginoso .....	40
1.4 Variedades de tejido cartilaginoso .....	41
1.4.1 Tejido cartilaginoso hialino .....	42
- Cartílago hialino articular .....	45
1.4.2 Tejido cartilaginoso elástico .....	47
1.4.3 Tejido cartilaginoso fibroso .....	48
1.5 Histogénesis, crecimiento y reparación del tejido cartilaginoso .....	49
2. Patologías del tejido cartilaginoso hialino .....	51
3. Ingeniería Tisular .....	55
3.1. Origen y evolución de la Ingeniería Tisular .....	55
3.2. Elementos básicos de la Ingeniería Tisular .....	56
3.2.1. Células .....	57
3.2.2. Biomateriales .....	59
3.2.3. Factores de inducción .....	61
3.3. Estrategias de biofabricación de tejidos artificiales .....	62
- Tejidos artificiales generados por elaboración de constructos .....	62
- Tejidos artificiales generados por descelularización y recelularización .....	62
- Tejidos artificiales generados por bioimpresión .....	63
- Tejidos artificiales generados mediante la elaboración de microtejidos .....	63
<b>IV. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	68
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	70
1. Objetivo general .....	71
2. Objetivos específicos .....	71
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	72

1. Procesamiento de muestras y obtención de cultivos primarios.....	73
2. Generación de microtejidos mediante microchips de agarosa.....	75
2.1. Elaboración de moldes .....	75
2.2. Generación de microchips de agarosa .....	76
2.3. Cultivo y generación de microtejidos .....	77
3. Generación de sustitutos artificiales mediante encapsulación en hidrogeles de fibrina-agarosa.....	80
4. Caracterización de los microtejidos y sustitutos generados .....	82
4.1. Análisis morfológico del desarrollo de los microtejidos .....	82
4.2. Evaluación de la viabilidad y función celular .....	82
4.2.1. Análisis microscópico de la viabilidad celular .....	83
4.2.2. Cuantificación de ADN liberado.....	83
4.2.3. Determinación de la actividad metabólica .....	83
4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico .....	84
4.4. Análisis ultraestructural .....	87
5. Análisis cuantitativos y estadísticos .....	87
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>88</b>
1. Caracterización de los microtejidos derivados de condrocitos .....	89
1.1. Análisis morfológico .....	89
1.2. Evaluación de la viabilidad y función celular .....	93
1.2.1. Análisis microscópico de la viabilidad celular .....	93
1.2.2. Cuantificación de ADN liberado.....	95
1.2.3. Determinación de la actividad metabólica .....	96
1.3. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos .....	98
2. Caracterización de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton.....	107
2.1. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico .....	107
2.2. Análisis ultraestructural .....	113
3. Evaluación de los sustitutos generados mediante encapsulación en hidrogeles de fibrina-agarosa. ....	115
3.1 Análisis microscópico de la viabilidad celular .....	115
3.2. Determinación de la actividad metabólica .....	116
3.3. Análisis histológico e histoquímico .....	117
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>120</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
1. Conclusiones .....	134

<b>1. Conclusions</b> .....	136
<b>X. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS</b> .....	138

## **I. RESUMEN**

## 1. Resumen

El tejido cartilaginoso es una variedad de tejido conjuntivo especializado compuesto por células (condrocitos) inmersas en una abundante y altamente especializada matriz extracelular (MEC). Esta MEC se caracteriza por la presencia de fibras (fibras colágenas y/o elásticas) embebidas en un gel altamente hidratado de polisacáridos, principalmente proteoglucanos y algunas glucoproteínas. La combinación y distribución de estas moléculas es fundamental para alcanzar las propiedades biomecánicas características de estos tejidos. Por otro lado, destaca la importancia de la composición de la MEC a la hora de la supervivencia de los condrocitos, ya que permite la difusión y tráfico de sustancias a lo largo de un tejido que presenta la singularidad de ser avascular.

Histológicamente, podemos diferenciar tres variedades de tejidos cartilagosos: el hialino, el elástico y el fibroso. El tejido cartilaginoso hialino, que cuenta con una MEC homogénea rica en fibras colágenas tipo II, glucosaminoglucanos (GAGs), proteoglucanos y glucoproteínas. Este tejido es el encargado de dar soporte y biomecánica a diferentes estructuras, como la nariz, costillas, tráquea y bronquios. Además, es fundamental durante el desarrollo, ya que forma gran parte del esqueleto del individuo (a excepción de la cabeza) sirviendo como soporte para la formación de tejido óseo. Por otro lado, esta variedad de cartílago constituye además el cartílago de crecimiento o metáfisis de los huesos largos, y el cartílago articular. Este último, se encuentra en las superficies óseas de las articulaciones sinoviales y provee una superficie que permite el deslizamiento de los huesos durante el movimiento. El cartílago articular actúa disminuyendo el daño mecánico, absorbiendo el impacto y distribuyendo las diferentes cargas entre las superficies óseas. Debido a su función y localización, el cartílago articular presenta características histológicas propias que lo diferencian del resto de cartílagos hialinos.

En relación con el tejido cartilaginoso elástico, de localización específica (pabellón auricular, conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio y laringe), se caracteriza por la presencia de fibras elásticas, como elemento principal, en

su MEC, además de fibras colágenas tipo II y diversos proteoglicanos. Por último, en el tejido cartilaginoso fibroso destaca la presencia de fibras colágenas tipo I. Podemos localizar esta variedad en los discos intervertebrales, sínfisis del pubis, meniscos, entesis osteotendinosas y en algunas articulaciones como la esternoclavicular, la temporomandibular y el complejo fibrocartilaginoso triangular de la muñeca.

Los tejidos y estructuras cartilaginosas pueden verse afectados por patologías de diversa índole, ya sean de etiología degenerativa, traumática, autoinmune o incluso neoplásica. En este sentido, las lesiones del cartílago hialino articular presentan una elevada prevalencia y tienen un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes afectados. Entre ellas destaca la osteoartritis, una patología degenerativa causada por el desgaste progresivo del cartílago articular. Debido a sus características especiales, la capacidad de regeneración del cartílago y en especial del cartílago articular, es limitada. Los tratamientos actuales no presentan resultados satisfactorios en términos de recuperación de funcionalidad y pérdida de dolor a largo plazo, por lo que el desarrollo de nuevos sustitutos de cartílago hialino articular para su uso clínico continúa hoy en día siendo un reto vigente.

La Ingeniería Tisular (IT), cuyo potencial está abalado por el éxito en la translación clínica de diversos sustitutos artificiales, ha permitido conseguir grandes logros en medicina regenerativa. A pesar de ello, los resultados a la hora de intentar abordar la reparación y regeneración de las patologías que afectan a los tejidos cartilaginosos hialinos han presentado resultados no del todo satisfactorios. El fracaso de estas estrategias puede estar relacionado con la pérdida o falta de propiedades estructurales y biológicas de sus diversos componentes, así como con aspectos relacionados a la viabilidad y función celular en los sustitutos generados. Para mejorar la eficacia terapéutica, uno de los principales retos de la IT se centra en aumentar las características biomiméticas de los estos productos. Por esta razón, gran parte de las ramas de innovación dentro de la IT se centran en la búsqueda de nuevas fuentes celulares y/o nuevos métodos de biofabricación que incrementen las diversas propiedades de los sustitutos artificiales.

Acompañando a los avances tecnológicos, diversas alternativas metodológicas a los cultivos tradicionales han emergido en los últimos tiempos. Una de ellas, la técnica de los microtejidos (MTs), permite la creación de un ambiente de cultivo tridimensional que prima los contactos célula-célula y la síntesis de moléculas de la MEC de manera controlada. De esta manera, es posible generar *ex vivo* estructuras tridimensionales estables conformadas exclusivamente por células y la MEC que ellas mismas generan. Estas estructuras originan unidades funcionales y metabólicamente activas que se caracterizan por un alto grado de viabilidad, funcionalidad y biomimetismo, representando una alternativa prometedora en el campo de la IT del cartílago u otros tejidos como el nervio periférico. Otra línea de investigación vigente es la búsqueda de fuentes celulares alternativas a las tradicionalmente aplicadas en la regeneración articular. En este aspecto, los condrocitos elásticos (células de fácil aislamiento, mayor tasa de proliferación en comparación a los condrocitos articulares y con gran síntesis de componentes de la MEC) o las células madre mesenquimales (células con alta capacidad de proliferación y diferenciación) pueden suponer una alternativa interesante a las fuentes celulares empleadas tradicionalmente.

En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se estudió la generación *ex vivo* de MTs a partir de condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH), cartílago elástico humano (CEH) y células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJSC), y se determinó sus propiedades biológicas y estructurales durante 28 días de desarrollo *ex vivo* (DEV). Los MTs fueron generados mediante la técnica de microchips de agarosa. Para ello, mediante el uso de moldes de polidimetilsiloxano (PDMS), se generaron réplicas de agarosa tipo I con un patrón definido de micropocillos. Sobre dichos pocillos se sembraron las células, definiéndose 5 grupos de estudio en función del origen celular (cartílago hialino, cartílago elástico o cordón umbilical) y, en el caso de los MTs derivados de cartílago, del medio de cultivo en el que fueron mantenidos los condrocitos hialinos y elásticos [medio de expansión (ME) o condrogénico (MC)].

La formación y desarrollo de los MTs derivados de condrocitos fue evaluada morfométricamente de manera diaria durante los 4 primeros días y pasados 7,



14, 21 y 28 días de DEV. Por el contrario, para los ensayos de viabilidad celular, actividad metabólica y el análisis histológico, los MTs generados fueron evaluados exclusivamente a partir del día 4 de DEV. Por otra parte, los MTs derivados de WJSC fueron exclusivamente analizados en términos histológicos e inmunohistoquímicos para determinar la capacidad de síntesis de los componentes de MEC y membrana basal, ya que el perfil morfométrico y de viabilidad de dichos MTs ya había sido caracterizado en trabajos previos del grupo de investigación. Los resultados demostraron la posibilidad de generar *ex vivo* estructuras estables, viables y con gran capacidad de síntesis de componentes de la MEC durante todo el periodo de desarrollo. Además, se demostró la influencia del medio de cultivo aplicado a los MTs derivados de condrocitos en la capacidad de síntesis de dichos componentes, revelándose el MC como un potenciador de la misma. Interesantemente, los MTs derivados de células mesenquimales del cordón umbilical exhibieron la capacidad de generar los principales componentes de las membranas basales, (coincidiendo con la expresión positiva de los MTs derivados de condrocitos para el colágeno tipo IV). Los resultados demostraron la expresión nativa de estos componentes en el cordón umbilical a término y la capacidad de síntesis aumentada de las WJSC cuando fueron sometidos a condiciones de cultivo tridimensionales respecto a cultivos tradicionales en dos dimensiones (2D). Ya que las moléculas de membrana basal juegan un rol fundamental en la función de diversas estructuras, como la matriz pericelular de los condrocitos o la lámina basal de las células de Schwann, estos resultados se presentan prometedores para su futura aplicación tanto en IT de cartílago como para otros tejidos como el nervio periférico.

Siguiendo la investigación en la regeneración de cartílago, se realizó un análisis *ex vivo* del comportamiento de los CHH-MT-MC en un hidrogel compuesto de fibrina-agarosa (FA). Estos cultivos fueron evaluados tras 7, 14 y 28 días de DEV en términos de viabilidad y función celular. Adicionalmente, mediante análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos, se analizó el patrón de distribución celular y la síntesis de moléculas de la MEC. Los resultados de estos análisis demostraron la presencia de células viables y metabólicamente activas durante todo el periodo analizado. Además, la histología demostró la capacidad de los CHH formadores de MTs de colonizar el biomaterial, sin producir daños

en el mismo, a la vez que sintetizan compuestos de la MEC, como colágeno tipo IV, durante su desarrollo *ex vivo*.

En conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral avalan, por un lado, la posibilidad de generar MTs cartilaginosos estables y funcionales a partir de condrocitos derivados de cartílago hialino y cartílago elástico, además de acreditar la influencia positiva del medio condrogénico durante su desarrollo. Por otro lado, los análisis efectuados demuestran el aumento en la síntesis de componentes de MEC, y en específico de membrana basal, durante el desarrollo de los MTs derivados de WJSC. Los resultados también demuestran la posibilidad de encapsular estos MTs en hidrogeles de FA y la viabilidad y capacidad de síntesis de componentes de la MEC durante su desarrollo en el biomaterial. Sin embargo, estudios futuros son necesarios para determinar el potencial regenerativo y la posible aplicación de los diferentes MTs y sustitutos artificiales generados en la presente Tesis Doctoral.

## 2. Summary

Cartilaginous tissue is a variety of specialized connective tissue composed of cells (chondrocytes) immersed in an abundant and highly specialized extracellular matrix (MEC). This MEC is characterized by the presence of fibers (collagen and/or elastic fibers) embedded in a highly hydrated gel of polysaccharides, mainly proteoglycans and some glycoproteins. The combination and distribution of these molecules is fundamental to achieve the biomechanical properties characteristic of these tissues. On the other hand, it highlights the importance of the composition of the MEC in the survival of chondrocytes since it allows the diffusion and traffic of substances along a tissue that presents the singularity of being avascular.

Histologically, we can differentiate three varieties of cartilaginous tissues: hyaline, elastic and fibrous. The hyaline cartilaginous tissue, which has a homogeneous MEC rich in type II collagen fibers, glycosaminoglycans (GAGs), proteoglycans and glycoproteins. This tissue is responsible for providing support and biomechanics to different structures, such as the nose, ribs, trachea and bronchi. In addition, it is fundamental during development, since it forms a large part of the skeleton of the individual (except for the head), serving as a support for bone formation. On the other hand, this variety of cartilage also constitutes the growth plate or metaphysis of the long bones, and the articular cartilage. The latter is found on the bone surfaces of the synovial joints and provides a surface that allows the bones to slide during movement. Articular cartilage acts by decreasing mechanical damage, absorbing impact and distributing the different loads between the bone surfaces. Due to its function and location, articular cartilage has its own histological characteristics that differentiate it from other hyaline cartilages.

Elastic cartilaginous tissue, with specific localization (pinna, external auditory canal, Eustachian tube and larynx), is characterized by the presence of elastic fibers, as the main element, in its MEC, in addition to type II collagen fibers and various proteoglycans. Finally, in the fibrous cartilaginous tissue, the presence of type I collagenous fibers stands out. This variety can be found in the intervertebral

discs, symphysis pubis, menisci, osteotendinous entheses and in some joints such as the sternoclavicular, temporomandibular and the triangular fibrocartilaginous complex of the wrist.

Cartilaginous tissues and structures can be affected by various pathologies, whether of degenerative, traumatic, autoimmune or even neoplastic etiology. In this regard, articular hyaline cartilage lesions are highly prevalent and have a great impact on the quality of life of affected patients. Among them, osteoarthritis stands out, a degenerative pathology caused by progressive wear and tear of the articular cartilage. Due to its special characteristics, the regenerative capacity of cartilage, especially articular cartilage, is limited. Current treatments do not show satisfactory results in terms of functional recovery and long-term pain loss, so the development of new hyaline articular cartilage substitutes for clinical use remains a challenge today.

Tissue engineering (TE), whose potential has been demonstrated by the successful clinical translation of various artificial substitutes, has enabled great achievements to be made in regenerative medicine. Despite this, the results when attempting to address the repair and regeneration of pathologies affecting hyaline cartilage tissues have not been entirely satisfactory. The failure of these strategies may be related to the loss or lack of structural and biological properties of their various components, as well as to aspects related to cell viability and function in the substitutes generated. To improve therapeutic efficacy, one of the main challenges of TE focuses on enhancing the biomimetic characteristics of these products. For this reason, a large part of the innovation branches within TE focus on the search for new cell sources and/or new biofabrication methods that increase the diverse properties of artificial substitutes.

Accompanying technological advances, several methodological alternatives to traditional cultures have recently emerged. One of them, the microtissue technique (MTs), allows for the creation of a three-dimensional culture environment that favors cell-cell contacts and the synthesis of MEC molecules in a controlled manner. In this way, it is possible to generate *ex vivo* stable three-dimensional structures consisting exclusively of cells and the MEC they

themselves generate. These structures give rise to functional and metabolically active units characterized by a high degree of viability, functionality and biomimicry, representing a promising alternative in the field of cartilage IT or other tissues such as the peripheral nerve. Another current line of research is the search for alternative cell sources to those traditionally applied in joint regeneration. In this aspect, elastic chondrocytes (cells of easy isolation, higher proliferation rate compared to articular chondrocytes and with high synthesis of MEC components) or mesenchymal stem cells (cells with high proliferation and differentiation capacity) may represent an interesting alternative to the cell sources traditionally employed.

In this regard, in the present PhD Thesis we studied the *ex vivo* generation of MTs from chondrocytes derived from human hyaline cartilage (CHH), human elastic cartilage (CEH) and Wharton's jelly umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (WJSC), and determined their biological and structural properties during 28 days of *ex vivo* development (DEV). MTs were generated using the agarose microchip technique. For this purpose, using polydimethylsiloxane (PDMS) molds, type I agarose replicates with a defined pattern of microwells were generated. Cells were seeded on these wells, defining 5 study groups according to cell origin (hyaline cartilage, elastic cartilage or umbilical cord) and, in the case of cartilage-derived MTs, the culture medium in which the hyaline and elastic chondrocytes were maintained [expansion medium (ME) or chondrogenic medium (MC)].

The formation and development of chondrocyte-derived MTs was evaluated morphometrically on a daily basis during the first 4 days and after 7, 14, 21 and 28 days of DEV. In contrast, for cell viability assays, metabolic activity and histological analysis, the generated MTs were evaluated exclusively after day 4 of DEV. On the other hand, WJSC-derived MTs were exclusively evaluated in histological and immunohistochemical terms to determine the synthesis capacity of MEC and basement membrane components, since previous work by the research group had already characterized these MTs in terms of morphometry and viability. The results demonstrated the possibility of generating *ex vivo* stable, viable structures with high synthesis capacity of MEC components during the

whole development period. Furthermore, the influence of the culture medium applied to the chondrocyte-derived MTs on the synthesis capacity of these components was demonstrated, with the MC revealing itself as an enhancer of the same. Interestingly, umbilical cord mesenchymal cell-derived MTs exhibited the ability to generate major basement membrane components, (coinciding with the positive expression of chondrocyte-derived MTs for type IV collagen). The results demonstrated the native expression of these components in the term umbilical cord and the increased synthesis capacity of WJSCs when subjected to three-dimensional culture conditions relative to traditional two-dimensional (2D) cultures. Since basement membrane molecules play a fundamental role in the function of various structures, such as the pericellular matrix of chondrocytes or the basal lamina of Schwann cells, these results show promise for future application both in cartilage IT and for other tissues such as the peripheral nerve.

Following the research in cartilage regeneration, an *ex vivo* analysis was conducted on the behavior of CHH-MT-MC within a hydrogel composed of fibrin-agarose (FA). These cultures were evaluated after 7, 14 and 28 days of DEV, and cell viability and function assays were performed. Additionally, cell distribution pattern and synthesis of MEC molecules were analyzed by histological, histochemical and immunohistochemical analyses. The results of these analyses demonstrated the presence of viable and metabolically active cells during the entire period analyzed. In addition, histology demonstrated the ability of MT-forming CHH to colonize the biomaterial, without causing damage to it, while synthesizing MEC compounds, such as type IV collagen, during their *ex vivo* development.

In conclusion, the results of this Doctoral Thesis support, on the one hand, the possibility of generating stable and functional cartilaginous MTs from chondrocytes derived from hyaline cartilage and elastic cartilage, in addition to accrediting the positive influence of the chondrogenic medium during their development. On the other hand, the analyses carried out demonstrate the increase in the synthesis of MEC components, and specifically of the basement membrane, during the development of WJSC-derived MTs. The results also demonstrate the possibility of combining these MTs in FA hydrogels and the

viability and capacity of synthesis of MEC components during their development in the biomaterial. However, future studies are needed to determine the regenerative potential and possible application of the different MTs and artificial substitutes generated in this PhD Thesis.

## **II. INTRODUCCIÓN**



Diversas patologías pueden afectar a los tejidos cartilagosos y, en particular las que afectan al tejido hialino articular, presentan una alta prevalencia en la población. Los tratamientos actuales no han conseguido restablecer la funcionalidad de dichos tejidos a largo plazo, por lo que nuevas estrategias de regeneración son necesarias. En este contexto, surge la Ingeniería Tisular (IT), que tiene como objetivos la reparación, restauración o mejora de los tejidos y/o órganos dañados o perdidos [1, 2]. Para ello, la IT se sustenta en tres pilares básicos: las células, los biomateriales y las biomoléculas. Mediante la combinación de estos tres elementos se diseñan y generan los tejidos artificiales que se aplican en IT. En la actualidad, una parte importante de los esfuerzos dentro de la IT se centran en, dentro de estos pilares básicos, encontrar diferentes alternativas que permitan mejorar la biocompatibilidad y el éxito de los posibles tejidos artificiales generados.

Atendiendo al apartado celular, numerosas opciones han surgido en los últimos años para suplir las carencias que puedan presentar las fuentes celulares tradicionales. Una de ellas es la técnica de generación de microtejidos (MTs) mediante microchips de agarosa. Esta técnica permite, mediante el control de las condiciones de cultivo y sin la necesidad de la utilizar biomateriales externos, la generación de estructuras tridimensionales funcionales. Gracias a esta técnica es posible promover las interacciones célula-célula y la síntesis de MEC para así conformar estructuras tridimensionales compuestas exclusivamente por células y la MEC generada por ellas mismas. La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio la técnica de los microtejidos y en su potencial aplicación a protocolos de IT de cartílago y otros tejidos.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se abordará, en primer lugar, el estado del arte del tejido cartilaginoso, atendiendo a sus generalidades, componentes, clasificación y patologías. Posteriormente se abordará la IT, los conceptos clave y los pilares fundamentales en los que sustenta. Se comentarán los paradigmas actuales de la IT del cartílago, profundizando especialmente en la IT del cartílago articular. Se expondrán las características de técnicas de biofabricación de tejidos artificiales, enfatizando el apartado celular y en la técnica de los MTs, objeto central de la presente Tesis Doctoral. Tras concluir el estado del arte, se

abordarán la hipótesis, justificación y los objetivos del proyecto. Tras ello, se detallará la metodología aplicada para la generación y caracterización de los MTs derivados de diferentes fuentes celulares y los sustitutos cartilagosos basados en la combinación de MTs y biomateriales desarrollados en la presente Tesis Doctoral. Posteriormente, se presentarán los resultados obtenidos seguidos de la discusión y por último las conclusiones derivadas del desarrollo del presente proyecto.

### **III. ESTADO DEL ARTE**

# **1. Generalidades del tejido cartilaginoso**

## **1.1. Concepto y características del tejido cartilaginoso**

El tejido cartilaginoso es una variedad de tejido conjuntivo adulto especializado formado por una población celular condrocítica y una MEC gelificada, rica en proteoglucanos, cuya función preferente en el organismo es la de sostén mecánico. Tiene un origen mesenquimal (en gran parte del organismo) y de la cresta neural (a nivel de la cabeza), y se caracteriza por su firmeza, resistencia y diferentes grados de flexibilidad, compresibilidad y deformabilidad. Estas propiedades biomecánicas se deben a la composición molecular y grado de hidratación de la MEC. El tejido cartilaginoso, a diferencia de otros tejidos conjuntivos, se caracteriza por la ausencia de vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas [3-5]. En nuestra especie existen tres variedades de tejido cartilaginoso; el hialino, el elástico y el fibroso ([3, 4]. Estas variedades serán descritas en detalle en los siguientes apartados del estado del arte. Es importante distinguir entre tejido cartilaginoso y cartílago. El tejido cartilaginoso es una variedad de tejido conjuntivo, mientras que los cartílagos son piezas anatómicas específicas, como el cartílago tiroides o cricoides, o partes de piezas anatómicas como los cartílagos costales o los anillos traqueales ([3, 4, 6].

## **1.2. Elementos constituyentes del tejido cartilaginoso**

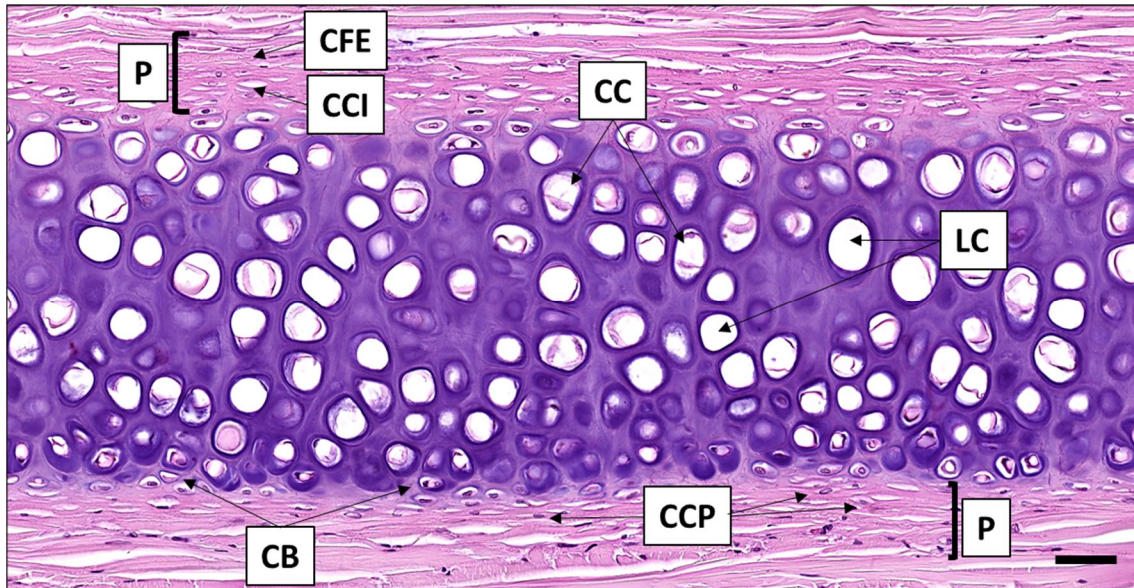
Como en el resto de los tejidos conjuntivos, los tejidos cartilaginosos están constituidos por dos elementos básicos y comunes en sus tres variedades; una población celular condrocítica y una MEC altamente especializada, entre las que existe una relación célula-MEC muy característica.

### **- Población celular condrocítica**

La población celular del tejido cartilaginoso es escasa en términos cuantitativos (<5% peso) y comparativos a la cantidad de MEC, pero cumple funciones cruciales para la generación, mantenimiento y homeostasis del tejido ([3, 4, 6, 7].

Podemos clasificar las células del tejido cartilaginoso en tres tipos: células condroprogenitoras, condroblastos y condrocitos.

Las células condroprogenitoras o precondroblastos se localizan en la periferia del cartílago (Fig. 1), son de morfología fusiforme y con un citoplasma poco prominente. En su interior es posible encontrar gran número de ribosomas libres, algunas mitocondrias y escasa cantidad de retículo endoplasmático rugoso (RER) y aparato de Golgi [8]. Estas células, de apariencia fibroblástica, pueden ser identificadas histológicamente durante su estadio indiferenciado mediante su unión a la lectina aglutinina de cacahuete (*Arachis hypogaea*), no siendo selectivas para las mismas cuando estas células se diferencian [9]. La interacción entre señales mecánicas, factores de crecimiento (como el TGF- $\beta$ , BMP-2, FGF, etc.), factores de transcripción (como SOX-9) o la presencia y concentración de metabolitos (como la kartogenina o los niveles de oxígeno) regulan el proceso de diferenciación de estas células hacia condroblastos [10-12].



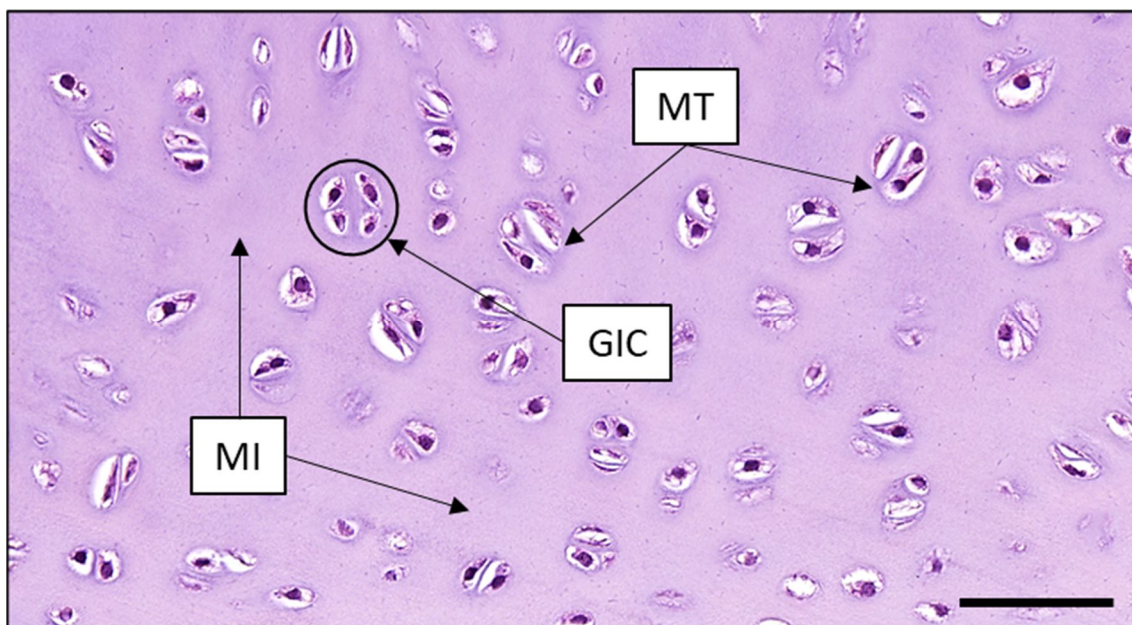
**Figura 1:** Corte histológico de cartilago elástico auricular de conejo mediante hematoxilina-eosina. En la periferia del tejido puede apreciarse el pericondrio (P) conformado por la capa fibrosa externa (CFE) y la capa celular interna (CCI). También pueden apreciarse las 3 poblaciones condrocíticas: células condroprogenitoras (CCP), condroblastos (CB) y condrocitos (CC) alojados en sus lagunas o condroceles (LC). Barra de escala: 50  $\mu$ m. Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

Los condroblastos, que algunos autores denominan condrocitos inmaduros, son células metabólicamente activas cuya principal función es la síntesis de MEC cartilaginosa. A la microscopía óptica presentan una morfología aplanada, poligonal u ovoidea y un núcleo y nucléolo prominentes. Su citoplasma es basófilo (debido a las abundantes organelas implicadas en la síntesis de proteínas) y mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se puede observar un RER y aparato de Golgi bien desarrollado, mitocondrias y un número variable de vesículas de secreción, lo cual denota su principal función, la síntesis de las diversas moléculas de la MEC (fibras colágenas, elásticas y sustancia fundamental amorfa) [3, 6].

En lo que respecta a los condrocitos, ésta es la célula madura del tejido cartilaginoso, y representa aproximadamente 5% del volumen total del mismo. Son células con menor actividad metabólica en comparación a los condroblastos. Al microscopio óptico se caracterizan por poseer una forma aplanada o esférica con un diámetro comprendido 10 y 30  $\mu\text{m}$ , aunque también puede adoptar formas semilunares, triangulares e incluso forma de mitra [13, 14]. Presentan un núcleo voluminoso, generalmente con nucléolo, y un citoplasma con inclusiones de glucógeno y lípidos. A la MET se observa un aparato de Golgi y un RER desarrollado. Una de las principales características de estas células es que se ubican en cavidades existentes en el seno de la MEC (Fig. 1). Dichas cavidades reciben la denominación de lagunas, condroplasmas o condroceles, siendo esta última denominación, propuesta por el español Luis Urtubey, la más acertada ya que el término condroplasma puede confundirse con el citoplasma de los condrocitos [15]. La clásica apariencia de los condrocitos en las preparaciones histológicas convencionales se debe a la conservación de esta capsula pericelular y a la pérdida simultánea de las inclusiones citoplasmáticas y retracción del citoplasma durante el procesamiento histológico (Fig. 1). Esta cavidad, originada durante el proceso de maduración del condroblasto, está delimitada por una MEC pericelular altamente especializada, que se comentará más adelante.

Los condrocitos se originan por diferenciación de los condroblastos y constituyen el estadio final de diferenciación de la línea celular cartilaginosa. En el tejido

cartilaginosa y sus diferentes variedades, los condrocitos pueden adoptar distinta disposición, pudiendo encontrarse aisladas aunque generalmente se asocian formando grupos isogénicos axiales o coronarios. La generación de un grupo u otro dependerá del proceso mitótico de los condrocitos. Si originan la superposición vertical de los condrocitos resultantes, los grupos isogénicos se denominan grupos isogénicos axiales. En cambio, si la distribución de los condrocitos tras la mitosis se produce en varias direcciones, se denominan grupos isogénicos coronarios [3, 4, 6], adoptando una disposición esférica y circular al corte histológico (Fig. 2).



**Figura 2:** Corte histológico de tejido cartilaginosa hialino humano teñido con hematoxilina-eosina. Pueden apreciarse la matriz interterritorial (MI) y la matriz territorial (MT) además de grupos isogénicos coronarios (GIC). Imagen original del Departamento de Histología de la Universidad de Granada. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

#### - Matriz extracelular

Al igual que la MEC de otras localizaciones, la producida por los condroblastos y condrocitos está compuesta por fibras y sustancia fundamental, esta última con un alto contenido de agua y electrolitos. En el componente fibrilar de la matriz cartilaginosa podemos encontrar fibras colágenas y elásticas, representando las primeras la mayor parte del componente fibrilar del tejido cartilaginosa. En el organismo podemos encontrar 28 tipos de moléculas de fibras colágenas, las

cuales se clasifican en fibras colágenas fibrilares (tipos I, II, III, V, XI, XXIV y XXVII), asociadas a colágenas con triples hélices interrumpidas (FACITs) (tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI y XXII), formadoras de redes hexagonales (tipos VIII y X), formadores de estructuras basal (IV, VI y VII), transmembranales (tipos XIII, XVII, XXIII y XXV), multiplexinas (tipos XV y XVIII) y otros tipos de fibras colágenas (tipos XXVI y XXVIII) [16-18].

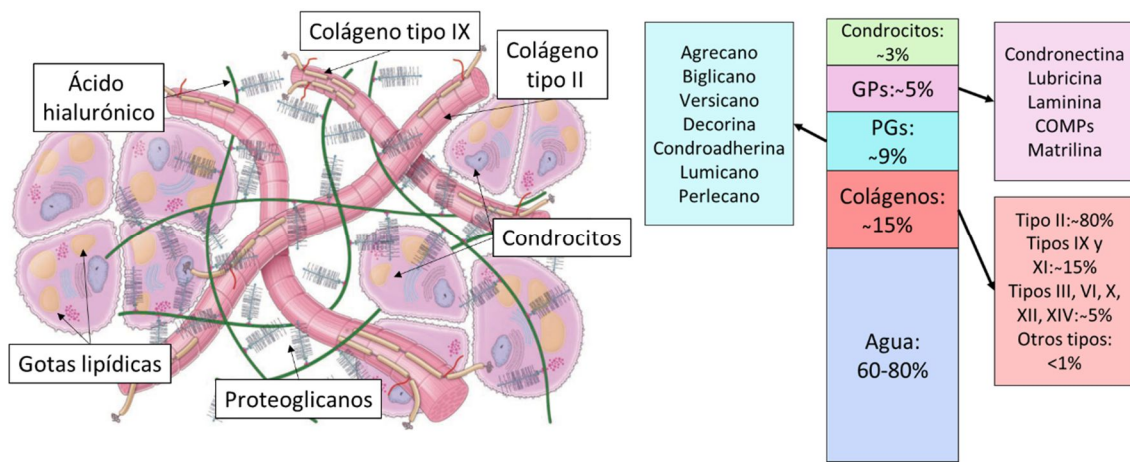


**Figura 3:** Imagen por microscopía electrónica de transmisión (MET) de fibrillas de colágena presentes en la matriz extracelular del cordón umbilical humano a término. En el corte longitudinal es posible apreciar el patrón de bandas transversales repetido cada 68 nm. Barra de escala: 200 nm. Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

La fibra colágena más abundante en vertebrados es la del tipo I [3, 4, 6]. Las fibras colágenas son producidas por diversos tipos celulares, y en el caso del cartílago, los condroblastos y condrocitos son responsables de sintetizar las fibras colágenas del tipo I (propio del cartílago fibroso) y tipo II (mayoritario en el cartílago hialino y presente en el elástico). En el cartílago, podemos encontrar otras variedades de fibras colágenas (Fig. 4), como los tipos III (presente en la matriz territorial y capsula pericelular), IV y VI (en la capsula pericelular), V (asociada a fibras colágenas tipo I), IX y XI (asociados a fibras colágenas tipo II), y X (asociado a condrocitos hipertróficos) [3, 19]. Las fibras colágenas de la matriz cartilaginosa forman una red tridimensional que regula la estructura, dimensiones y resistencia mecánica de los cartílagos. Es posible la identificación histológica de las colágenas tipo I y III mediante técnicas histológicas como los tricrómicos (Masson, Mallory o Gomori) o el método rojo picosirius (PS). Sin

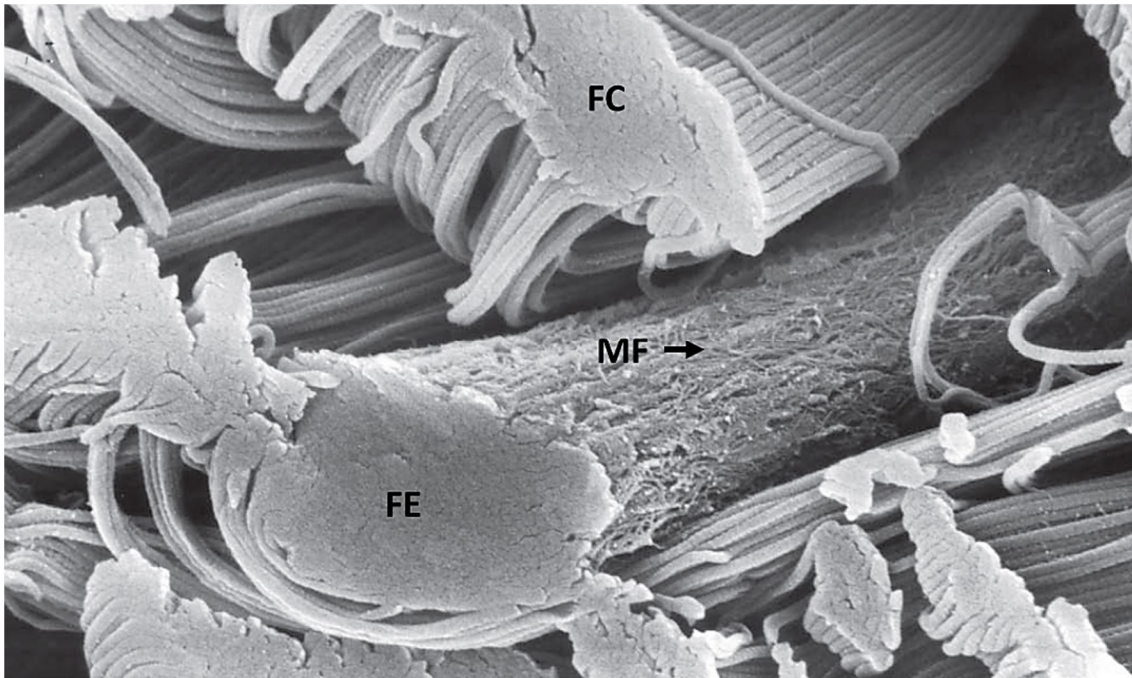


embargo, para el resto de colágenos es necesario recurrir a técnicas inmunohistoquímicas [20].



**Figura 4:** Distribución y composición molecular del cartílago hialino. PGs: proteoglicanos. GPs: Glucoproteínas. Modificado de Ross [3].

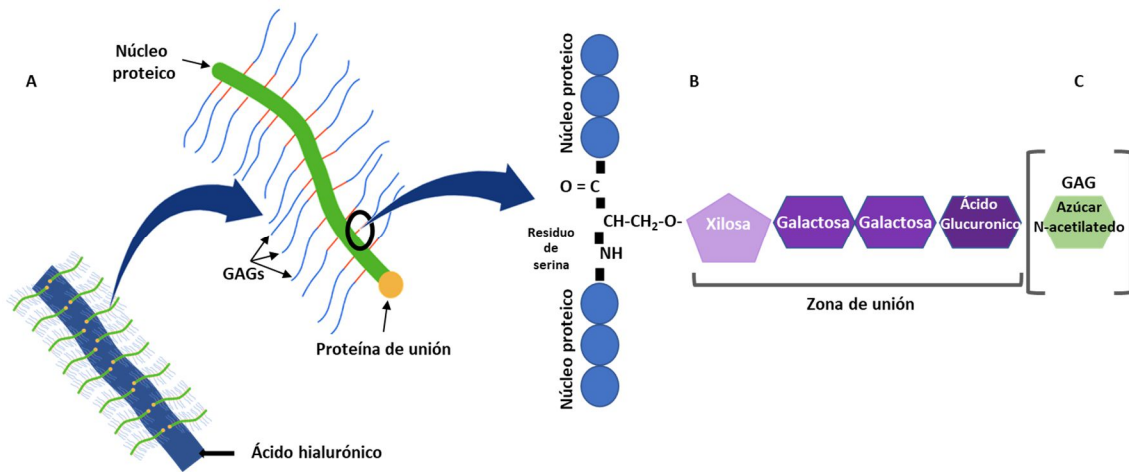
En el caso de las fibras elásticas, segundo tipo de fibras más abundantes del organismo, pueden ser encontrados dentro de los tejidos cartilagosos exclusivamente en la variedad elástica [4, 5]. Gracias a la naturaleza hidrófoba de la elastina, componente principal de estas fibras, y a la anastomosis entre ellas (Fig. 5), las fibras elásticas pueden estirarse y deslizar unas sobre otras, pero recuperar su posición inicial cuando cesa el estímulo, otorgando al tejido una gran elasticidad, flexibilidad y una extraordinaria capacidad de deformación [3, 4]. Para su identificación histológica encontramos la técnica de Verhoeff, la orceína o la resorcina fucsina de Weigert, además de posibles métodos inmunohistoquímicos [20].



**Figura 5:** Imagen de microscopía electrónica de barrido de una fibra elástica (FE) rodeada de fibrillas de colágena (FC). Nótese la presencia de microfibrillas de fibrilina (MF) en la superficie de la FE. 40000 X. Modificado de Ross [3].

La sustancia fundamental o MEC no fibrilar, ocupa los espacios entre las fibras y las células. Homogénea, viscosa, transparente e incolora, antiguamente era denominada como sustancia fundamental amorfa, terminología progresivamente en desuso. Las principales moléculas de la MEC no fibrilar son los proteoglucanos y las glucoproteínas [3, 4, 6].

Los proteoglucanos están compuestos por un núcleo proteico al que se asocian largas cadenas de polisacáridos denominados glucosaminoglucanos (GAGs) (Fig. 6), siendo el ácido hialurónico el GAG más abundante y encontrando otros como el condroitín sulfato, el dermatán sulfato, el heparán sulfato y el queratán sulfato en menor proporción [4, 6, 21]. En el tejido cartilaginoso es posible encontrar grandes complejos macromoleculares formados por la unión de múltiples proteoglucanos a moléculas de ácido hialurónico. Entre ellos, el proteoglucano más abundante es el agregano, seguido por el biglicano y la decorina [4, 21, 22].



**Figura 6:** Representación esquemática de la estructura de un proteoglucano. A: Estructura del proteoglucano con glucosaminoglucanos (GAGs) (azul) unidos a núcleo proteico (verde) por una región de enlace (rojo) y proteína de unión al eje del ácido hialurónico (amarillo). B: Región de enlace entre un GAG y el residuo de serina de la proteína del núcleo proteico. C: La región de azúcar N-acetilado definirá el tipo de proteoglucano. Modificado de (Sánchez-Porras et al 2023) [23].

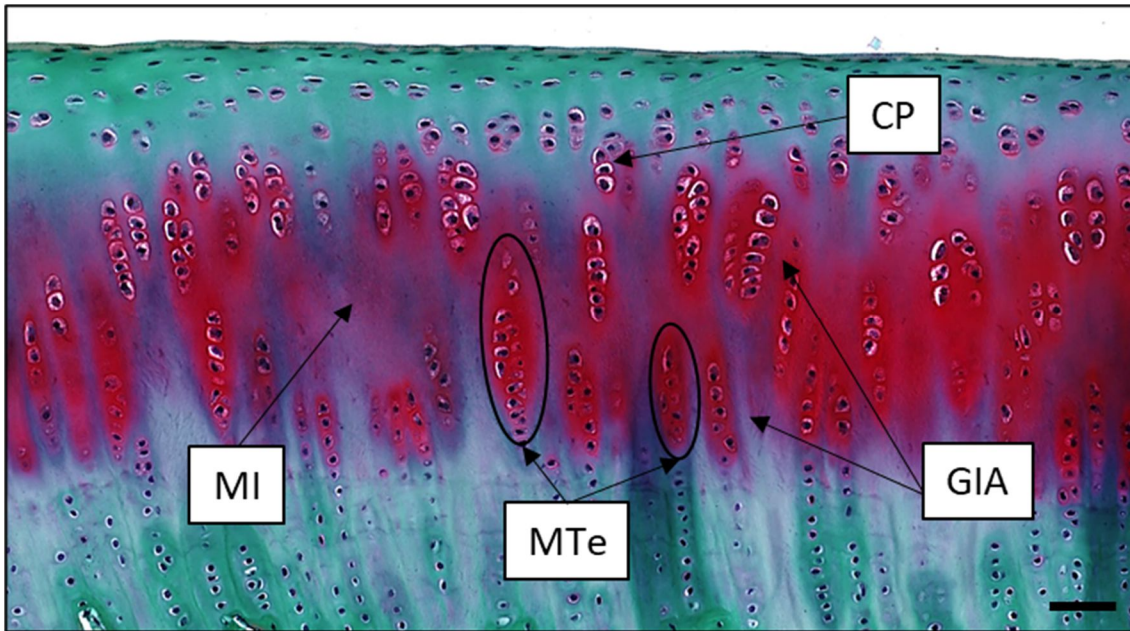
Los complejos moleculares originados por los proteoglucanos, y en especial el agregano, son muy ricos en cargas negativas lo que les confiere una gran capacidad para retener moléculas de agua e iones con carga positiva como el sodio. De esta manera, la matriz del cartílago se hidrata, siendo así responsable de la alta presión osmótica del tejido y de la alta capacidad para resistir las fuerzas de compresión [3, 5, 24, 25]. Además, cabe destacar la presencia de diversos proteoglucanos en la capsula pericelular de los condrocitos, como el perlecan (heparán sulfato proteoglucano o HSPG2) y el biglicano, tomando importantes funciones estructurales y en la señalización de moléculas [21, 22].

El último componente mayoritario de la sustancia fundamental son las glucoproteínas multiadhesivas. Estas moléculas están constituidas por una proteína compleja, a la que se unen cadenas de polisacáridos diferentes a los GAGs. Desempeñan funciones en la estabilización de la MEC y en la interacción célula-MEC. De esta manera intervienen en el movimiento y migración de las células a través de la MEC y en la proliferación y diferenciación celular [3, 26]. Algunos tipos de glucoproteínas que aparecen distribuidos por múltiples tejidos (incluidos el tejido cartilaginoso) son la fibronectina (con capacidad de asociarse con integrinas y de permitir el anclaje de los condrocitos a la MEC) y la laminina

(glucoproteína estructural de las membranas basales presente en la capsula pericelular de los condrocitos) [3, 26]. En el cartílago, además de las nombradas anteriormente, existen multitud de glucoproteínas específicas con importantes funciones. Algunos ejemplos son; la condronectina, similar a la fibronectina, una específicamente los condrocitos a la colágena tipo II [27]; las proteínas oligoméricas de matriz de cartílago (COMPs), de expresión mecanodependiente, interactúan con colágenas, agregano, fibronectina y otras moléculas como TGF- $\beta$  y BMP-2 durante el ensamblaje de la MEC [28, 29]; o la matrilina- 1, que interactúa con diversos componentes de la MEC como las COMPs, colágenas tipo II, IX, y XI y los proteoglucanos decorina, biglicano y agregano [26].

Para el estudio de los componentes de la sustancia fundamental pueden emplearse técnicas histoquímicas como la del ácido periódico de Schiff (PAS), (para la detección de glucoproteínas), el azul alcian (AA) (para la detección de proteoglucanos sulfatados ácidos), el azul de toluidina o la safranina-O (capaces de generar una reacción metacromática al aplicarse a tejidos con altas concentraciones de estos componentes). Por otro lado, para detectar la presencia de las moléculas concretas de la sustancia fundamental del cartílago son necesarias técnicas inmunohistoquímicas [23].

Como se ha descrito anteriormente, los diferentes componentes de la MEC no presentan una distribución completamente homogénea en el tejido cartilaginoso. Debido a la disposición espacial y apetencia diferencial por los colorantes de estas moléculas, es posible diferenciar tres zonas bien delimitadas dentro de la MEC de los tejidos cartilagosos; la matriz pericelular, la matriz territorial y la matriz interterritorial (Fig. 2 y 7). Los detalles de estas regiones serán especificados en secciones posteriores, pero cabe destacar los roles esenciales para la funcionalidad celular y tisular que desempeñan. De esta manera destaca la importancia de la matriz interterritorial a la hora de otorgar las propiedades biomecánicas de los cartílagos y, por otra parte, la protección estructural de los condrocitos y el tráfico de biomoléculas que desempeñan las matrices territoriales y pericelulares [30-32].



**Figura 7:** Corte histológico de tejido cartilaginoso hialino articular de conejo teñido con Safranina O. Puede apreciarse la distribución desigual de proteoglucanos entre la capsula pericelular (CP), la matriz interterritorial (MI) y la matriz territorial (MTe) que rodea a los grupos isogénicos axiales (GIA). Barra de escala: 50  $\mu$ m. Imagen original de la presente Tesis Doctoral.

Estas regiones no son las únicas implicadas en la funcionalidad de los cartílagos. Alrededor de los cartílagos hialinos y elásticos (exceptuando el articular) existe una vaina de tejido conjuntivo de crucial importancia para la nutrición de los condrocitos, el pericondrio.

### 1.3 Pericondrio y nutrición del tejido cartilaginoso

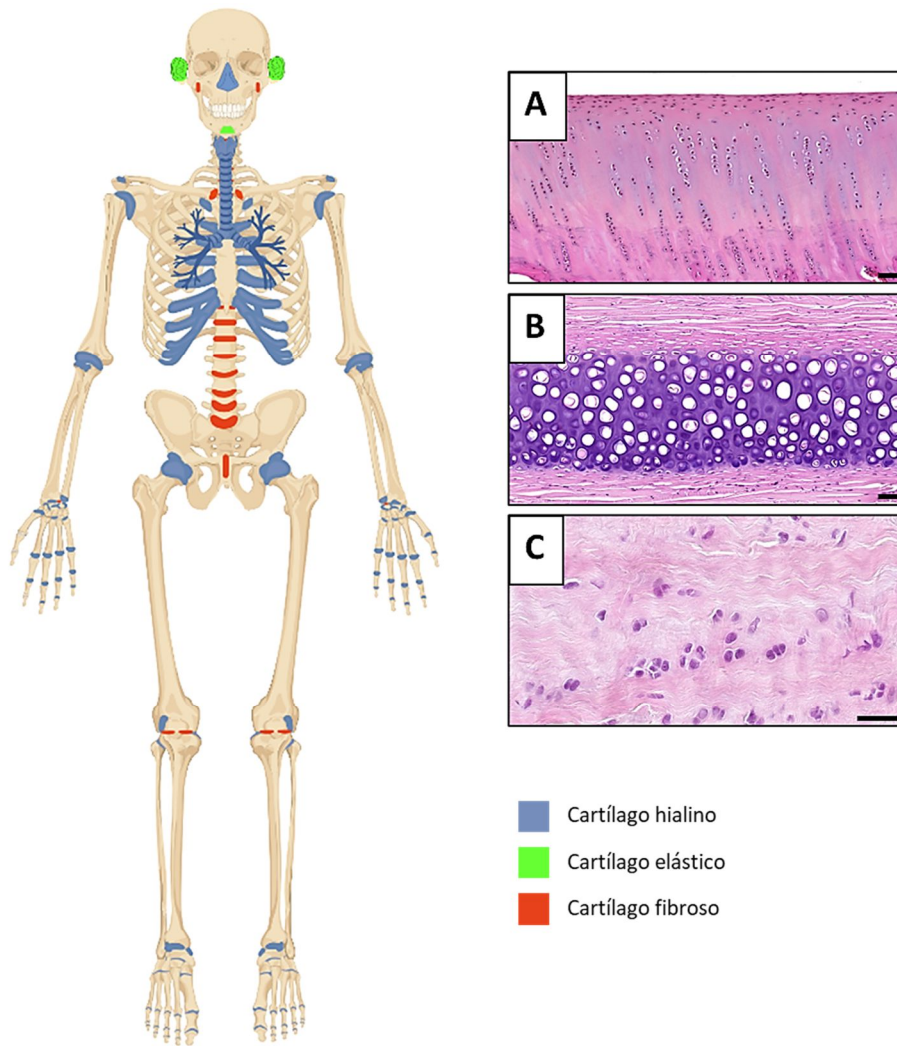
El tejido cartilaginoso es una variedad de tejido conectivo adulto especializado que no contiene vasos sanguíneos, lo que hace que, a diferencia de otros tejidos, su nutrición sea realizada por difusión. Según la variedad y localización del tejido cartilaginoso, esta difusión puede realizarse a través del pericondrio, del líquido sinovial o de los vasos sanguíneos de los tejidos conjuntivos adyacentes. Histológicamente, el pericondrio es un tejido conjuntivo denso e irregular compuesto por dos capas (Fig. 1). La más próxima al tejido cartilaginoso recibe la denominación de capa celular interna, ya que posee células madre mesenquimales que dan origen a nuevos condroblastos durante el crecimiento activo. La segunda capa, denominada capa fibrosa externa o capa nutricia, está

compuesta por fibroblastos, fibras de colágeno tipo I y capilares sanguíneos, desde los cuales se produce la difusión de nutrientes. El tejido hialino articular, la metáfisis (cartílago de crecimiento), y el tejido cartilaginoso fibroso carecen de pericondrio. En estos casos, la nutrición se realiza por difusión de moléculas desde el líquido sinovial de la capsula articular o desde tejidos adyacentes [3, 4, 6]. Para permitir dicha difusión, la porosidad y el grado de hidratación de la MEC son fundamentales [4, 6, 24]. Alteraciones en la composición u ordenación de la matriz (como las originadas por procesos patológicos o por la maduración y envejecimiento propios del cartílago) pueden dificultar dicha difusión. Por esta peculiar forma de nutrirse y para asegurar la supervivencia de los condrocitos más internos, los tejidos cartilagosos presentan espesor limitado [3, 4, 6]. De hecho, para preservar las características fenotípicas de los condrocitos y evitar la diferenciación y calcificación del cartílago, la homeostasis de ciertos metabolitos como el oxígeno es esencial [33-35].

#### **1.4 Variedades de tejido cartilaginoso**

En la especie humana, y dependiendo de la composición de la matriz extracelular, se distinguen tres variedades de tejido cartilaginoso: tejido cartilaginoso hialino, tejido cartilaginoso elástico y tejido cartilaginoso fibroso (Fig. 8). Cada variedad presenta una función, una localización y unas propiedades biomecánicas muy específicas.





**Figura 8:** Diagrama de la localización anatómica de los tejidos cartilagosos hialino (azul), elástico (verde) y fibroso (rojo). Creado con Biorender.com. En la parte derecha se muestran imágenes representativas de tejido cartilaginoso hialino (A) (modificado de Sánchez-Porras et al 2023) [23], elástico (B) y fibroso (C) teñidas con hematoxilina-eosina (imágenes originales de la presente Tesis Doctoral). Barra de escala: 50 µm.

### 1.4.1 Tejido cartilaginoso hialino

El término hialino deriva del griego “hyalos” (vidrio), en referencia a la coloración grisácea y semitransparente de dicho tejido en condiciones de normalidad [3]. Es el más abundante en nuestro organismo, tanto en el desarrollo fetal como en el adulto. En el feto constituye la mayor parte del esqueleto, que posteriormente será reemplazado por tejido óseo. En el adulto, dicho tejido se encuentra a nivel de vísceras y estructuras del aparato locomotor (Fig. 8). En concreto, este tejido se encuentra en los cartílagos de la nariz, en el esqueleto cartilaginoso de la porción conductora del aparato respiratorio (laringe, anillos traqueales y

bronquios), los cartílagos costales y los cartílagos articulares y de crecimiento [3].

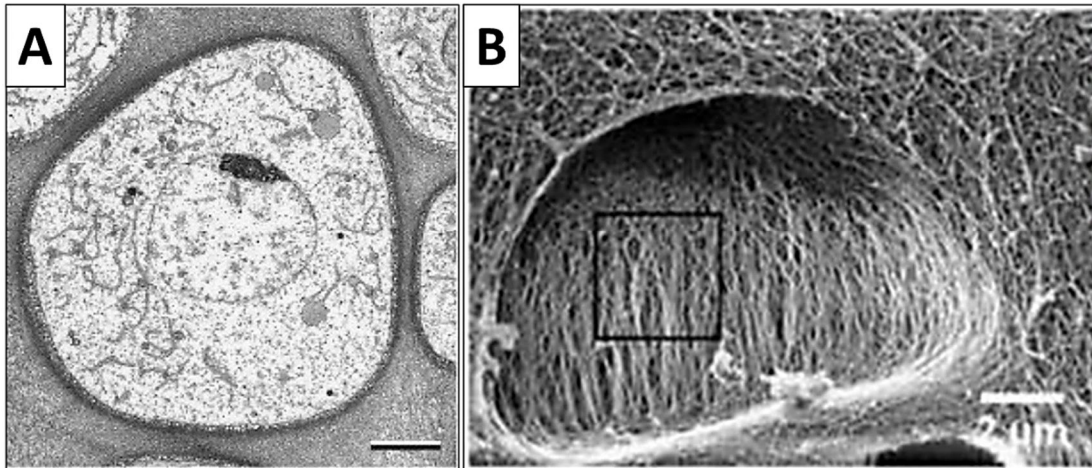
Histológicamente el tejido cartilaginoso hialino está constituido por condrocitos alojados en sus respectivas lagunas e inmersos en una MEC abundante. El principal componente del cartílago hialino es la fibra de colágeno tipo II, encontrándose distribuidas en una intrincada red a lo largo de toda la matriz del tejido. A pesar de ello, la matriz del tejido hialino se observa al microscopio óptico aparentemente homogénea, no siendo posible distinguir el componente fibrilar con técnicas histoquímicas rutinarias. Esto es debido al pequeño diámetro de estas fibras (menor a las fibras de colágeno tipo I o a las fibras elásticas) sumado a la abundante proporción de proteoglucanos que enmascaran su presencia [4, 36]. Otras moléculas de colágeno como los tipos VI, IX y XI se encuentran en menor cantidad [3, 37].

En la matriz cartilaginosa hialina se distinguen con facilidad las tres áreas mencionadas previamente, como son la matriz pericelular o cápsula, la matriz territorial y la matriz interterritorial. Estas áreas poseen una composición y función específica, y una afinidad particular por ciertos colorantes, especialmente los básicos.

- **Matriz o capsula pericelular:** corresponde a una región intensamente basófila, de entre 2 y 4  $\mu\text{m}$  de espesor, situada alrededor de los condrocitos (Fig. 7 y 9). Su composición, aunque con ciertas peculiaridades, se asemeja al de la lámina basal presente en diversos tejidos y células, como las células de Schwann de los nervios periféricos, los adipocitos, las fibras musculares o la matriz pericelular alrededor de las células madre de la gelatina de Wharton [38-41]. De esta manera podemos encontrar moléculas diversas, como fibras colágenas (III, IV, VI, y IX), glucoproteínas (laminina, nidogenina, fibronectina y condronectina) y proteoglucanos (heparán-sulfato, decorina y biglicano) [30-32, 42-45]. En este nivel también cabe destacar la presencia de monómeros de agregano y la formación de complejos ácido hialurónico-agregano. La capsula pericelular es una estructura fundamental para el correcto funcionamiento del condrocito al desempeñar funciones



relacionadas con la transducción de señales mecánicas y de factores de crecimiento, habiendo sido demostrada la relación entre su alteración y el desarrollo de diversos procesos patológicos [30-32, 42, 45].



**Figura 9:** (A) Imagen de un condrocito perteneciente a un grupo isogénico por microscopía electrónica de transmisión. Nótese la presencia de la capsula pericelular rodeando al condrocito. Barra de escala: 6  $\mu\text{m}$ . Modificado de Hunziker E. B. et al 2014 [46]. (B) Imagen de la capsula pericelular de un condrocito por microscopía electrónica de barrido. Barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ . Modificado de Wilusz R. et al 2014 [31].

- **Matriz territorial:** se ubica alrededor de la matriz pericelular, rodeando los grupos isogénicos (Fig. 7). Esta región, de unos 50  $\mu\text{m}$  de espesor, se tiñe histológicamente con una intensidad menor que la capsula pericelular. Destaca por la presencia de fibras de colágena tipo II y tipo IX. Además, presenta un alto contenido en proteoglucanos sulfatados, razón que explica el carácter basófilo y metacromático de esta región. Dentro de ellos, el condroitin sulfato es el más abundante, siendo posible identificar el complejo ácido hialurónico-agrecano. La función principal de la matriz territorial es la de proteger a los condrocitos del estrés mecánico. Además, su alto contenido en proteoglucanos asegura la difusión de nutrientes a las células [24].
- **Matriz interterritorial:** constituye el resto de la matriz y se dispone entre los grupos isogénicos (Fig. 7). Es particularmente evidente en el cartílago de tipo hialino, tiñéndose con menor intensidad, a veces con un cierto carácter acidófilo, que los otros elementos de la MEC. Asimismo, se identifica el complejo ácido hialurónico-agrecano y el GAG queratán sulfato es el más

abundante. La presencia de colágena tipo II es muy significativa, ya que esta región es la responsable de otorgar las principales propiedades mecánicas del cartílago al ser la de mayor superficie [4, 6].

Tras describir las principales características histológicas del cartílago hialino, a continuación, se describen las principales características del cartílago hialino articular, de especial interés en la presente Tesis Doctoral.

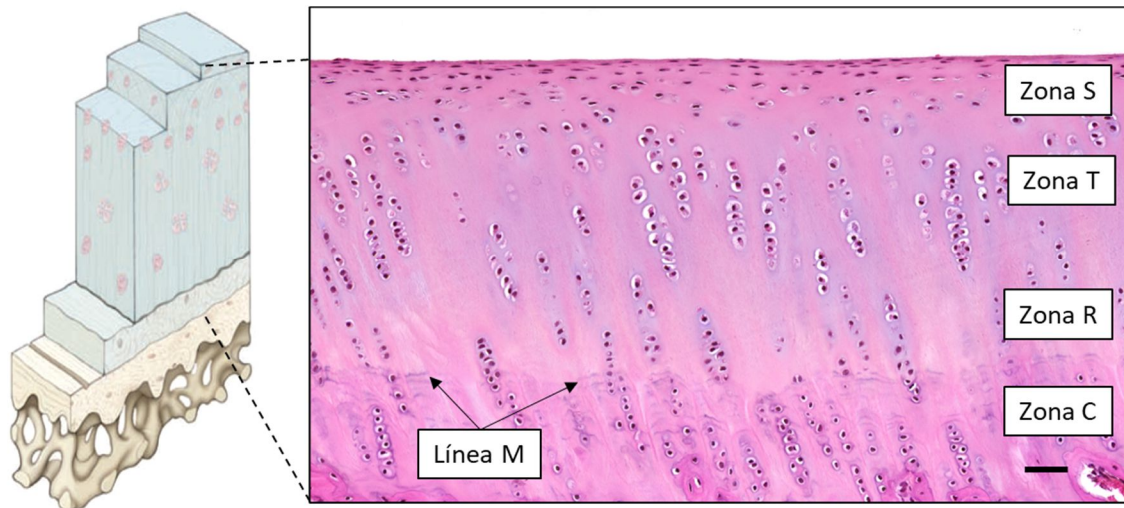
- **Cartílago hialino articular:**

Encargado de permitir el deslizamiento y la distribución de cargas, el cartílago hialino articular está presente en las superficies articulares sinoviales [4, 6]. Con un espesor de 2 a 4 mm (debido a limitaciones en la difusión de nutrientes), la composición de su MEC es fundamental para el desempeño de sus funciones [5, 24, 47, 48]. Su principal componente es el agua (65-80% del peso total), seguido por los colágenos y proteoglicanos (60% y 30% de peso seco respectivamente), destacando el colágeno de tipo II y el agregano [24]. El agua alojada en la MEC, de la cual el 30% se encuentra en el espacio entre las fibras y el resto asociado principalmente al agregano, es capaz de desplazarse por la matriz ante esfuerzos de carga cíclicos, permitiendo a la MEC actuar como amortiguador de la presión y distribuidor de cargas [49-51].

Presenta escasa densidad de condrocitos en comparación a otros tejidos cartilaginosos. Además, la falta de vasos genera una baja presión de oxígeno en las zonas profundas del tejido y un metabolismo celular anaerobio que disminuye durante el envejecimiento [3-6, 25]. Estas características, sumadas al constante estrés mecánico al que está sometido, convierten este tejido en susceptible a diferentes patologías de complicado pronóstico.

Histológicamente, el tejido articular presenta claras variaciones tanto en la distribución y comportamiento celular como en los componentes y orientación de la MEC. En este sentido, existen cuatro zonas claramente diferenciadas dentro de los tejidos cartilaginosos articulares (Fig. 10).

- **Zona superficial o tangencial:** De delgado espesor (10-20% del volumen) es la principal responsable de las propiedades mecánicas del cartílago en términos de resistencia a la tensión, tracción y compresión. Posee una alta densidad de pequeños condrocitos aplanados y fibras colágenas (tipo II y IX) paralelas a la superficie (formando la denominada lamina splendens) [24, 52]. Su contenido en proteoglicanos es reducido, pero destaca la lubricina, crucial para mantener una adecuada lubricación y evitar la adhesión proteica y celular al cartílago [53]. Al estar en contacto con el líquido sinovial, esta capa es de vital importancia en la nutrición del tejido.
- **Zona de transición:** Con un 40-60 % del volumen, esta región es la primera línea de distribución de cargas. En su MEC, rica en proteoglicanos, encontramos escasos condrocitos distribuidos aleatoriamente entre fibras de colágeno oblicuas a la superficie [24].
- **Zona radial o profunda:** Representa alrededor del 30% del volumen del tejido y es responsable de transmitir las fuerzas de compresión hacia capas inferiores. En esta región, los condrocitos adoptan una disposición columnar, encontrando, fibras de colágena tipo II paralelas a las células y perpendiculares a la superficie articular, alto contenido en proteoglicanos y una baja hidratación [24, 48].
- **Zona de calcificación:** Una región visible, denominada línea de marea, establece el límite superior de esta región (Fig. 10). En la zona de calcificación, escasos condrocitos con bajo metabolismo y fenotipo hipertrófico se encuentran inmersos en una matriz calcificada, siendo los únicos que expresan colágena tipo X. Esta región es responsable de amortiguar y proporcionar integridad estructural a la vez que supone una transición al hueso esponjoso subcondral [48].



**Figura 10:** Capas del tejido hialino articular. Diagrama representativo (izquierda) e imagen histológica de un cartílago articular de conejo mediante hematoxilina-eosina. Zona S: Zona superficial o tangencial; Zona I: Zona de transición; Zona R: zona radial o profunda; Zona C: Zona de calcificación; Línea M; Línea de marea. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . Diagrama modificado de Ross [3]. Imagen histológica original de la presente Tesis Doctoral.

#### 1.4.2 Tejido cartilaginoso elástico

El tejido cartilaginoso elástico forma los cartílagos del pabellón auricular y de los conductos auditivos externos, el esqueleto de la trompa de Eustaquio, la epiglotis y los de algunos cartílagos de la laringe (Fig. 8). Esta variedad de tejido cartilaginoso está siempre rodeada de pericondrio, e histológicamente es similar al cartílago hialino con pericondrio. Una de sus principales características es la presencia de abundantes fibras elásticas. Además, es un tejido muy celular con abundantes condrocitos muy próximos entre sí, generando una menor proporción de matriz interterritorial que en otros cartílagos. Los condrocitos presentan una morfología redonda u ovoide, con mayor citoplasma y un aspecto vacuolado debido a la presencia de inclusiones lipídicas y/o glucógeno. Además, no suelen formar grupos isogénicos grandes, o no son tan evidentes, y se encuentran rodeados de las áreas territoriales e interterritoriales que contienen colágena tipo II, la cual interacciona con los proteoglucanos y las fibras elásticas. Cabe destacar que, a diferencia del tejido cartilaginoso hialino, este tejido no se calcifica con la edad, pero sí pierde elasticidad. [3, 4, 6, 54].

La matriz se caracteriza, fundamentalmente, por la presencia de abundantes fibras elásticas ramificadas e intercaladas con haces de fibras de colágena tipo II. Las fibras elásticas se disponen configurando laminas elásticas alrededor de los condroceles, encontrando además algunas fibras que se proyectan entre los grupos isogénicos. La interacción de estos componentes confiere flexibilidad al tejido y su presencia es responsable de la coloración amarillenta del cartílago elástico cuando se observa macroscópicamente [4].

### **1.4.3 Tejido cartilaginoso fibroso**

También denominado fibrocartílago, es un tejido que se localiza a nivel de los discos intervertebrales, la sínfisis púbica, los meniscos de la rodilla, algunas inserciones osteotendinosas como el tendón de Aquiles y en la articulación esternoclavicular, temporomandibular y el complejo triangular de la muñeca (Fig. 8). Desde el punto de vista histológico presenta características similares al tejido conjuntivo denso. En esta variedad de tejido cartilaginoso, los condrocitos poseen un tamaño homogéneo y cada uno está rodeado por una matriz pericelular. Además, una de las principales características es que estas células se organizan formando grupos isogénicos axiales entre los cuales transcurren abundantes bandas de fibras colágenas. También se identifican en esta variedad fibroblastos, que al igual que los condrocitos contribuyen a elaborar y modular la MEC [3, 4, 6]. La MEC está compuesta principalmente por fibras colágenas de tipo I, razón por la cual estos tejidos reciben la denominación de fibrosos. Además, es posible encontrar una reducida cantidad de fibras colágenas tipo II, escasos proteoglucanos y agua. La disposición espacial de estos componentes, en especial de las fibras colágenas tipo I, otorgan gran resistencia a las fuerzas de tensión en estos tejidos. A diferencia de las otras variedades de tejido cartilaginoso, no presenta pericondrio y su nutrición depende de los vasos presentes en los tejidos conjuntivos adyacentes [4, 6, 36].

## 1.5 Histogénesis, crecimiento y reparación del tejido cartilaginoso

Durante la fase embrionaria y fetal, se produce una aglomeración de células mesenquimatosas, conocido como nódulo condrogénico, que, tras los estímulos necesarios, sufrirá procesos de diferenciación hacia células condroprogenitoras. Esta fase, denominada condrogénesis, está orquestada por multitud de variables. La presencia y concentración de metabolitos como el oxígeno y de la expresión de determinados factores de transcripción y genes (como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los productos de la familia de genes Hox, el factor de transcripción SOX-9 (estimulador de la colágena tipo II) o la vía de señalización Hedgehog entre otras) regulan su desarrollo. Además, durante el proceso de condrogénesis, la disposición de la compleja estructura tridimensional en desarrollo es esencial para permitir las interacciones célula-célula y célula-MEC [5, 55-57].

Durante su desarrollo, el tejido cartilaginoso presenta dos tipos de crecimiento, el crecimiento intersticial y el aposicional. El intersticial, característico de cartílagos jóvenes, resulta de la división mitótica de los condroblastos y condrocitos existentes en la matriz cartilaginosa. En cambio, el aposicional resulta de la diferenciación de las células del pericondrio hacia la línea condrogénica. Durante este proceso, aumenta el número de células sintéticamente activas incrementando las dimensiones del tejido. A la vez, según su orientación los nuevos condrocitos formaran grupos isogénicos axiales o coronarios, como ya se ha descrito en secciones anteriores [3, 6, 36]. Todo este proceso está regulado por factores nutricionales y hormonales. Las hormonas tiroxina, testosterona y hormona del crecimiento estimulan la proliferación de los condrocitos, así como la síntesis de la matriz, mientras que la cortisona, la hidrocortisona y el estradiol pueden influir negativamente en el crecimiento del tejido cartilaginoso. La edad también es un factor limitante, especialmente en el caso del crecimiento intersticial [4, 58].

Por último, es importante destacar que la capacidad de regeneración del tejido cartilaginoso en la vida adulta es bastante limitada debido a la baja proliferación

y escasez de elementos tróficos. En pequeñas lesiones, los mecanismos de crecimiento mencionados anteriormente pueden regenerar el tejido. Sin embargo, en multitud de patologías, las lesiones son sustituidas por tejido conectivo denso o incluso fibrocartílago, tejidos que no poseen las propiedades estructurales y biológicas necesarias para el normal funcionamiento de los cartílagos hialinos reparados [59-61]. En el siguiente apartado se profundizará en las patologías cartilagosas y las estrategias de regeneración actuales.

## **2. Patologías del tejido cartilaginoso hialino**

En la presente Tesis Doctoral se abordan nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de lesiones estructurales que afectan al tejido cartilaginoso hialino. Por esta razón, esta sección se centra en las patologías que afectan de manera particular a esta variedad de tejido cartilaginoso.

Patologías de diversa índole pueden afectar a los tejidos cartilagosos. Existen anomalías de origen congénito, infeccioso o neoplásico, además de las causadas por procesos degenerativos, autoinmunes o por accidentes traumáticos (siendo estas tres últimas las más prevalentes en las afecciones del cartílago articular) [62]. La capacidad de regeneración de los tejidos cartilagosos está críticamente limitada por sus singulares características previamente indicadas. Cabe añadir que los escasos procesos regenerativos endógenos del cartílago articular suelen desencadenar la formación de una cicatriz de tejido fibroso [59-61].

Las estrategias de reparación actuales de estos tejidos difieren según su variedad y localización. Por ejemplo, la tráquea es susceptible de sufrir estenosis, procesos neoplásicos, osificación y/o fibrosis del cartílago hialino. En estas situaciones, se opta por una estrategia quirúrgica para remover el tejido afectado y posteriormente anastomosar los extremos cartilagosos remanentes [63]. Sin embargo, cuando los defectos abarcan ciertas dimensiones puede ser necesario el empleo de injertos de cartílago intercostal, lo cual se asocia a una serie de riesgos que aumentan en lesiones mayores de 4 cm [63]. El empleo de injertos o colgajos de cartílago intercostal también es una opción común para la reparación de cartílago del septum nasal o en la reconstrucción del cartílago elástico del pabellón auricular en casos de microtia [64-66].

No obstante, las enfermedades cartilagosas más comunes en la sociedad son aquellas que afectan al cartílago articular. Debido a su localización y función, las superficies articulares son propensas al desgaste o a sufrir traumatismos, originando pérdida de tejido cartilaginoso y exposición del hueso subcondral con



el consiguiente dolor, rigidez y pérdida de movilidad [49]. En el grupo de las enfermedades degenerativas del cartílago articular destaca la osteoartritis, el tipo de artrosis más común. En España, todas sus formas presentan un 29,35% de prevalencia y en concreto, la osteoartritis de rodilla un 13,83% [62]. El origen de esta patología no ha sido completamente esclarecido, estando involucrados factores como edad, género, peso, nivel de actividad y factores hereditarios [62, 67, 68]. La osteoartritis consiste en la degeneración progresiva de la MEC del tejido cartilaginosa presente en las articulaciones móviles. Se inicia con cambios fenotípicos y moleculares en los condrocitos articulares, ocasionando la senescencia de los condrocitos, la activación de vías proinflamatorias, la degradación de la MEC, el remodelado óseo y la pérdida de funcionalidad articular [62, 68].

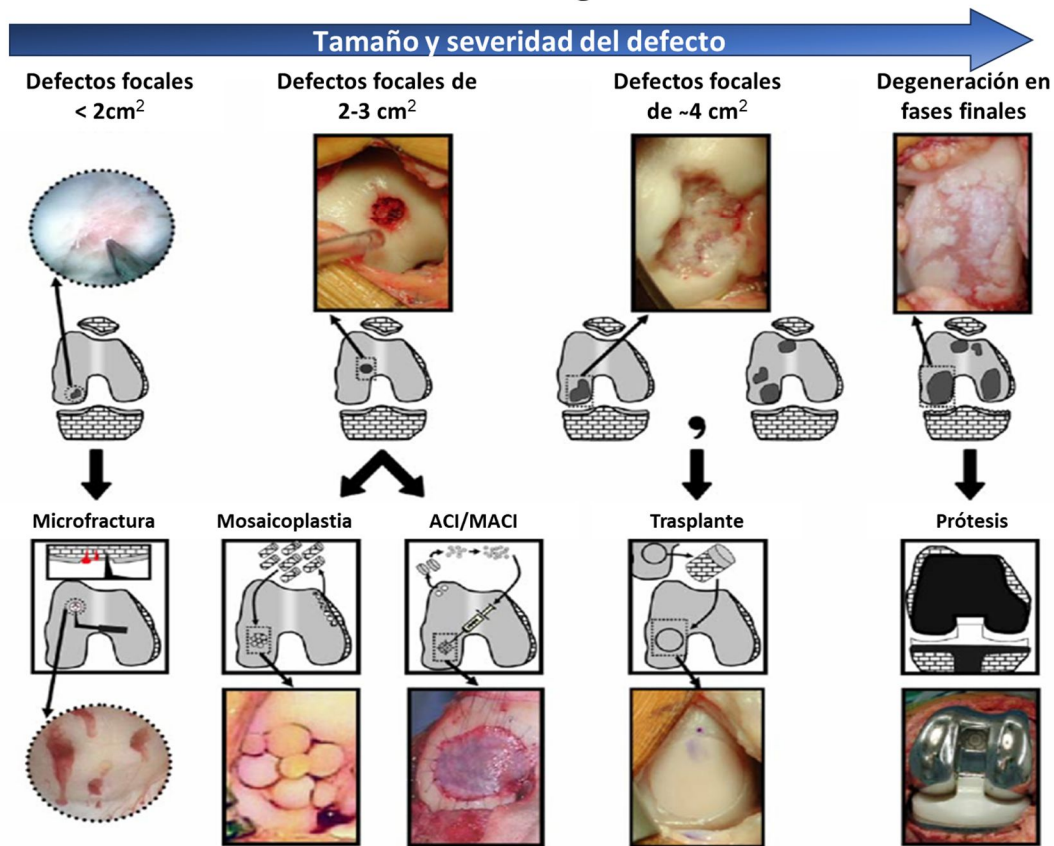
En la actualidad, existen distintas estrategias para el tratamiento de las patologías del cartílago articular según la tipología, grado de severidad y estado del paciente (Fig. 11). También encontramos diferentes clasificaciones atendiendo al grado de la lesión y a la metodología de diagnóstico empleada, pero la más aplicada es la clasificación Outerbridge [69]. En esta clasificación existen 4 grados de severidad. En el grado 1 el paciente presenta inflamación y reblandecimiento del cartílago articular. En el 2 existen además fisuras menores a 0,5 mm en la superficie del cartílago. En el grado 3 el paciente experimenta procesos añadidos de úlceras y defectos condrales mayores de 0,5 mm. Por último, en el grado 4, hay una ausencia de cartílago articular y el hueso subcondral subyacente está expuesto [69].

Cuando la sintomatología de las lesiones no es severa, se opta por una estrategia condroprotectora conservadora (reposo, analgésicos, inyecciones de corticosteroides, ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas, etc.) o quirúrgica. Si estas estrategias no funcionan, surgen las vías de condroreparación. Estas suelen incluir un paso de estimulación del hueso subcondral mediante abrasión o microfractura. Este método, aunque permite cierto rellenado de la lesión al estimular las células madre mesenquimales presentes en la medula ósea, suele derivar en procesos de generación de fibrocartílago en el que los condrocitos expresan marcadores de hipertrofia como RunX y las fibras colágenas de tipo X

[5, 19, 59, 70]. Cabe destacar que el cartílago fibroso no cumple los requisitos mecánicos necesarios para la funcionalidad de la articulación a largo plazo debido a las diferencias composicionales y arquitectónicas con el hialino articular [59-61]. Además, el daño en el cartílago estimula la expresión de citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas que promueven la degeneración de la MEC [71, 72].

En este sentido surgieron las estrategias de condroregeneración. El primer grupo de metodologías aplicadas consiste en el trasplante autólogo o heterólogo osteocondral (mosaicoplastia). Mediante esta técnica, cilindros de tejido osteocondral del mismo paciente (de una zona de baja carga) o de cadáver son empleados para rellenar, a modo de mosaico, la zona de la lesión del paciente. Esta técnica presenta limitaciones en el área (solo indicado para lesiones menores a 4 cm<sup>2</sup>), en la escasez de material donante, pérdida de funcionalidad de la zona donante, rechazo inmunológico, generación de fibrocartílago, fracturas óseas o riesgo de infecciones [73, 74]. La siguiente generación de tratamientos consiste en la implantación de condrocitos autólogos (ACI). Este tratamiento está dividido en dos pasos, la obtención de una biopsia del paciente para la extracción de condrocitos y su posterior implantación tras ser expandidos *in vitro*. Esta técnica va asociada al empleo de una membrana para asegurar la implantación en la zona de la lesión, encontrando una primera fase asistida por una membrana de periostio autóloga y una segunda fase más desarrollada en la que se emplea una membrana de colágeno tipo I (MACI). Esta técnica está contraindicada en lesiones de más del 50 % de la superficie articular y presenta pobres resultados a largo plazo [49, 75, 76]. En última instancia, cuando las lesiones son de elevada severidad se procede a la extirpación del cóndilo articular y su reemplazo por una prótesis de titanio, con la consiguiente pérdida de movilidad, función y calidad de vida en el paciente [77, 78].

## Paradigma actual en el tratamiento de lesiones del cartílago articular



**Figura 11.** Paradigma actual en el tratamiento quirúrgico de las lesiones de cartílago. Modificado de Williams et al 2010 [78].

Los resultados de las técnicas quirúrgicas y las metodologías actuales ponen en relieve la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que solventen los problemas y mejoren los resultados de las vigentes. Para este propósito, la Ingeniería Tisular (IT) surge como una herramienta de gran utilidad.

En la presente Tesis Doctoral, se describen estrategias basadas en los principios de la IT para la generación de nuevos sustitutos artificiales con posible aplicación futura en el tratamiento de patologías hialinas y articulares. Además, los resultados obtenidos con diversas fuentes celulares ponen de manifiesto la potencial aplicación de las metodologías realizadas en el presente proyecto de Tesis en la generación de sustitutos artificiales de otros tejidos como el nervio periférico.

### 3. Ingeniería Tisular

#### 3.1. Origen y evolución de la Ingeniería Tisular

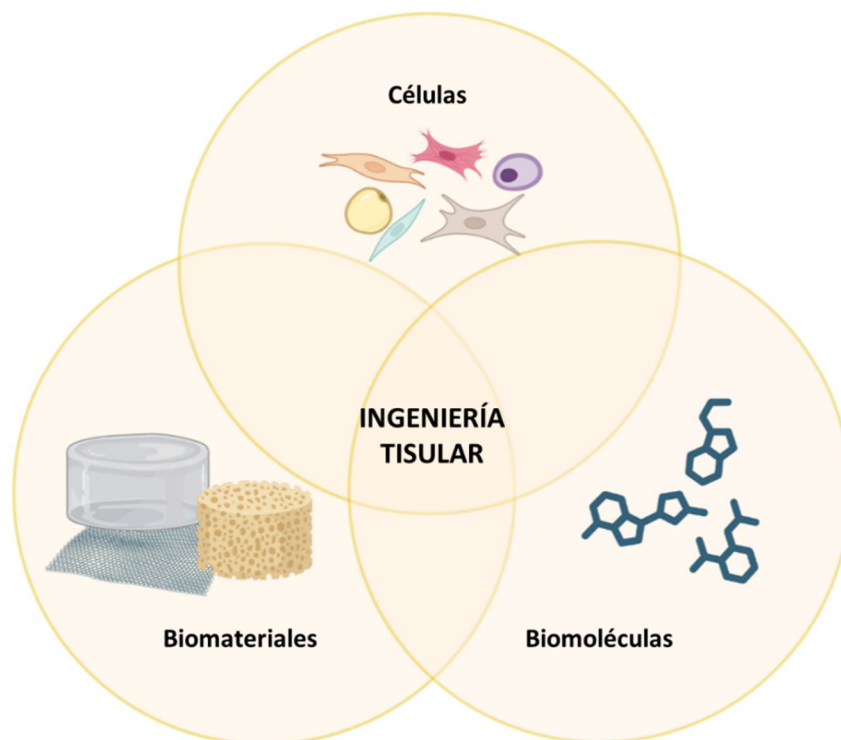
La Ingeniería Tisular (IT) es un campo multidisciplinar que combina principios de las áreas de medicina, biología e ingeniería para la generación de nuevos sustitutos tisulares de uso clínico [1]. La IT ha experimentado una evolución técnica y de aplicación exponencial en el tiempo. El germen de la IT surgió durante los años 70 con los primeros experimentos relacionados con la generación de cartílago y piel. Sin embargo, no fue hasta 1985 cuando el término “*Tissue Engineering*” fue empleado por primera vez por el Dr. Fung de la Universidad de San Diego, California (en un evento de escasa relación con el concepto de IT que conocemos hoy en día) y hasta 1987 cuando fue adoptado oficialmente por la comunidad científica. La aplicación del término tuvo escasa repercusión hasta el año 1993, cuando los autores Langer y Vacanti publicaron el artículo titulado “*Tissue Engineering*” en la revista *Science* [1]. Dicho trabajo supuso un punto de inflexión dentro de la IT, provocando la generalización del término y la globalización de la disciplina [79]. En España, el Prof. Dr. Antonio Campos Muñoz introdujo el término IT durante su discurso en la Real Academia Nacional de Medicina (2004) definiéndola como “*La construcción de tejidos biológicos artificiales y su utilización médica, para restaurar, sustituir o incrementar las actividades funcionales de los propios tejidos orgánicos*” [2].

Numerosos logros han sido alcanzados durante los más de 30 años de historia de la IT a la hora de reparar o regenerar tejidos perdidos o no funcionales, como atestiguan los diferentes medicamentos que han sido trasladados a la clínica [80-83]. No solo es de destacar la restauración de un tejido, también hay que poner en relieve que la IT es capaz de actuar como paliativo y mejorar la calidad de vida de los pacientes o servir de herramienta o sustituto cuando no es posible encontrar tejidos u órganos donantes [83]. Debido a su creciente desarrollo y a su translación clínica, los sustitutos generados por IT son considerados como medicamentos de terapias avanzadas y han sido aprobados por diversas agencias nacionales, como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), e internacionales, como la *Food and Drugs Administration*

(FDA) de Estados Unidos o la *European Medicines Agency* (EMA). Estas agencias avalan la seguridad y calidad de los productos de terapias avanzadas (entre los que se incluyen los de IT, terapias génicas y terapias celulares) mediante exhaustivas directrices de fabricación y controles de calidad (Reglamento 1394/2007) (Directiva 2009/120/CE) (Directiva 2003/63/CE) (Directiva 2015/565) [84, 85].

### 3.2. Elementos básicos de la Ingeniería Tisular

Como el concepto de IT está fundamentado en recrear tejidos artificiales que puedan ser aplicados cuando sea necesario, la IT se basa en el empleo y combinación de los elementos básicos de un tejido (Fig. 12), es decir, células, matrices y biomoléculas [2, 80]. Las diferentes alternativas que ofrecen cada uno de los pilares fundamentales de la IT, así como la variedad en su combinación, permiten que la disciplina siga en constante desarrollo.



**Figura 12:** Pilares fundamentales de la Ingeniería Tisular. Creado con Biorender.com.

### 3.2.1. Células

Las células son la unidad fundamental sobre la que se cimenta la vida. Todos los seres vivos están formados por células, siendo esta la unidad estructural y fisiológica de la vida. A su vez, los tejidos se encuentran formados por células y por la matriz que generan [86, 87]. Sin embargo, al igual que no todos los tejidos son iguales, también existen claras diferencias metabólicas, funcionales, genotípicas y fenotípicas entre las células dependiendo de su origen y de su estado euplástico, proplástico o retroplástico [88]. De esta manera es fundamental para la IT comprender las características y el comportamiento celular en condiciones normales y patológicas para adecuar la mejor fuente celular en cada protocolo concreto.

En el caso específico del cartílago hialino, las estrategias de IT pasan por el empleo de una fuente celular que sea capaz de sintetizar y reproducir los componentes principales de los tejidos cartilaginosos. Por esta razón, la célula más ampliamente empleada en protocolos de IT de cartílago son los condrocitos [49, 50, 75, 89-91]. Estas células pueden ser aisladas mediante protocolos sencillos, ya sean enzimáticos (mediante colagenasas) o por la técnica de explantes, permitiendo así obtener una población celular aislada de condrocitos del propio paciente o de un donante [92]. A pesar de poseer teóricamente las características idóneas, el cultivo de estas células puede estar asociado a ciertos inconvenientes. Debido al reducido metabolismo que muestran estas células en los tejidos adultos, su tasa de proliferación celular *in vitro* puede ser limitado [24, 73, 93]. Además, sumado a los estudios que demuestran que la mejora de las propiedades de los sustitutos artificiales de cartílago está íntimamente relacionada con el empleo de grandes concentraciones celulares, pueden existir limitaciones en la aplicabilidad de estas células [49]. Por otro lado, cabe destacar que, especialmente en el caso de lesiones degenerativas como la osteoartritis, el estado patológico del paciente está asociado a cambios metabólicos a nivel celular que disminuyen drásticamente la viabilidad y capacidad de proliferación de los condrocitos en cultivo. En estos casos, el empleo de células autólogas del tejido dañado conlleva varias dificultades añadidas [24, 94]. Para paliar estos inconvenientes de proliferación, se opta por el empleo de medios de cultivo que

promuevan la expansión celular, pero estos suelen llevar asociados procesos de desdiferenciación celular y pérdida de propiedades fenotípicas y funcionales [95-97]. Siguiendo con las alternativas autólogas, es común el empleo de otras fuentes alternativas de las que obtener la población celular hialina, como el cartílago intercostal o el nasal, aunque su extracción puede acarrear ciertos riesgos asociados [65].

En la actualidad, la búsqueda de nuevas alternativas celulares es un campo de gran actividad dentro de la IT. Debido a que la formación de fibrocartílago es el proceso de reparación endógeno y sus características no son adecuadas para una óptima regeneración del cartílago articular, su empleo en protocolos de IT queda en parte descartado [59-61, 98]. Sin embargo, existe una fuente celular alternativa al cartílago hialino y al fibroso. Este es el caso del cartílago elástico, que presenta características ideales para su estudio en protocolos de IT aplicados a lesiones de cartílago articular. De obtención sencilla y mínimamente invasiva, los condrocitos elásticos demuestran tasas de proliferación en cultivo superiores a los condrocitos hialinos, además de una elevada síntesis de componentes de la MEC [99], incluso tras su encapsulación en biomateriales naturales [92]. Además, la aplicación de estas células ha demostrado resultados prometedores en la reparación de cartílago hialino nasal [100].

Cabe destacar el empleo de otras fuentes celulares como las células madre mesenquimales multipotentes. Estas células ofrecen diversas ventajas frente a otras estirpes celulares diferenciadas. Presentes en diversos tejidos, pueden ser aisladas y expandidas *in vitro* con facilidad, manteniendo la capacidad de diferenciación celular hacia diversas estirpes celulares, como condrocitos, osteocitos o células neurales, además de presentar bajos niveles de inmunogenicidad [101-103]. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea parecen ser las que demuestran mayor capacidad de diferenciación hacia cartílago [104]. Sin embargo, su extracción presenta ciertos riesgos en comparación con otras fuentes mesenquimales [105, 106]. Por otra parte, las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo presentan la ventaja de una fácil obtención y una mayor cantidad celular que las derivadas de médula ósea [107, 108], aunque experimentos previos sugieren una menor capacidad

condrogénica en comparación con otras mesenquimales [106, 109, 110]. En los últimos tiempos, una fuente mesenquimal diferente, el cordón umbilical, ha captado la atención de multitud de investigadores. De fácil obtención, el cordón umbilical es una fuente de células madre de grandes proporciones. Además, debido a su origen embrionario, las células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton (WJSC) presentan una capacidad de diferenciación más amplia que otras mesenquimales, por lo que han sido aplicadas para la generación de multitud de tejidos con prometedores resultados [111-114], incluyendo la generación de microtejidos [115].

Por último, cabe mencionar que existen otras fuentes celulares con grandes índices de proliferación y/o mayor capacidad de diferenciación, como las líneas celulares, las células madre embrionarias o las células madre pluripotentes inducidas. Aunque su estudio es interesante, hay que tener en cuenta los problemas éticos y los riesgos que plantea su utilización. Por este motivo, y debido al claro carácter traslacional de la IT, su uso está muy limitado por las agencias de calidad [116] y fueron descartadas para ser abordadas en la presente Tesis Doctoral.

### **3.2.2. Biomateriales**

Los biomateriales deben proveer del correcto entorno tridimensional para el soporte de las células, sirviendo de portadores para las mismas y permitiendo su correcta proliferación y estadio de diferenciación. Por otro lado, un biomaterial ideal debe ser biocompatible y biodegradable para asegurar la colonización celular una vez implantado y su integración con la matriz generada durante la regeneración. Además, las características biomecánicas y la composición de los biomateriales deben asemejarse a los tejidos humanos, siendo este un punto crucial para la regeneración del cartílago [117-119].

Según la naturaleza de los biomateriales estos pueden clasificarse en sintéticos, naturales o mixtos [120, 121]. Los materiales sintéticos (como los cerámicos, metálicos o los polímeros sintéticos) presentan elevadas características físicas y mecánicas, pero sus propiedades biológicas y biocompatibles suelen estar



bastante limitadas. La mayoría de estos compuestos no son degradables (o muy a largo plazo) por lo que las células del organismo no son capaces de reabsorberlos. Este hecho deriva frecuentemente en una reacción fibrosa alrededor del implante y la consiguiente incapacidad de remodelar los elementos de la matriz específica del tejido [122].

En el apartado de los biomateriales naturales, los de mayor empleo en la IT, encontramos de distinta naturaleza. En este grupo, con el mayor grado de biocompatibilidad, se encuentran los biomateriales de origen humano o animal, como la fibrina, el ácido hialurónico, el colágeno, la gelatina, el quitosano, etc. También existen los derivados de plantas, como la agarosa o el alginato [91, 117, 120, 121, 123, 124]. Por último, aparecen los de naturaleza polimérica, como el ácido poliláctico (PLA), que presentan el aliciente de poder ser empleados en protocolos de impresión en tres dimensiones (3D), permitiendo reproducir estructuras de alta resolución y arquitectura controladas [125, 126].

Multitud de estos biomateriales: alginato [119, 127], agarosa [117, 128], colágeno [129-132], fibrina [133-136], gelatina [137], ácido hialurónico [138, 139], matrices óseas [140], PLA, PCL [141, 142], etc. han sido evaluados pero aún no existe un consenso en el biomaterial ideal en términos de disponibilidad, facilidad de uso y éxito de los resultados dentro de la IT de cartílago [91]. Sin embargo, los hidrogeles destacan por presentar los mejores resultados [91]. Estos cumplen los requisitos de biocompatibilidad, absorción y contenido hídrico idóneos para la proliferación y función celular [143]. A pesar de las posibles ventajas que pueden conllevar estos biomateriales, hay que tener en cuenta posibles inconvenientes que acarrear. En el apartado de la IT de cartílago, aunque estas matrices puedan asemejar ciertas características arquitectónicas de algunos tejidos cartilaginosos, los resultados obtenidos no han sido todo lo óptimos posibles [91]. La razón del fracaso de estas terapias puede encontrarse en que las estrategias actuales emplean hidrogeles de baja similitud a la matriz cartilaginosa o que incluso pueden provocar cambios en las características de los condrocitos. En concreto, la mayoría están basados en la polimerización de moléculas de colágena tipo I, lo cual puede desencadenar la diferenciación de las células hacia fibrocondrocitos [144]. Estas razones resaltan la importancia

del desarrollo de nuevas tecnologías que permitan generar estructuras tridimensionales y biomiméticas que contengan los componentes de la MEC nativa.

### **3.2.3. Factores de inducción**

El tercer pilar básico para la generación de un tejido artificial es el empleo de biomoléculas o factores de crecimiento. Estas sustancias, que pueden tener una naturaleza química y molecular muy diversa (proteínas, hormonas, citoquinas, etc.) van a influir de manera determinante en el comportamiento celular. Mediante su unión con receptores de membrana, los factores de crecimiento provocan la activación de diferentes vías de señalización, pudiendo inducir la migración, mitosis, diferenciación o mantenimiento del fenotipo, la apoptosis o la síntesis de componentes de MEC [145].

Estos factores de crecimiento suelen ser añadidos como elementos solubles en el medio de cultivo, pudiendo alternar su composición al realizar el cambio de medio en tiempos concretos. Otra opción, es incorporar los factores de crecimiento de manera gradual. Para ello existen diversas alternativas, como por ejemplo la encapsulación de estos en nanopartículas o su incorporación a los elementos estructurales del biomaterial en el que se cultivan las células [92, 146].

Dentro de la IT de cartílago, existen diversas biomoléculas tradicionalmente empleadas para promover el mantenimiento fenotípico de los condrocitos y estimular la síntesis de MEC. Entre ellos destaca el TGF- $\beta$ , considerándose como un potente estimulador de la diferenciación condrocítica y de la síntesis de colágena tipo II y proteoglucanos [147, 148]. Otro grupo de biomoléculas ampliamente empleadas en este aspecto son las BMPs, con efectos similares a los anteriores [149, 150]. Estos no son los únicos factores de crecimiento o moléculas implicadas en las vías de diferenciación celular y síntesis de MEC, otros como el FGF o el IGF también han demostrado su relación con estos procesos y la utilidad de su aplicación [151, 152].

Debido a la naturaleza intrínseca del tejido cartilaginoso, los condrocitos se encuentran en un ambiente con baja tensión de oxígeno, por lo que ha sido

demostrado que la generación de un ambiente hipóxico en cultivo mejora las características condrogénicas [153-155]. Por último, cabe destacar que, a su vez, la estimulación mecánica produce una mejora en las características fenotípicas y metabólicas de los condrocitos en cultivo [156-158].

### **3.3. Estrategias de biofabricación de tejidos artificiales**

Las estrategias de biofabricación de tejidos artificiales hacen referencia a los elementos y la metodología empleada para la generación de los mismos. En la actualidad, contamos con cuatro modelos de biofabricación de tejidos artificiales. A continuación, ofreceremos una concisa introducción a cada uno de estos modelos, enfatizando sus principales características y relevancia en el campo de la IT.

#### **- Tejidos artificiales generados por elaboración de constructos**

En este enfoque, se generan productos mediante IT denominados constructos. Estos constructos son el resultado de la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento, que contribuyen a formar el tejido artificial [123, 159]. Las células utilizadas deben ser viables, con capacidad de proliferar y diferenciarse, como por ejemplo las células madre de diferentes tipos [124, 160]. Los factores de crecimiento son moléculas que influyen en la función celular (proliferación, migración, diferenciación, etc.), y se incorporan a la mezcla en solución o asociados al biomaterial. Este último actúa como soporte tridimensional y funcional para las células y factores de crecimiento. Los biomateriales deben ser biocompatibles y poseer propiedades biomecánicas similares al tejido que se desea reemplazar [92, 123, 161].

#### **- Tejidos artificiales generados por descelularización y recelularización**

Esta técnica busca crear sustitutos artificiales a partir de MEC tejido-específicas en combinación o no con células. Consiste en generar matrices biológicas no inmunogénicas a partir de un tejido u órgano, el cual es sometido a un proceso de descelularización, mediante el cual se eliminan las células manteniendo los

componentes de la matriz [162, 163]. Estas matrices tridimensionales se pueden utilizar directamente en el tratamiento de lesiones con resultados prometedores, como ha sido demostrado en modelos de nervio periférico [164, 165]. Además, estas matrices pueden ser funcionalizadas mediante la incorporación de diversas fuentes celulares y/o biomoléculas [166, 167].

#### - **Tejidos artificiales generados por bioimpresión**

La bioimpresión es un método novedoso que traslada el proceso común de impresión por inyección de tinta al ámbito biológico. Mediante impresoras 3D adaptadas, es posible depositar capa por capa un tejido u órgano utilizando biotintas, que contienen células vivas, biomateriales estructurales y factores de crecimiento [168, 169]. Aunque aún no se ha logrado alcanzar precisión histológica en la disposición espacial, algunas tecnologías de bioimpresión como la extrusión y la asistida por láser han obtenido prometedores resultados [170, 171]. En este sentido, es importante resaltar que las biotintas deben ser bioimprimibles, biodegradables, no tóxicas, no inmunogénicas y capaces de promover la adhesión y viabilidad celular a corto y largo plazo.

#### - **Tejidos artificiales generados mediante la elaboración de microtejidos**

La implementación de estructuras tridimensionales ha demostrado mejorar la diferenciación celular, mantener el fenotipo y favorecer la síntesis de la MEC específica. En este contexto, los microtejidos (MTs), que consisten en estructuras 3D compuestas únicamente por células y la propia MEC que ellas mismas generan, son especialmente destacados debido a que evitan el uso de biomateriales externos [115, 172-174]. Esta técnica de cultivo celular promueve la organización 3D de las células, las interacciones célula-célula, así como las interacciones célula-MEC, aumentando el nivel de biomimetismo respecto a cultivos tradicionales en dos dimensiones (2D) [175].

Diversas técnicas pueden ser empleadas para generar MTs, como los pellets, gota colgante, superposición líquida, cultivos rotatorios, fuerzas externas, microfluidos, láminas celulares y moldes no adherentes (Fig. 13). Cabe destacar

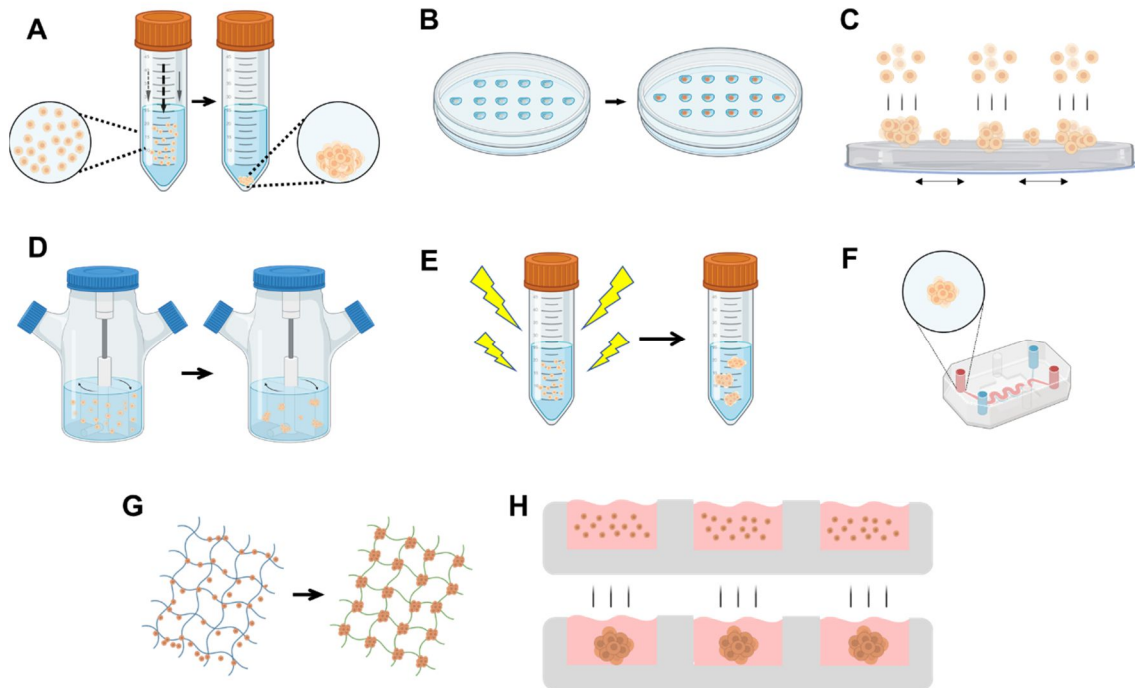
que estas metodologías también pueden emplearse para la generación de microesferas u organoides, que junto a los MTs, pueden ser aplicados en grupo o emplearse en combinación con hidrogeles para generar sustitutos tisulares. En el caso de los organoides se suele emplear una combinación de diversos tipos celulares, los cuales interactúan de manera similar a la función *in vivo*, recreando estructuras con funciones y patrón histológico similar al órgano a generar [176]. A continuación, se detallarán las bases metodológicas y las respectivas ventajas e inconvenientes de cada una de ellas [172-174].

- Pellets: Se fundamenta en la aplicación de una fuerza centrífuga a una suspensión celular contenida en un tubo no adherente. Rápida, sencilla y de bajo coste, no requiere de cualificación o aprendizaje complejo. Sin embargo, no permite reproducir estructuras de morfología controlada, generando MTs de gran diámetro (lo que puede derivar en centros necróticos debido a limitaciones de difusión de nutrientes). Además, expone a las células a fuerzas de cizallamiento potencialmente dañinas. Es una técnica poco escalable y que no permite hacer un seguimiento visual del proceso.
- Gota colgante: Se basa en la generación de una suspensión celular de pequeño volumen (20-30  $\mu\text{L}$ ) que se coloca en una superficie invertida de naturaleza no adherente. De esta forma, por gravedad, pueden condensarse las células en el menisco de la gota sin llegar a romper la tensión superficial. De generación relativamente sencilla, su manejo rutinario es complejo tanto para el seguimiento como en el mantenimiento del cultivo.
- Superposición líquida: La suspensión celular es incubada bajo agitación sobre una superficie plana de baja adhesividad. Sencilla y de bajo coste, pero no permite el control de la morfología y tamaño de los agregados, resultando en MTs heterogéneos.
- Cultivos rotatorios: Una fuerza constante y controlada de agitación provoca la colisión de las células suspendidas, permitiendo la unión intercelular e impidiendo su deposición. Su principal ventaja es su escalabilidad, pero sin embargo su diseño imposibilita un seguimiento a

tiempo real de los agregados y puede no ser adecuada para células con menor capacidad de adhesión.

- Fuerzas externas: Campos magnéticos, eléctricos o ultrasonidos pueden ser aplicados para inducir la agregación celular. Presentan la desventaja de necesitar equipamiento especializado y dificultad en el control de las dimensiones del agregado. Además, la fuerza externa puede tener efectos no conocidos a nivel celular que influyan en el comportamiento del cultivo.
- Microfluidos: Mediante esta técnica, una suspensión celular es bombeada a través de una red de micro-canales y pocillos sobre los que se produce la deposición celular. Permite el control de las condiciones de cultivo y el seguimiento de los microtejidos y su análisis, ya que es posible interconectar el sistema a diferentes dispositivos y detectores. Como inconveniente presenta la necesidad de personal cualificado y equipo especializado, en ocasiones de elevado coste.
- Láminas celulares: Ciertos polímeros, como el poly (N-isopropylacrylamida), exhiben propiedades hidrófobas o hidrofílicas en función de la temperatura. Mediante el control de la misma, es posible provocar la adhesión y liberación de las células para la posterior incubación de los agregados en sustratos no adherentes. Esta técnica permite generar agregados de morfometría controlada, pero necesita equipo especializado y elevados tiempos de generación.
- Moldes no adherentes: Esta técnica consiste en la generación de moldes con estructuras cilíndricas superficiales que permitan generar un patrón negativo en forma de micropocillos al gelificar hidrogeles sobre ellos, siendo posible emplear compuestos no adhesivos como la agarosa. De esta manera, al incubar suspensiones celulares sobre los hidrogeles y dejar que sedimenten por gravedad, es posible obtener estructuras de arquitectura controlada. Presenta la ventaja de generar grandes cantidades de MTs de tamaño y celularidad conocidos mediante la densidad celular de siembra, pudiendo emplear uno o varios tipos celulares. Además, el empleo de un hidrogel ópticamente transparente como la agarosa posibilita la monitorización visual y en tiempo real del proceso de formación del MT [115, 177]. Por otro lado, es posible originar

MTs de distinta morfología al controlar la geometría inicial del molde, como anillos, toroides, estructuras en panel de abeja, etc. Es una técnica de bajo coste pero que requiere cierta cualificación.



**Figura 13:** Esquema de las principales metodologías actuales para la generación de microtejidos. A: Técnica de pellets. B: Técnica de la gota colgante. C: Superposición líquida. D: Cultivos rotatorios. E: Fuerzas externas. F: Microfluidos. G: Láminas celulares. H: técnica de moldes no adherentes o chips de agarosa. Creado con Biorender.com.

Dentro de estas técnicas, las ventajas que ofrecen los moldes no adherentes hacen sobresalir esta metodología sobre el resto. Por esta razón, esta técnica fue la seleccionada para el desarrollo y evaluación de las estructuras tridimensionales generadas en la presente Tesis Doctoral.

En el presente proyecto, nos enfocaremos en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, abordaremos la generación y caracterización de microtejidos utilizando la metodología de moldes no adherentes (microchips de agarosa). Nuestro enfoque se centra en la creación de estructuras tridimensionales llamadas MTs, obtenidas tanto de células cartilaginosas hialinas y elásticas, como de células mesenquimales como las derivadas de la gelatina de Wharton. Finalizada esta etapa, se llevará a cabo un minucioso análisis del

comportamiento de las variantes de MTs generadas, y, la que presente mejores resultados, se combinarán con biomateriales naturales como la fibrina-agarosa. Este paso tiene como objetivo explorar y destacar el potencial de estos MTs para futuras aplicaciones en la investigación y el desarrollo de terapias personalizadas.



## **IV. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN**

Las patologías relacionadas con el tejido cartilaginoso tienen una alta prevalencia en la sociedad y los tratamientos actuales presentan una eficacia limitada. En los últimos años ha emergido una nueva herramienta para la elaboración de nuevas terapias, la IT. Dentro de esta nueva disciplina, la búsqueda y el estudio de fuentes y modelos celulares alternativos es un campo en constante desarrollo.

Bajo este contexto, estudios previos han desarrollado un nuevo método de cultivo tridimensional, denominado MTs, que permite generar estructuras tridimensionales compuestas por células y la propia MEC que sintetizan. Estos MTs han arrojado interesantes resultados con distintas fuentes celulares, mostrando la mejora en la capacidad de síntesis y biomimetismo respecto a los cultivos tradicionales.

En este sentido, la presente Tesis Doctoral aspira a generar *ex vivo* nuevas estructuras cartilagosas basadas en MTs derivados de fuentes celulares condrogénicas, como los condrocitos hialinos y elásticos (analizando además el posible efecto que puedan provocar en los mismos su desarrollo bajo condiciones de cultivo de expansión o condrogénicas) y fuentes celulares mesenquimales como las derivadas de la gelatina de Wharton. Además, se pretende caracterizar el comportamiento de los MTs al ser combinados con biomateriales de fibrina-agarosa (FA) y mantenidos en condiciones condrogénicas a fin de determinar el perfil de viabilidad, capacidad de migración y síntesis de componentes de la MEC. El análisis de estos resultados puede ser clave para el diseño de futuros estudios *in vivo* que prueben la eficacia terapéutica de estos sustitutos y su posible aplicación en protocolos de IT de cartílago u otros tejidos.

## **V. OBJETIVOS**

## **1. Objetivo general**

Generar y caracterizar *ex vivo* nuevos sustitutos de tejido cartilaginoso humano desarrollados a partir de microtejidos derivados de condrocitos, células madre mesenquimales y biomateriales de fibrina-agarosa para su potencial aplicación en Ingeniería Tisular.

## **2. Objetivos específicos**

1. Generar microtejidos, a partir de condrocitos derivados de cartílago hialino y elástico, y determinar sus características morfoestructurales, histológicas, propiedades biológicas y capacidad de síntesis de moléculas de la matriz extracelular durante su desarrollo *ex vivo*.
2. Generar microtejidos, a partir de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton y determinar sus características morfoestructurales, histológicas, propiedades biológicas y capacidad de síntesis de moléculas de la matriz extracelular durante su desarrollo *ex vivo*.
3. Evaluar el comportamiento y capacidad de integración *ex vivo* de los microtejidos generados tras su encapsulación en biomateriales de fibrina-agarosa mediante técnicas de viabilidad celular y análisis histológicos.
4. Correlacionar los resultados obtenidos, relativos a los microtejidos y sustitutos generados, para determinar su futura aplicación en protocolos de Ingeniería Tisular.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

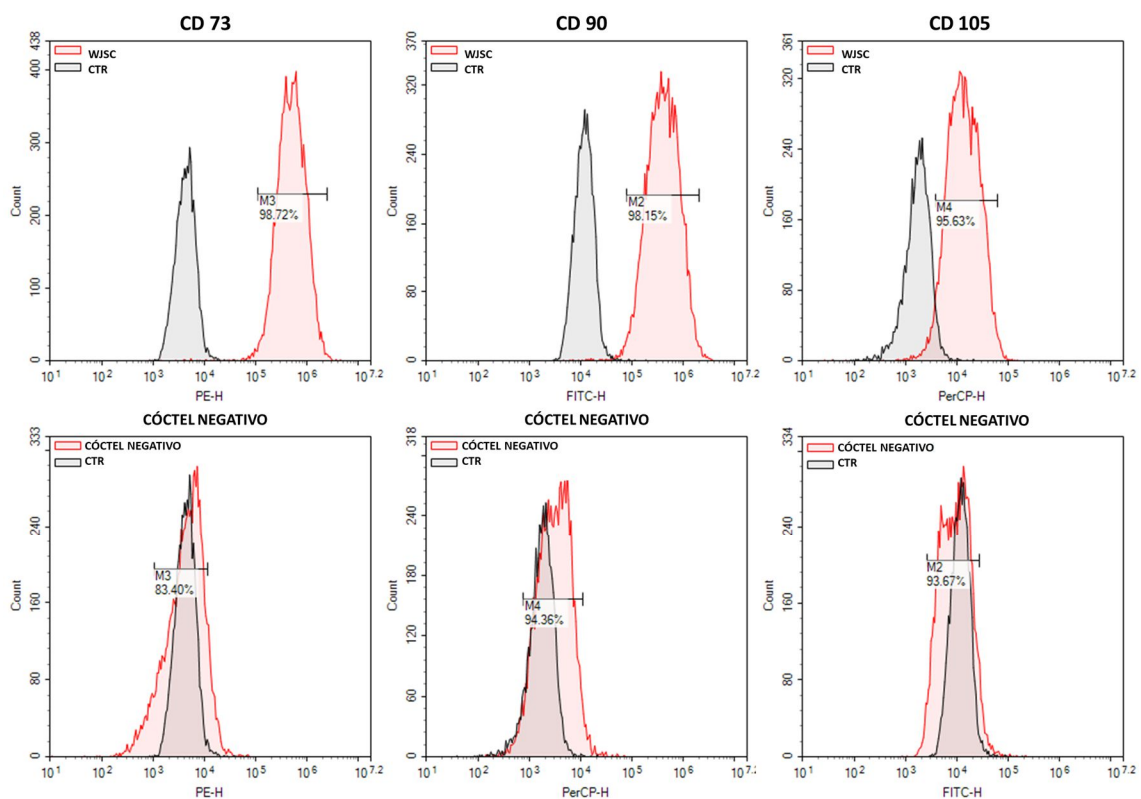
## **1. Procesamiento de muestras y obtención de cultivos primarios**

En el presente proyecto de Tesis Doctoral se han empleado tres fuentes celulares humanas (cartílago hialino, cartílago elástico y gelatina de Wharton del cordón umbilical) para la generación de los distintos microtejidos (MTs) y sustitutos evaluados.

Las diferentes poblaciones celulares empleadas durante la presente Tesis Doctoral fueron aisladas a partir de donantes sanos mediante protocolos previamente descritos [92, 115, 178]. Tras la extracción, se dividieron las biopsias en dos grupos: uno se sometió a procesamiento para análisis microscópicos (tanto ópticos como electrónicos), y el otro fue conservado en medio de transporte con antibiótico por un mínimo de 6 horas para permitir la extracción de células. El medio de transporte corresponde a medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 2% de antibiótico (ambos de Merck, Alemania). Las muestras fueron diseccionadas con material quirúrgico (removiendo los restos de pericondrio en el caso del cartílago elástico, el amnios y los vasos en el caso del cordón umbilical) y fragmentadas para su posterior digestión enzimática en una solución 2 mg/mL (W/V) de colagenasa tipo I (Gibco, EE. UU.) diluida en DMEM a 37 °C durante la noche. Una vez disgregado los tejidos, las soluciones fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener la suspensión celular. El sobrenadante fue desechado y el pellet cultivado en frascos de cultivo celular bajo condiciones estándar (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) con medio de expansión (ME) en el caso de los condrocitos hialinos y elásticos, y AmnioMax (Gibco, EE. UU.) para las células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton's. La composición del ME consistía en medio DMEM y medio F-12 (en proporción 1:1) suplementado con 10% de FBS, 1% de antibiótico y 1% de L-glutamina (todos los reactivos fueron comprados en Merck, Alemania). El medio de cultivo fue renovado cada 3 días y la confluencia celular diariamente controlada mediante microscopia de contraste de fases. Cuando los cultivos alcanzaron aproximadamente el 75% de confluencia, se realizó el subcultivo mediante el uso de una solución de tripsina-EDTA (Merck, Alemania) para desprender las células. Posteriormente, se sembraron a una densidad

celular de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> hasta el pase IV-V, momento en el cual se obtuvo la cantidad celular necesaria para llevar a cabo los experimentos de esta Tesis Doctoral.

El perfil mesenquimal de las WJSC empleadas fue caracterizado utilizando un citómetro NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, EE. UU.). Se evaluaron los marcadores positivos CD73 (98,72%), CD90 (98,15%), y CD105 (95,63%) y negativos CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR (BD Biosciences, EE. UU.) (Fig. 14).



**Figura 14:** Resultados de la caracterización por citometría del perfil mesenquimal de las células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton (WJSC) para los marcadores CD 73, CD 90 y CD 105 positivos y el coctel negativo.

Todas las células empleadas durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral fueron obtenidas bajo consentimiento informado. Además, estos estudios han sido aprobados por el comité ético local de Granada (PEIBA PI-0257-2017 y PEIBA-1915-N-20) y el comité ético regional de Andalucía (PEIBA-0116-N-19).

## 2. Generación de microtejidos mediante microchips de agarosa

### 2.1. Elaboración de moldes

Para generar los MTs evaluados en la presente Tesis Doctoral fueron empleados dos moldes de diferente origen, pero similares características. En los experimentos relacionados con los MTs derivados de condrocitos se emplearon moldes generados *ex profeso*. En cambio, para la generación de MTs derivados de WJSC se emplearon moldes comerciales de similares especificaciones (Merck, Alemania) a fin de ajustarse a metodologías previas desarrolladas por el grupo de investigación con esta fuente celular [115].

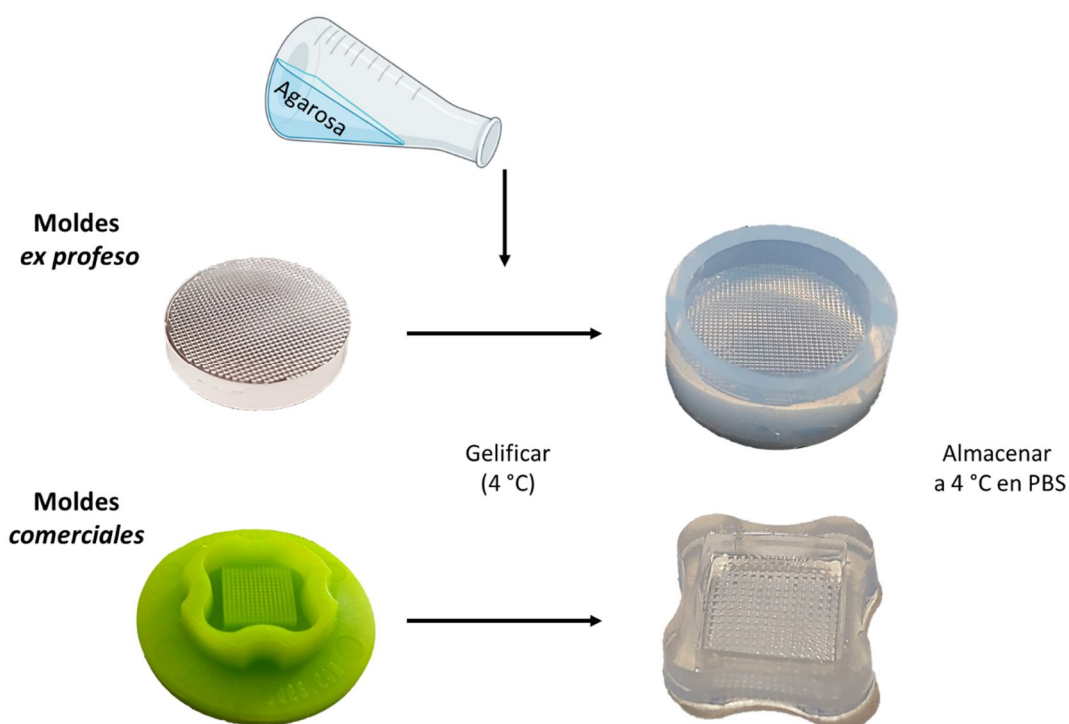
Los moldes *ex profeso* fueron generados mediante elastómero micromoldeado por réplica. Los moldes maestros se prepararon mediante el recubrimiento por rotación de una capa uniforme de SU-8 100 de 200  $\mu\text{m}$  de espesor, es decir, un tono negativo y fotorresistente a base de epoxi sobre una oblea de silicio (MicroChem, Australia). A continuación, el SU-8 se expuso selectivamente a UV (lámpara de vapor de mercurio de alta presión, longitud de onda central 365 nm, potencia 13 mW/cm<sup>2</sup>, duración 50,7 s) a través de una fotomáscara transparente que contenía puntos circulares negros de 400  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que produjo pozos cilíndricos en el SU-8 con una profundidad de 200  $\mu\text{m}$  y radios idénticos a los de los puntos circulares. Tras cocer el molde maestro durante 90 minutos a 120 °C en un horno de convección, se preparó el polidimetilsiloxano (PDMS) mezclando la base Sylgard® 184 (Dow Corning, EE. UU.) y el agente de curado en una proporción de 10:1 respectivamente. A continuación, se vertió el prepolímero líquido sobre el molde maestro hasta alcanzar un espesor de aproximadamente 2 mm. Tras la desgasificación, se dejó curar durante 48 h a temperatura ambiente, reproduciendo así la topografía de la superficie del molde maestro. A continuación, se retiró el elastómero curado y se perforaron manualmente discos circulares de 18 mm de diámetro en el PDMS. Estos moldes fueron generados mediante una colaboración con el Prof. Dr. Jan Vanfleteren y el Dr. Rik Verplancke del *Centre for Microsystems Technology (CMST)* de la Universidad de Gante en Bélgica.



Cabe destacar que la principal diferencia entre los moldes *ex profeso* y los moldes comerciales radicaba en el número de pocillos generados en el patrón superficial, encontrando un patrón con 1041 pocillos o 256 pocillos respectivamente. Sin embargo, las especificaciones arquitecturales de los pocillos de ambos tipos de moldes eran similares.

## 2.2. Generación de microchips de agarosa

La generación de los chips de agarosa siguió una metodología similar independientemente del molde empleado. Primero, se preparó una solución de agarosa al 3,5% disolviendo agarosa tipo I en una solución de tampón fosfato (PBS) estéril (ambas de Sigma-Aldrich, Alemania) para ser autoclavada posteriormente. Los moldes se esterilizaron con etanol al 70% y posteriormente la solución de agarosa tipo I fue vertida sobre ambos tipos de moldes. En el caso de los moldes *ex profeso*, estos fueron emplazados en placas de 12 pocillos mientras que los moldes comerciales se colocaron en placas petri. A continuación, tras gelificar la agarosa a 4 °C, los chips de agarosa fueron desmoldados y preservados en PBS a 4 °C hasta su uso (Fig. 15).

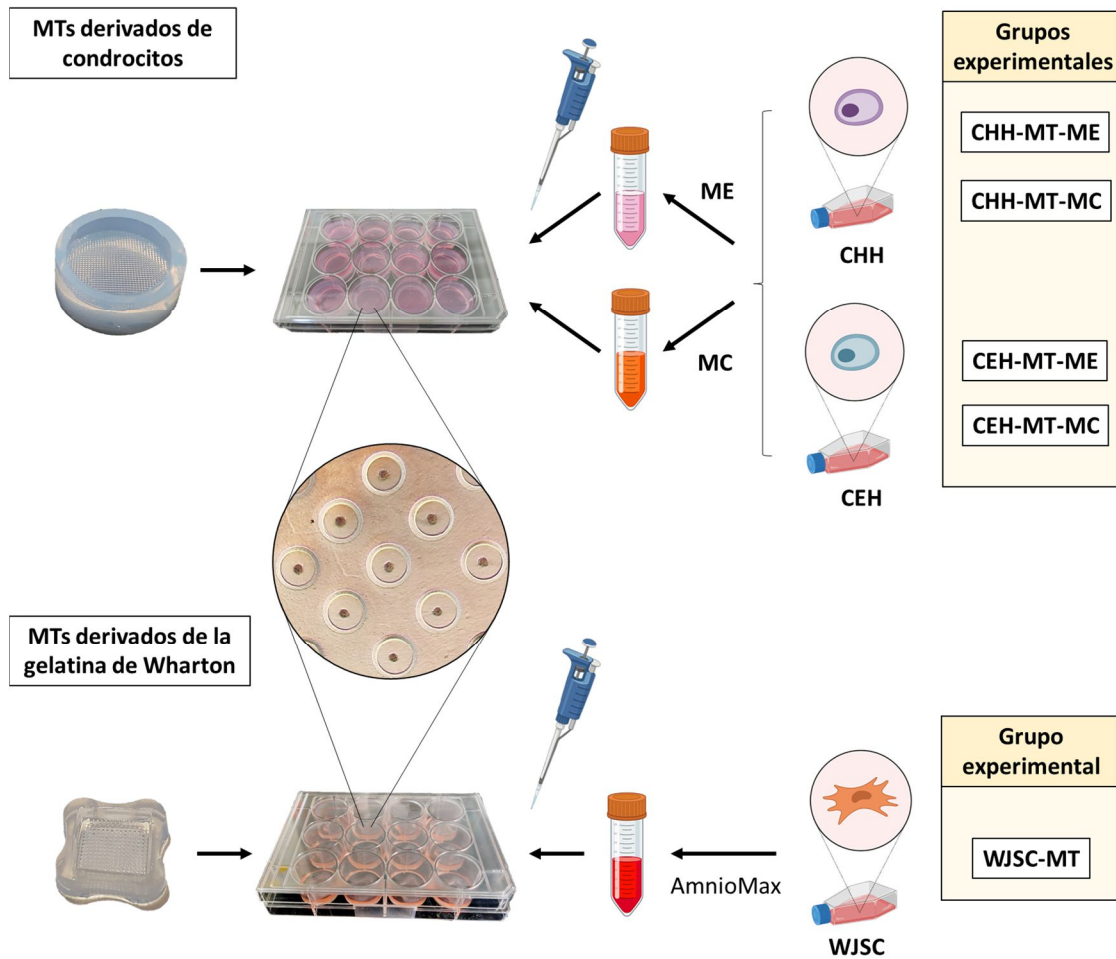


**Figura 15:** Moldes *ex profeso* y moldes comerciales de PDMS aplicados en el proceso de generación de los microchips de agarosa empleados en la presente Tesis Doctoral.

### 2.3. Cultivo y generación de microtejidos

En primer lugar, los microchips de agarosa fueron colados en placas de 12 pocillos y equilibrados durante 30 minutos con el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular empleado durante la expansión *in vitro*. Tras ello, una suspensión celular de  $2.5 \times 10^5$  condrocitos (derivados de cartílago hialino o cartílago elástico) en 500  $\mu$ l de medio de cultivo o de  $5 \times 10^4$  WJSC en 190  $\mu$ l de AmnioMax fueron sembradas sobre los respectivos chips de agarosa. Posteriormente, las placas fueron colocadas en el incubador durante una hora para permitir la sedimentación por gravedad de las células en el fondo de los pocillos, tras lo cual se completó el volumen de medio de cultivo alrededor del chip, con 1,5 mL en el caso de los MTs derivados de condrocitos y 1 mL en el caso de los comerciales con MTs derivados de cordón umbilical. Además, en este estudio los MTs derivados de condrocitos hialinos y elásticos fueron mantenidos en dos medios de cultivo alternativos (medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC)). El MC estaba compuesto por DMEM/F12 suplementado con antibiótico al 1%, 5 mg/mL de insulina transferrin-selenito, 100 nM de dexametasona, 10 ng/mL de TGF- $\beta$ , 200  $\mu$ M de ácido L-ascórbico 2-fosfato y 0.35  $\mu$ M de L-prolina (todos los reactivos de Merck, Alemania) y 100  $\mu$ g/mL de piruvato sódico (Gibco, EE. UU.). De esta manera se generaron los siguientes grupos experimentales de MTs (Fig. 16):

- Grupo de microtejidos derivados de cartílago humano hialino cultivados en condiciones de expansión (CHH-MT-ME).
- Grupo de microtejidos derivados de cartílago humano hialino cultivados en condiciones condrogénicas (CHH-MT-MC).
- Grupo de microtejidos derivados de cartílago humano elástico cultivados en condiciones de expansión (CEH-MT-ME).
- Grupo de microtejidos derivados de cartílago humano elástico cultivados en condiciones condrogénicas (CEH-MT-MC).
- Grupo de microtejidos derivados de cordón umbilical humano (WJSC-MT).



**Figura 16:** Representación esquemática de los grupos experimentales de microtejidos evaluados en la presente Tesis Doctoral. En la parte central, se muestra una imagen representativa de la apariencia de los microtejidos bajo microscopía de contraste de fases. Imágenes originales de la presente Tesis Doctoral. Pictogramas creados con Biorender.com.

Además, se establecieron controles 2D mediante el cultivo en condiciones estándar de los mismos tipos celulares y medios de cultivo empleados anteriormente, estableciéndose los siguientes grupos:

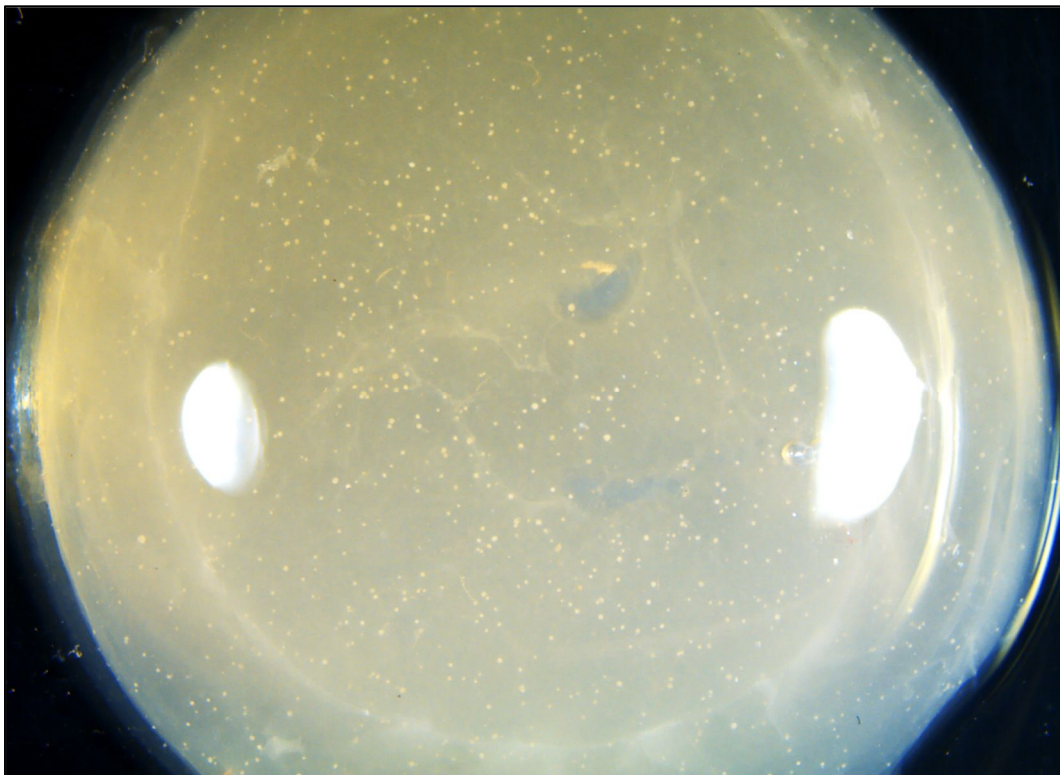
- Grupo control de condrocitos humanos hialinos cultivados en condiciones de expansión (CHH-2D-ME).
- Grupo control de condrocitos humanos hialinos cultivados en condiciones condrogénicas (CHH-2D-MC).
- Grupo control de condrocitos humanos elásticos cultivados en condiciones de expansión (CEH-2D-ME).

- Grupo control de condrocitos humanos elásticos cultivados en condiciones condrogénicas (CEH-2D-MC).
- Grupo control de células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton (WJSC-2D).

Los MTs se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 28 días de desarrollo *ex vivo* (DEV). Se llevaron a cabo análisis morfométricos de los MTs generados durante los primeros 4 días de DEV, así como a los días 4, 7, 14, 21 y 28 días. Por otro lado, los análisis de viabilidad celular, actividad metabólica y caracterización histológica se realizaron únicamente en los días 4, 7, 14, 21 y 28 de DEV. En el caso de los WJSC-MTs, se optó por realizar únicamente análisis histológicos e inmunohistoquímicos, ya que previamente el grupo de investigación había llevado a cabo la caracterización morfométrica, de viabilidad y actividad metabólica en trabajos anteriores [115].

### 3. Generación de sustitutos artificiales mediante la combinación de MTs e hidrogeles de fibrina-agarosa.

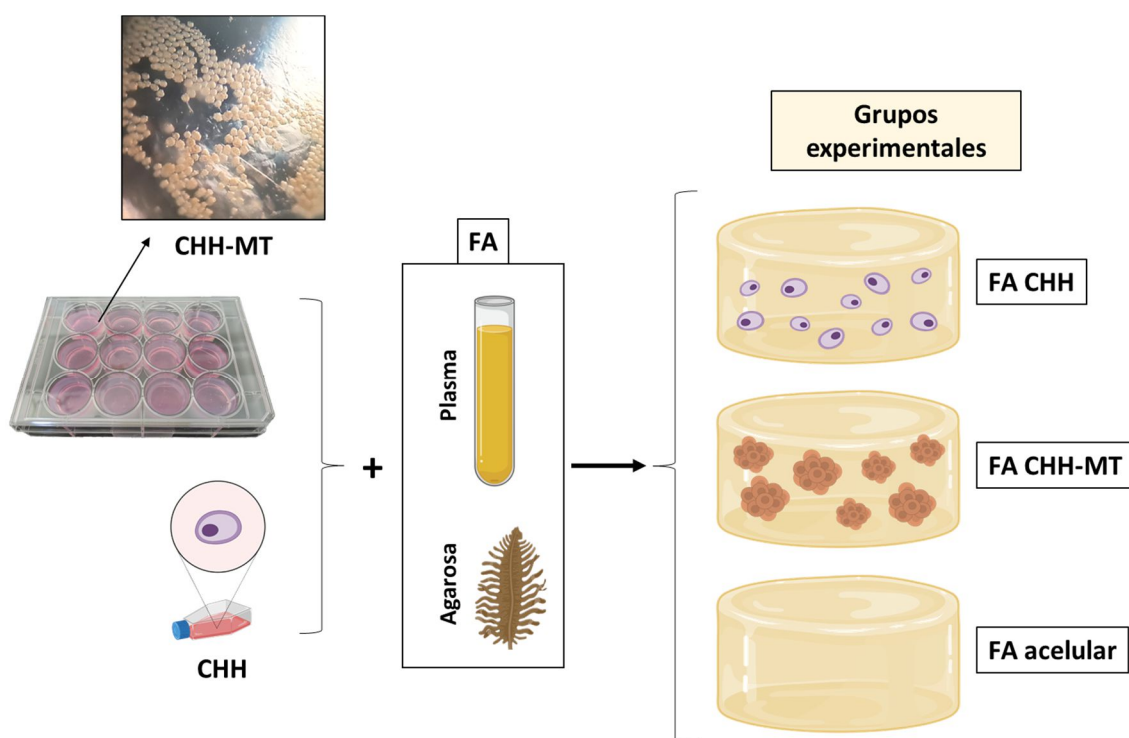
Evaluados los resultados *ex vivo* previamente obtenidos, se determinó que los CHH-MTs mantenidos durante 7 días de DEV en MC presentaban características óptimas para evaluar su comportamiento al ser imbuidos en un hidrogel de fibrina agarosa (FA) (Fig. 17). La preparación de los hidrogeles de FA se realizó siguiendo protocolos previamente descritos [92]. Brevemente, para preparar 10 mL de solución de FA se realizó la combinación de; 7,6 mL de plasma humano;  $2 \times 10^6$  células (o el contenido en MTs de 8 microchips) disueltos en 750  $\mu$ L de MC; 150  $\mu$ L de ácido tranexámico para evitar la fibrinólisis (Amchafibrin) (Fides-Ecofarma, España); 1 mL de cloruro cálcico al 1% y 500  $\mu$ L de una solución de agarosa tipo VII al 2% en PBS (Merck, Alemania). Geles de 2 mL fueron generados al verter la solución de FA en placas de 12 pocillos y dejar que gelificaran a 37 °C. Una vez gelificados, se añadió 1 mL de MC sobre cada hidrogel, el cual fue renovado cada 2-3 días.



**Figura 17:** Imagen representativa de un hidrogel de fibrina agarosa (FA) con microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MT) encapsulados en su interior. Imágenes originales de la presente Tesis Doctoral.

En la realización de la presente Tesis Doctoral se generaron sustitutos cartilaginosos hialinos mediante la encapsulación de condrocitos y MTs condrogénicos derivados de cartílago hialino en hidrogeles de FA estableciéndose los siguientes grupos de estudio (Fig. 18):

- Hidrogeles de fibrina-agarosa con condrocitos hialinos humanos (grupo FA CHH).
- Hidrogeles de fibrina-agarosa con microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (grupo FA CHH-MT).
- Hidrogeles de fibrina-agarosa acelular como control.



**Figura 18:** Representación esquemática de los grupos experimentales de sustitutos artificiales evaluados en la presente Tesis Doctoral. Los sustitutos fueron generados mediante la combinación de condrocitos hialinos dispersos (FA CHH) o microtejidos derivados de condrocitos hialinos (CHH-MT) con hidrogeles de fibrina-agarosa (FA). En la parte superior, se muestra una imagen representativa de la apariencia de los CHH-MTs recolectados bajo microscopía de contraste de fases. Imágenes originales de la presente Tesis Doctoral. Pictogramas creados con Biorender.com.

Los hidrogeles se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 28 días de DEV y fueron analizados histológicamente y en términos de viabilidad y actividad metabólica a los 7, 14 y 28 días de DEV, como se describe a continuación.

## **4. Caracterización de los microtejidos y sustitutos generados**

### **4.1. Análisis morfométrico del desarrollo de los microtejidos**

El proceso de formación de los MTs derivados de condrocitos en los microchips fue evaluado mediante microscopia de contraste de fases (Nikon, Eclipse Ti-U, Japón). Se tomaron imágenes microscópicas de cada grupo experimental a diferentes puntos temporales (0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28 días de DEV) que fueron sometidas a un análisis morfométrico con el software *NIS Elements Advanced Research* Nikon. En este aspecto, se determinaron el área, el diámetro, el perímetro, el volumen y la circularidad en 10 MTs por condición experimental y tiempo siguiendo procedimientos previamente descritos [115]. La circularidad fue calculada mediante la fórmula:  $\text{Circularidad} = (4\pi A)/p^2$ , tomando en consideración el valor de un círculo perfecto como 1.

### **4.2. Evaluación de la viabilidad y función celular**

En este estudio, tanto los MTs derivados de condrocitos como los sustitutos generados basados en hidrogeles fueron sometidos a diferentes ensayos con el fin de evaluar la viabilidad y actividad metabólica en los mismos. En el caso de los MTs derivados de condrocitos, la viabilidad celular, el daño irreversible de la membrana celular y la actividad metabólica fueron determinados mediante el kit *Live/Dead Cell Viability Assay* (Invitrogen, EE. UU.), la cuantificación de ADN liberado al medio y el ensayo WST-1 (*Cell Proliferation Reagent, Water Soluble Tetrazolium* WST-1 (Roche, Alemania) respectivamente siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y protocolos descritos previamente [115, 179]. En el caso de los sustitutos basados en hidrogeles se realizaron los ensayos *Live/Dead* para evaluar la viabilidad celular y el método de la resazurina para determinar la actividad metabólica [180, 181]. Estas pruebas fueron realizadas en tres microchips o tres hidrogeles independientes (n=3) a los 4, 7, 14, 21 y 28 días de DEV y a los 7, 14 y 28 días de DEV respectivamente.

#### **4.2.1. Análisis microscópico de la viabilidad celular**

Para llevar a cabo el ensayo *Live/Dead*, tanto los microchips con MTs como los hidrogeles fueron lavados con PBS e incubados con una solución de calceína AM y homodímero de etidio-1 (Invitrogen) en PBS durante 10 min en oscuridad. La respuesta de las células presentes en los MTs e hidrogeles a ambos componentes fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia (Nikon, Eclipse Ti-U, software NIS Elements Advanced Research) [182, 183]. Sin embargo, debido a su estructura tridimensional, no fue posible realizar análisis cuantitativos de células viables y muertas en ninguno de los casos.

#### **4.2.2. Cuantificación de ADN liberado**

Para determinar el daño celular irreversible durante el desarrollo de los MTs se procedió a cuantificar el ADN liberado por las células muertas al medio de cultivo mediante métodos descritos previamente [115] [179]. Los medios de cultivo de 3 chips independientes fueron recolectados y cuantificados (por quintuplicado) mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

#### **4.2.3. Determinación de la actividad metabólica**

Para evaluar la actividad metabólica de los condrocitos presentes en los MTs, éstas se incubaron con el reactivo WST-1 durante 4 horas a 37 °C siguiendo las recomendaciones del fabricante y protocolos descritos previamente [115, 179, 184]. La reacción colorimétrica se cuantificó con un espectrofotómetro ASYS UVM340 y el software DigiRead (Biochrom Ltd., Reino Unido).

Para cada uno de los ensayos, fueron empleados cultivos 2D de cada tipo celular y medio de cultivo como controles. En los controles negativos, los cultivos 2D se trataron con una solución de Triton X-100 al 1% para inducir daño irreversible de la membrana celular como se ha descrito previamente [115]. Además, las mediciones experimentales fueron realizadas por triplicado.



En el caso de los sustitutos cartilagosos hialinos basados en hidrogeles de FA, la determinación de la actividad metabólica fue realizada mediante el ensayo de la resazurina. Para ello, cada hidrogel fue incubado con 1 mL de una solución de resazurina (Merck, Alemania) al 1% en MC durante 4 horas a 37 °C según las recomendaciones del fabricante y protocolos descritos previamente [179, 184]. La reacción de luminiscencia generada por la resofurina, producto del metabolismo celular de la resazurina, fue cuantificada con un lector de placas (Infinite F200 PRO, TECAN, Singapore) y el software TECAN i-control ( $\lambda_{\text{ex}}=550$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=600$  nm, ganancia 60). Los resultados fueron normalizados respecto a los controles de FA acelulares. Estos análisis fueron realizados en 3 hidrogeles independientes, siendo realizadas 4 réplicas técnicas por cada uno.

### **4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico**

Los análisis histológicos fueron realizados en 3 muestras independientes (n=3). De esta manera, se recolectaron los MTs de tres microchips para el análisis de los MTs de cada grupo experimental y periodo de evaluación mientras que en el caso de los sustitutos cartilagosos fueron tomados 3 hidrogeles por cada tiempo. Las muestras fueron fijadas en una solución tamponada de formaldehído al 3,7%, deshidratadas e incluidas en parafina siguiendo protocolos establecidos para bloque celular en el caso de los MTs [185] y para hidrogeles de FA [186]. Posteriormente se obtuvieron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de espesor como se describió previamente [115].

Para evaluar la morfología e histoarquitectura, secciones de los MTs y los sustitutos cartilagosos fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE). Además, fue evaluada la presencia de proteoglicanos ácidos con el método histoquímico del azul alcian (AA) a pH 2,5, mientras que las fibras (colágenos fibrilares) se identificaron con la tinción de picrosirius (PS) [115].

En el caso de los MTs derivados de condrocitos hialinos y condrocitos elásticos, la presencia de fibras elásticas fue evaluada mediante la técnica histoquímica de la orceína [20]. Por otro lado, los WJSC-MTs fueron evaluados mediante la

técnica del ácido peryódico de Schiff (PAS) para la detección de gránulos de glucógeno y glucoproteínas [20, 54, 187].

Mediante técnicas inmunohistoquímicas para el marcaje de la proteína S-100 y el antígeno PCNA se determinó el perfil condrogénico y proliferativo en los MTs derivados de CHH y CEH. Además, se evaluó la presencia de fibras colágenas tipo II y tipo IV, siendo esta última también evaluada en los sustitutos cartilagosos basados en hidrogeles de FA. Una lista de los anticuerpos y los detalles metodológicos de los ensayos inmunohistoquímicos está recogida en la Tabla 1.

En el caso de los MTs derivados de WJSC, se aplicaron las mismas técnicas histoquímicas que las aplicadas en el caso de los MTs cartilagosos. Por otro lado, se determinó la presencia de moléculas específicas de la membrana basal (colágenos tipo IV y VI, proteoglucanos HSPG2 y agrina y glucoproteínas laminina, y nidogenina-1) empleando procedimientos inmunohistoquímicos indirectos. Los detalles de los anticuerpos y protocolos realizados están recogidos en la Tabla 1. Asimismo, estos análisis también se llevaron a cabo en cultivos celulares 2D independientes de WJSC (n=3) y en muestras de cordón (n=3) con el propósito de identificar la expresión diferencial de estos componentes tanto en el cordón umbilical como en las WJSC mantenidas en cultivo 2D tradicional (WJSC-2D) y en cultivo tridimensional (WJSC-MTs).

Anticuerpo	Dilución Incubación	Pretratamiento	Referencia
Policlonal de conejo anti-S-100	1:400 ON a 4 °C	Tampón citrato pH 8 20 min a 95 °C	DakoCytomation, Dinamarca (Z0311)
Monoclonal de ratón anti- PCNA	Prediluido ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	Sigma-Aldrich, Alemania (P8825)
Policlonal de conejo anti-colágeno tipo II	1:250 ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	EMD Millipore, EE. UU. (AB2036)
Policlonal de ratón anti-colágeno tipo IV	Prediluido ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	Máster Diagnóstica, España (MAD001060QD)
Policlonal de conejo anti-colágeno tipo VII	1:50 ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	Novus Biological, EE. UU. (NBP2-37900)
Policlonal de conejo anti-HSPG2	1:250 ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	Abxexa, Reino Unido (abx103270)
Policlonal de conejo anti-agrina	1:500 ON a 4 °C	Tampón citrato pH 6 20 min a 95 °C	Abxexa, EE. UU. (abx037897)
Policlonal de conejo anti-laminina	1:250 ON a 4 °C	Tampón citrato pH 8 20 min a 95 °C °	Abcam, Reino Unido (ab11575)
Policlonal de cabra anti-nidogeno-1	1:30 ON a 4 °C	Tampón EDTA pH 8 20 min a 95 °C °	R&D Systems, EE. UU. (AF2570)
ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidasa)	1h at TA	-	Vector Laboratories, EE. UU. (MP-7401)
ImmPRESS® HRP Anti-Mouse IgG (Peroxidasa)	1h at TA	-	Vector Laboratories, EE. UU. (MP-7402)
ImmPRESS® HRP Anti-Goat IgG (Peroxidasa)	1h at TA	-	Vector Laboratories, EE. UU. (MP-7405)

**Tabla 1.** Anticuerpos y condiciones técnicas de los ensayos inmunohistoquímicos realizados durante la presente Tesis Doctoral. Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS 0.1M (pH 7.2-7.4) con 0.3% Tween-20 (Merck, Alemania). ON: durante la noche; TA: temperatura ambiente.

Todas las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron de forma simultánea y bajo las mismas condiciones siguiendo protocolos descritos previamente [92, 115, 186, 188]. Además, la incubación del anticuerpo primario fue omitida en una sección independiente como control negativo del análisis de anticuerpos.

#### **4.4. Análisis ultraestructural**

Para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras de cordón umbilical y los WJSC-MTs generados a los 4 y 7 días de DEV fueron fijados en glutaraldehído (Panreac Química, España) diluido al 2,5% en tampón cacodilato 0,05 M pH 7,2 (Merck, Alemania) durante 4 horas a 4 °C. Después, las muestras fueron sometidas a tres lavados en el mismo tampón a 4 °C y postfijadas con tetróxido de osmio al 1% (Electron Microscopy Sciences, EE. UU.). Las muestras se deshidrataron y finalmente se incluyeron en resina EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences, EE. UU.) mediante procedimientos estándar [159, 187, 189, 190]. Posteriormente, se realizaron secciones semifinas (de 1 µm de grosor) y se tiñeron con azul de toluidina (Merck, Alemania). Una vez seleccionada la zona, se realizaron secciones ultrafinas (50 nm) y se tiñeron con acetato de uranilo (Merck, Alemania). Por último, las secciones ultrafinas fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión Libra 120 Plus (Carl Zeiss SMT, Alemania).

#### **5. Análisis cuantitativos y estadísticos**

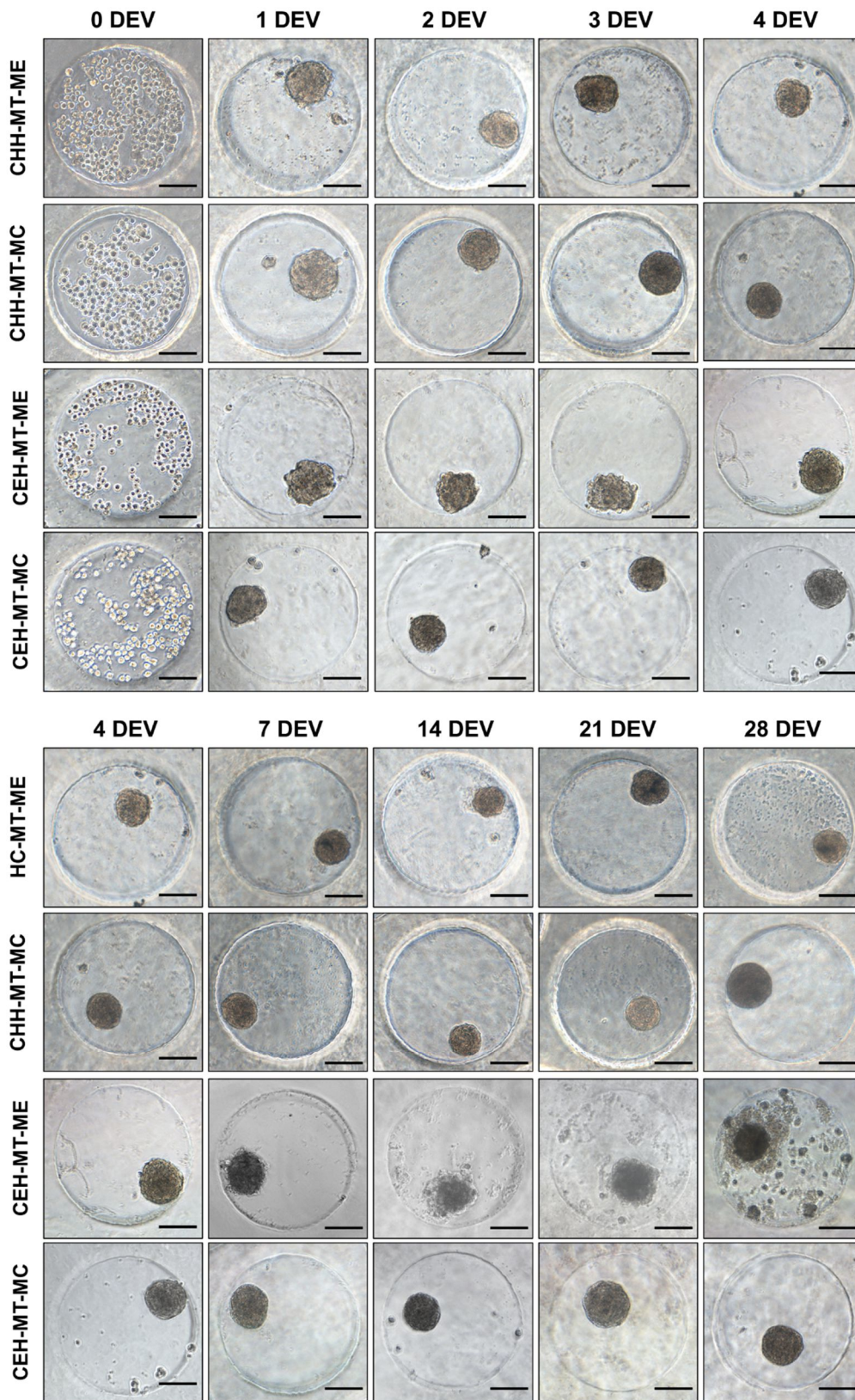
Los parámetros morfométricos, los valores de ADN y de actividad metabólica obtenidos de los MTs derivados de condrocitos hialinos y elásticos en condiciones de expansión y condrogénicas (y de actividad metabólica de los sustitutos cartilagosos generados mediante encapsulación en hidrogeles de FA), se analizaron mediante el test de normalidad Shapiro-Wilk y las diferencias significativas entre grupos fueron determinadas mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Las correlaciones entre los valores de los parámetros morfométricos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Kendall. Se consideraron diferencias significativas para  $p < 0,05$ , mostrando los resultados como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 24.0.

## **VII. RESULTADOS**

# **1. Caracterización de los microtejidos derivados de condrocitos**

## **1.1. Análisis morfométrico**

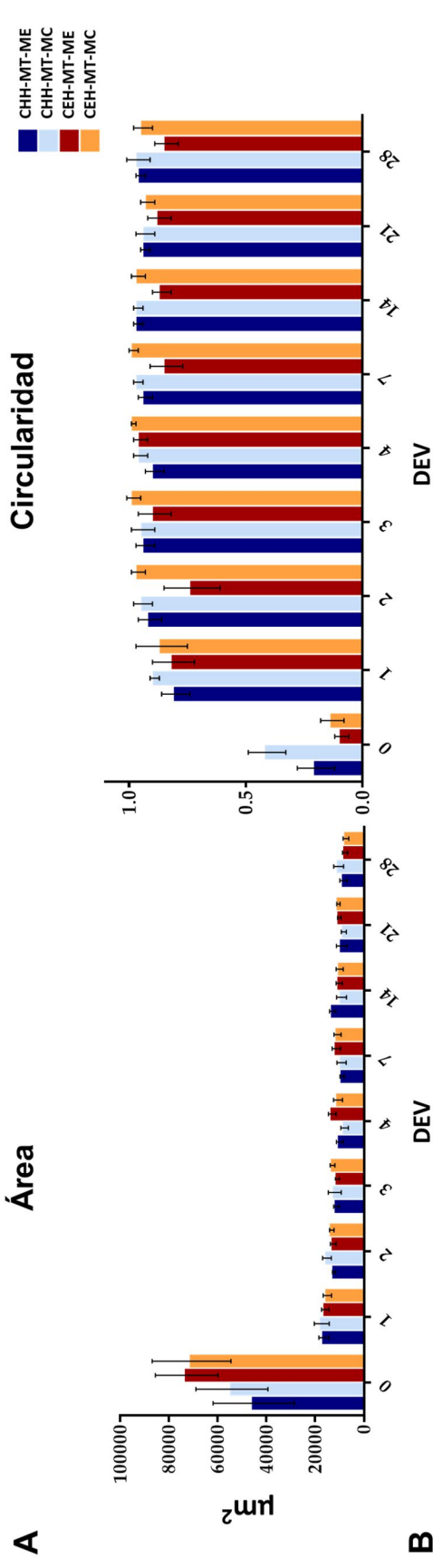
Tras la siembra de los microchips de agarosa, los CHH y los CEH tanto en ME como MC se depositaron y concentraron en la base de los micropocillos. Dispersas inicialmente, las células agregaron progresivamente formando MTs u esferoides hasta estabilizarse en el día 4 de DEV. En general, los MTs obtuvieron una estructura esferoidal característica que se mantuvo relativamente estable a lo largo del tiempo, especialmente cuando se cultivaron con MC (Fig. 19). Curiosamente, en el caso del grupo CEH-MT-ME, la superficie de los MTs presentó un patrón irregular con algunos signos de desagregación, siendo especialmente visibles a partir de los 14 días de DEV. Al mismo tiempo, también se empezó a producir un material irregular alrededor en este grupo, siendo claramente evidente a los 28 días de DEV (Fig. 19). Las diferencias en cuanto a la circularidad y comportamiento morfológico evidenciadas en la evaluación microscópica fueron corroboradas por los análisis cuantitativos (Fig. 20).



**Figura 19:** Microscopía de contraste de fase del proceso de formación de microtejidos (MTs) derivados de cartílago humano mediante la técnica de los microchips de agarosa. Las imágenes muestran MTs derivados de cartílago hialino (CHH-MTs) y cartílago elástico (CEH-MTs) cultivados en medio de expansión (ME) o medio condrogénico (MC) durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Barra de escala = 100  $\mu$ m.

Los análisis cuantitativos mostraron que los CHH y los CEH cultivados en los microchips de agarosa con ME o MC fueron capaces de generar progresivamente MTs estables y circulares durante los 28 días de DEV (Fig. 20). En cuanto al área de los MTs generados, los valores medios para los CHH mantenidos en ME y MC fueron de  $11,2 \times 10^3$  y  $11,25 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,703$ , Fig. 20). Pasadas 24 horas, el área de los CHH-MTs con ambos medios de cultivo experimentó una reducción significativa. El proceso de formación de los CHH-MTs fue acompañado por un aumento de la circularidad y compactación progresiva de los MTs, además de cambios proporcionales en otros parámetros morfológicos (diámetro, perímetro y volumen). Los análisis estadísticos revelaron que los CHH-MT-MC eran consistentemente más circulares que los CHH-MT-ME ( $p = 0,001$ ), con diferencias específicas a los 4, 7 y 28 días de DEV ( $p < 0,05$ , Fig. 20). En relación con los CEH, los MTs generados bajo la influencia del MC mostraron un comportamiento similar al de los CHH, es decir, una reducción del área y una compactación progresiva a lo largo del tiempo (Fig. 20). En el caso de los CEH-MT-ME, el área mostró un comportamiento comparable a los casos anteriores. Sin embargo, la circularidad global fue significativamente menor que al emplear MC ( $p = 0,000$ ), siendo estas diferencias significativas desde el primer día de DEV hasta el día 28 ( $p < 0,05$ , Fig. 20), confirmando los hallazgos microscópicos descritos anteriormente. Los resultados correspondientes a los diámetros y el volumen no se muestran en la Figura 20 ya que mostraron comportamientos correlativos a los valores de área y perímetro a lo largo del tiempo.





Grupos	DEV	0	1	2	3	4	7	14	21	28	Media global
CHH-MT-ME	a	45,29 ± 16,64	16,43 ± 2,14	12,32 ± 0,61	11,34 ± 1,12	10,01 ± 1,39 <sup>a</sup>	8,99 ± 0,89	12,9 ± 1,31 <sup>ab</sup>	9,18 ± 2,22	8,4 ± 1,56	11,2 ± 2,67
	p	1787,04 ± 622,88	509,15 ± 42,56	413,64 ± 17,35 <sup>ab</sup>	392,23 ± 24,49	376,13 ± 27,97 <sup>a</sup>	347,75 ± 22,47 <sup>b</sup>	410,64 ± 24,87 <sup>a</sup>	349,47 ± 40,16	333,14 ± 33,2	391,52 ± 56,09
	c	0,2 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,06	0,91 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,04	0,89 ± 0,04	0,93 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,95 ± 0,02 <sup>b</sup>
CHH-MT-MC	a	54,24 ± 14,74	17,36 ± 3,1	15,24 ± 1,79 <sup>ab</sup>	12,04 ± 2,68	8,02 ± 1,54	9,25 ± 1,89	9,28 ± 2,04	8,35 ± 1,06	10,473 ± 1,98 <sup>ab</sup>	11,25 ± 3,41
	p	1290,76 ± 163,63	493,14 ± 43,78	450,66 ± 23,79 <sup>ab</sup>	398,79 ± 47,1	324,91 ± 32,74	346,55 ± 37,36	346,56 ± 39,53	335,12 ± 23,56	369,17 ± 29,16 <sup>ab</sup>	383,11 ± 60,32
	c	0,41 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,04	0,94 ± 0,05	0,95 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,02	0,93 ± 0,04	0,96 ± 0,05	0,94 ± 0,02 <sup>a</sup>
CEH-MT-ME	a	72,82 ± 12,82 <sup>b</sup>	15,93 ± 1,52	12,64 ± 1,15	10,98 ± 0,84	13,06 ± 1,6 <sup>ab</sup>	11,42 ± 1,72 <sup>b</sup>	10,21 ± 1,24	10,17 ± 0,74	7,78 ± 1,06	11,52 ± 2,42
	p	3188,78 ± 425,98 <sup>b</sup>	497,98 ± 46,65	469,17 ± 42,65 <sup>ab</sup>	394,89 ± 28,8	414,64 ± 22,17 <sup>ab</sup>	414,42 ± 38,01 <sup>ab</sup>	386,38 ± 26,48 <sup>a</sup>	383,15 ± 16,88 <sup>b</sup>	340,4 ± 31,81 <sup>a</sup>	412,63 ± 50,11 <sup>ab</sup>
	c	0,09 ± 0,03	0,81 ± 0,09	0,73 ± 0,12	0,89 ± 0,07	0,95 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,84 ± 0,07	0,86 ± 0,04	0,87 ± 0,05	0,84 ± 0,05	0,85 ± 0,06
CEH-MT-MC	a	70,82 ± 16,17 <sup>b</sup>	15,12 ± 1,71	13,3 ± 0,92	12,97 ± 1 <sup>a</sup>	10,7 ± 1,8 <sup>b</sup>	10,95 ± 1,46 <sup>b</sup>	9,98 ± 1,48	10,54 ± 0,65 <sup>b</sup>	7,46 ± 1,17	11,38 ± 2,36
	p	2784,23 ± 574,48 <sup>b</sup>	473,21 ± 58,86	417,59 ± 17,47	407,52 ± 17,01	370,31 ± 32,5 <sup>b</sup>	373,55 ± 23,62	361,21 ± 29,05	379,66 ± 13,64 <sup>b</sup>	314,42 ± 21,88	387,18 ± 46,65
	c	0,13 ± 0,05	0,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,98 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,96 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>a</sup>

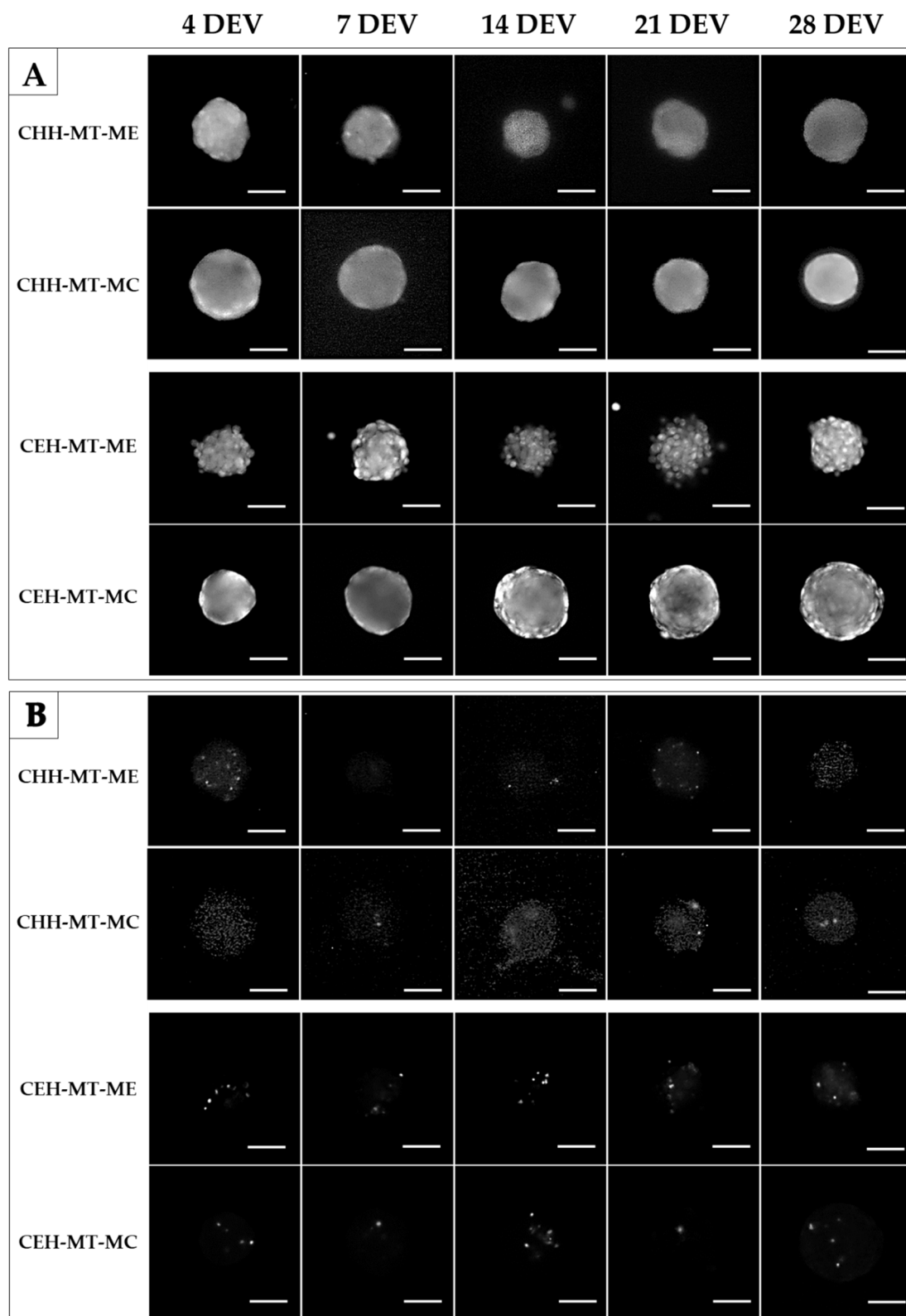
**Figura 20:** Representación gráfica del área y la circularidad de los microtejidos (MT) derivados de condrocitos humanos derivados de cartilago hialino (CHH) y elástico (CEH) para cada día de desarrollo ex vivo (DEV). Resultados cuantitativos del análisis morfométrico de los MTs derivados de condrocitos humanos (B). Los resultados se muestran como valores medios ± desviación estándar del área (a) ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ), perímetro (p) y circularidad (c) para cada grupo experimental y día de DEV. Para la prueba no paramétrica de Mann-Whitney se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Las diferencias significativas se indican como sigue: a. Diferencias entre los MTs (CHH o CEH) con ME y los MTs con su respectiva fuente celular con MC. b Diferencias entre los CHH-MTs con ME o MC y los CEH-MTs con el mismo medio de cultivo.

Al comparar los CHH-MTs frente a los CEH-MTs encontramos diferencias morfométricas en función del medio de cultivo empleado (Fig. 20). Analizando los valores globales no observamos diferencias significativas respecto al área entre MTs de diferente fuente celular pero igual medio de cultivo [CHH-MT-ME frente a CEH-MT-ME ( $p = 0,400$ ) y CHH-MT-MC frente a CEH-MT-MC ( $p = 0,318$ )]. Sin embargo, la circularidad fue significativamente mayor en los CHH-MT-ME que en CEH-MT-ME ( $p = 0,000$ ). A pesar de estos resultados, el análisis de estos parámetros mostró algunas diferencias significativas entre CHH-MT-ME frente a CEH-MT-ME a tiempos concretos, destacando la consistencia estructural de los MTs generados con CHH en comparación a los CEH (Fig. 20). La correlación de Kendall mostró una correlación positiva y significativa entre la circularidad y el tiempo de DEV en todas las condiciones experimentales ( $p < 0,05$ ), confirmando la compactación progresiva durante el desarrollo de los MTs. Además, se observó una correlación positiva y significativa entre el área, el diámetro, el perímetro y el volumen en todas las condiciones ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, los parámetros relacionados con la circularidad y las dimensiones se correlacionaron negativamente ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, la prueba de correlación de Kendall confirmó, con el avance de los días de DEV, que los MTs experimentan un proceso de compactación acompañado de un incremento de la circularidad.

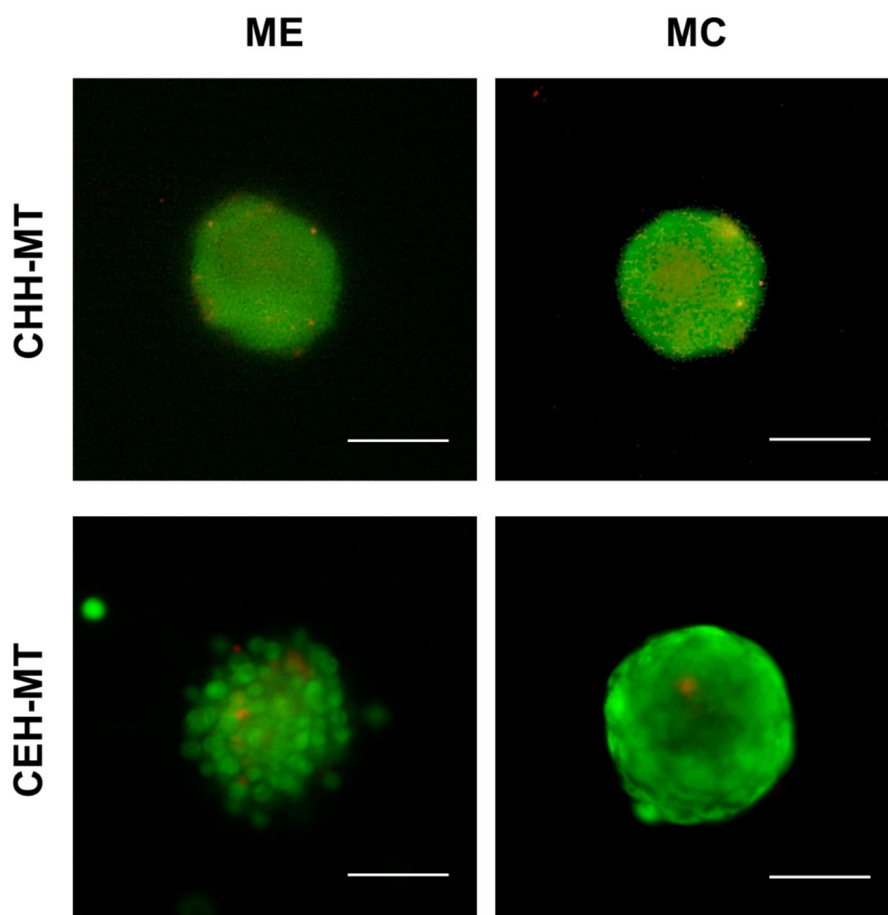
## **1.2. Evaluación de la viabilidad y función celular**

### **1.2.1. Análisis microscópico de la viabilidad celular**

Los resultados del ensayo de viabilidad celular, *Live/Dead*, revelaron que, independientemente de la fuente celular (CHH-MTs y CEH-MTs) y el medio de cultivo empleado (ME o MC), los MTs generados y evaluados durante 28 días de DEV estaban compuestos principalmente por células viables. Sin embargo, algunas células muertas fueron identificadas en los diferentes tiempos de evaluación, siendo ligeramente más abundantes en los CEH-MTs que en los CHH-MTs (Fig. 21 y 22).



**Figura 21:** Evolución temporal del ensayo Live/Dead de los microtejidos (MT) derivados de condrocitos humanos hialinos (CHH) y elásticos (CEH) bajo condiciones de expansión (ME) y condrogénicas (MC). Las imágenes se dividieron en el canal verde (A) y canal rojo (B), células viables y muertas respectivamente. Nótese que todos los MT generados están compuestas principalmente por células viables. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



**Figura 22:** Imagen representativa a mayor detalle del ensayo Live/Dead aplicado a los microtejidos (MT) derivados de condrocitos humanos hialinos (CHH) y elásticos (CEH) bajo condiciones de expansión (ME) y condrogénicas (MC). La fluorescencia verde corresponde a células viables y la roja a las muertas. Barra de escala 50  $\mu$ m.

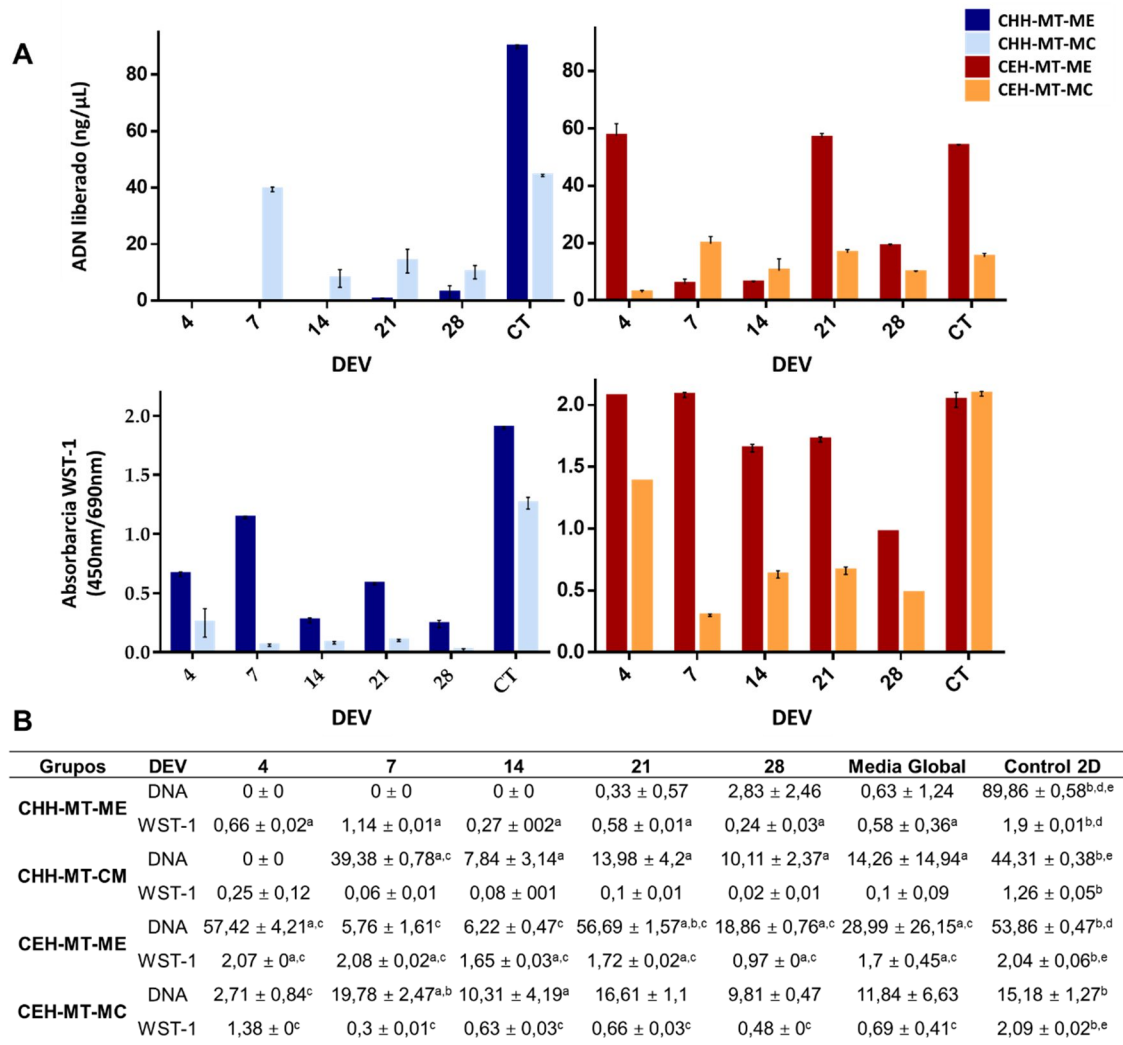
### 1.2.2. Cuantificación de ADN liberado

La cuantificación del ADN liberado al medio por las células durante la formación de los MTs o el cultivo celular 2D mostró valores variables entre grupos, controles y tiempos (Fig. 23). En términos generales, los valores medios de ADN para cada condición experimental (CHH-MTs y CEH-MTs en ME o MC) fueron inferiores a los valores medios obtenidos en sus respectivos controles 2D (Fig. 23). Tras analizar los medios de cultivo utilizados para la generación de los MTs, se observaron valores significativamente más altos con el uso de MC en comparación con ME. Por otro lado, en los microtejidos de cartílago elástico (CEH-MTs), los valores fueron generalmente más altos con ME que con MC (Fig. 23). Además, se observó que los valores de los controles en cultivos 2D con

medio de cultivo ME fueron significativamente mayores que los controles en cultivos 2D con MC. Asimismo, los controles en cultivos 2D de cartílago hialino (CHH-2D) presentaron valores más altos que los controles en cultivos 2D de cartílago elástico (CEH-2D) en ambos medios de cultivo (Fig. 23).

### **1.2.3. Determinación de la actividad metabólica**

El análisis bioquímico de la actividad metabólica celular realizado mediante el ensayo WST-1, mostró diferencias significativas entre los MTs derivados de condrocitos en función de los medios de cultivo empleados y del tipo celular. Con relación a las condiciones de cultivo, los resultados constataron que el ME permite una mayor actividad metabólica que el medio MC en ambos tipos celulares (Fig. 23), exceptuando los cultivos control de CEH-2D donde no se observaron diferencias significativas entre medios ( $p = 0,081$ ). Por otro lado, los MTs de ambas fuentes celulares demostraron menor actividad metabólica que sus respectivos controles 2D para cada tipo celular y medio (Fig. 23). En cuanto al tipo celular, los CEH-MTs exhibieron valores superiores de actividad metabólica en comparación a los CHH-MTs cultivados con sus respectivos medios. Además, pueden observarse diferencias entre los valores de actividad metabólica de los MTs mantenidos en ME en función del tiempo de desarrollo, mostrando una disminución significativa en los últimos periodos de cultivo bajo esta condición (Fig. 23). Por el contrario, la actividad metabólica de los MTs derivados de ambos tipos celulares mostró un patrón más estable en el tiempo al encontrarse bajo la influencia del MC. En la Figura 23 se recopilan los resultados y diferencias estadísticas para los valores de actividad metabólica obtenidos.

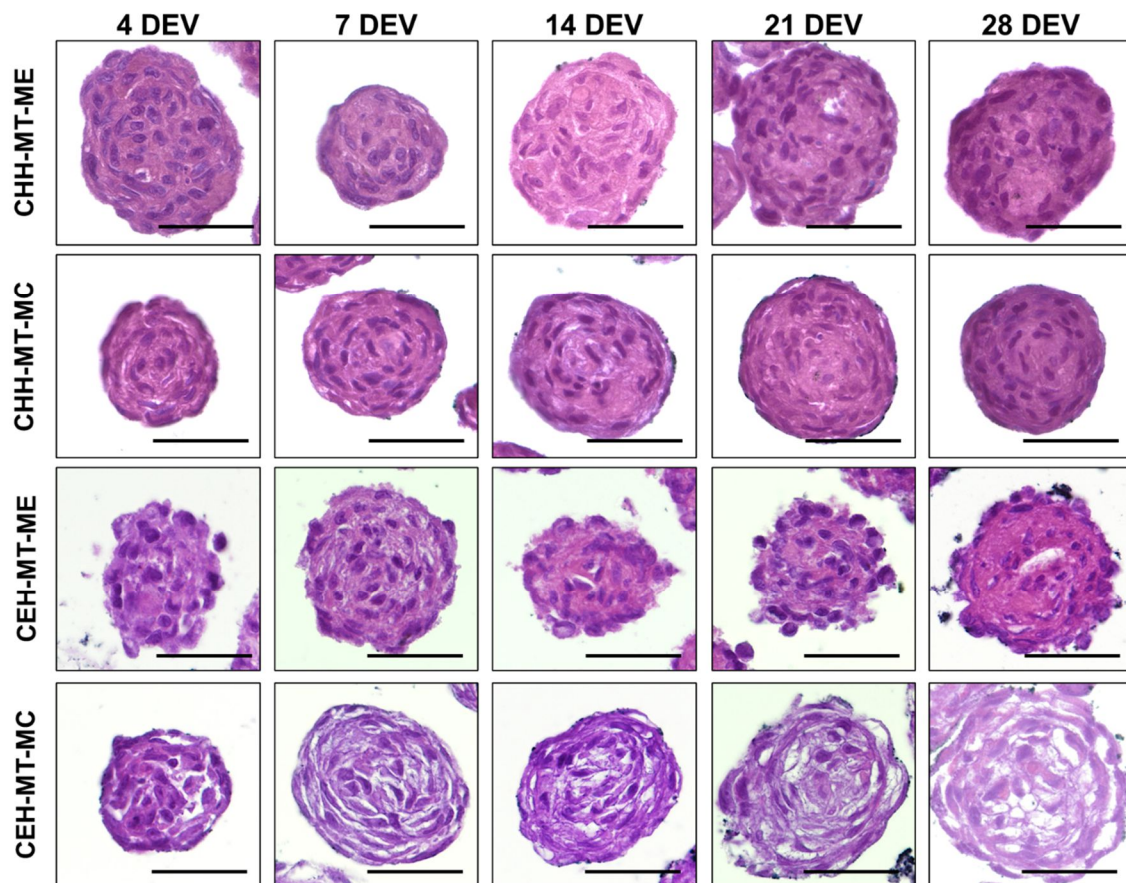


**Figura 23:** Representación gráfica de la cuantificación de ADN liberado (ng/μL) y valores del ensayo de actividad metabólica WST-1 de los MTs derivados de condrocitos humanos hialinos (CHH) y elásticos (CEH) para cada día de desarrollo ex vivo (DEV) (A). Resultados cuantitativos del ADN liberado y valores del ensayo de actividad metabólica WST-1 de los condrocitos humanos formadores de MTs para cada día de DEV (B). Los resultados se muestran como valores medios ± desviación estándar para el ADN en ng/μL y para WST-1 en absorbancia (450 nm/690 nm) de cada grupo experimental y día de DEV. En este estudio,  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo para la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Las diferencias significativas entre grupos se indican con el siguiente código; a: Diferencias entre los MTs (CHH o CEH) con ME y los MTS de su respectiva fuente celular con MC. b: Diferencias entre los MTs (CHH o CEH con ME o MC) y su respectivo control 2D de la misma fuente celular y medio de cultivo. c: Diferencias entre los CHH-MTs con ME o MC y los CEH-MTs con el mismo medio de cultivo. d: Diferencias entre el control CHH- o CEH-2D con ME y la fuente celular 2D con MC. e: Diferencias entre el control CHH-2D con ME o MC y el control CEH-2D con el mismo medio de cultivo.

### **1.3. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos**

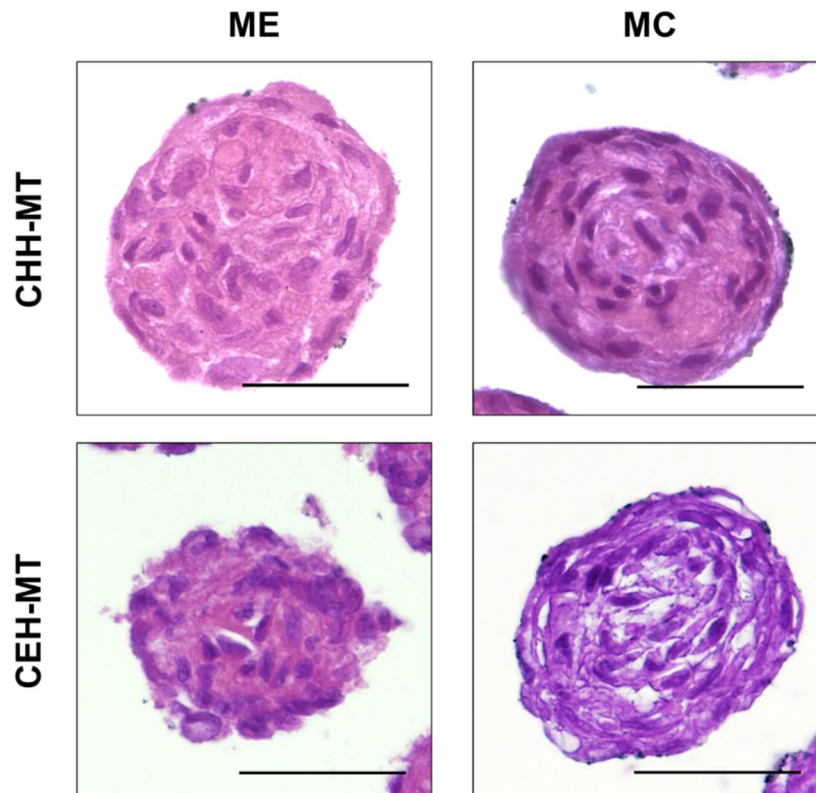
Los análisis histológicos mediante HE de los MTs derivados de condrocitos confirmaron la formación de estructuras esféricas o MTs con una distribución celular relativamente homogénea y sin signos de zonas necróticas a lo largo del tiempo con independencia del medio de cultivo empleado. Los MTs, especialmente los derivados de CHH, mostraron un comportamiento más circular y compacto, siendo sus bordes más definidos tras el uso de MC (Fig. 24 y 25). Curiosamente, la histología de los CEH-MTs reveló un comportamiento diferencial de este tipo celular en función de las condiciones de cultivo. Al encontrarse bajo condiciones de expansión, los CEH-MT-ME mostraron signos de desagregación celular superficial, con bordes irregulares, células esféricas y menor compactación en el tiempo (Fig. 24). No obstante, el cultivo de estos MTs bajo condiciones condrogénicas (CEH-MT-MC) conllevó a una mejora importante en términos de circularidad y compactación, generando MTs compuestos por condrocitos de morfología más alargada y aplanada respecto a los observados anteriormente en los CEH-MT-ME (Fig. 24 y 25). Por último, los análisis mediante HE mostraron la presencia e incremento en el tiempo de espacios extracelular entre los condrocitos formadores de los CEH-MT-MC (Fig. 24).





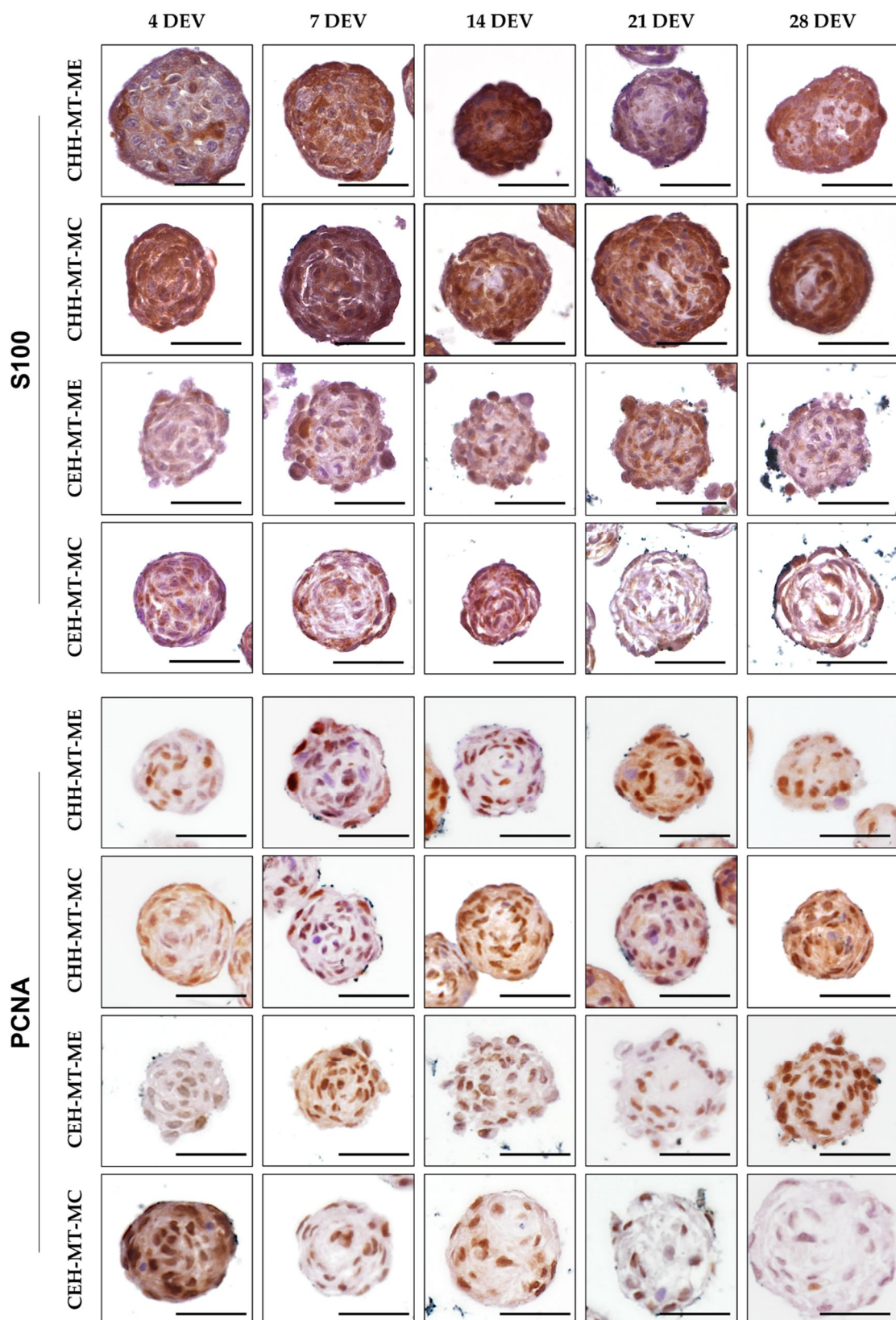
**Figura 24:** Análisis por microscopía óptica de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) de los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC) mediante la técnica de hematoxilina-eosina (HE). Barra de escala = 50  $\mu$ m.





**Figura 25:** Imagen representativa a mayor detalle los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC) mediante la técnica de hematoxilina-eosina (HE). Nótese la menor circularidad de los CEH-MT-ME y la presencia de espacios u oquedades extracelulares en el interior en los CEH-MT-MC. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

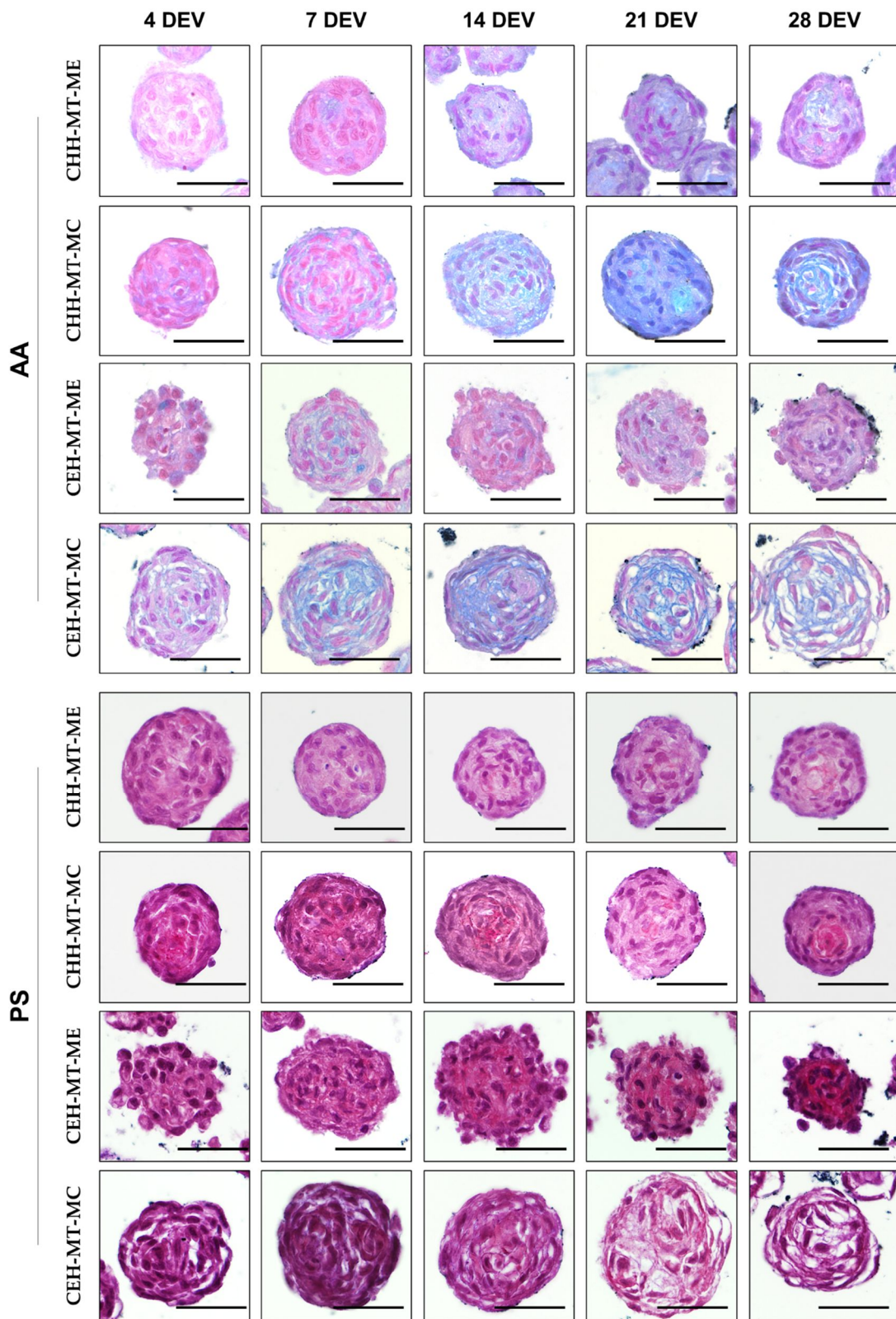
El análisis inmunohistoquímico de la proteína S-100, un marcador de condrocitos (entre otras células), mostró resultados positivos en la mayor parte de los condrocitos en los CHH-MTs durante el periodo de evaluación, no observándose diferencias entre el uso de ME o MC (Fig. 26). En el caso de los CEH-MTs, se observó que algunos condrocitos fueron positivos para la proteína S-100, siendo esta reacción menor a la observada en CHH-MTs para ambas condiciones de cultivo (Fig. 26). La evaluación de la proliferación celular durante la formación de los MTs mediante la inmunodetección del antígeno PCNA reveló la presencia de condrocitos en proliferación en todas las condiciones experimentales (Fig. 26). Al analizar la reacción en los CHH-MTs, no se encontraron diferencias evidentes entre los MTs generados con ME y los generados con MC. Estos resultados fueron similares en los CEH-MT-ME, pero en el grupo CEH-MT-MC sí se observó una disminución de la proliferación celular entre los 14 y 28 días de DEV (Fig. 26).



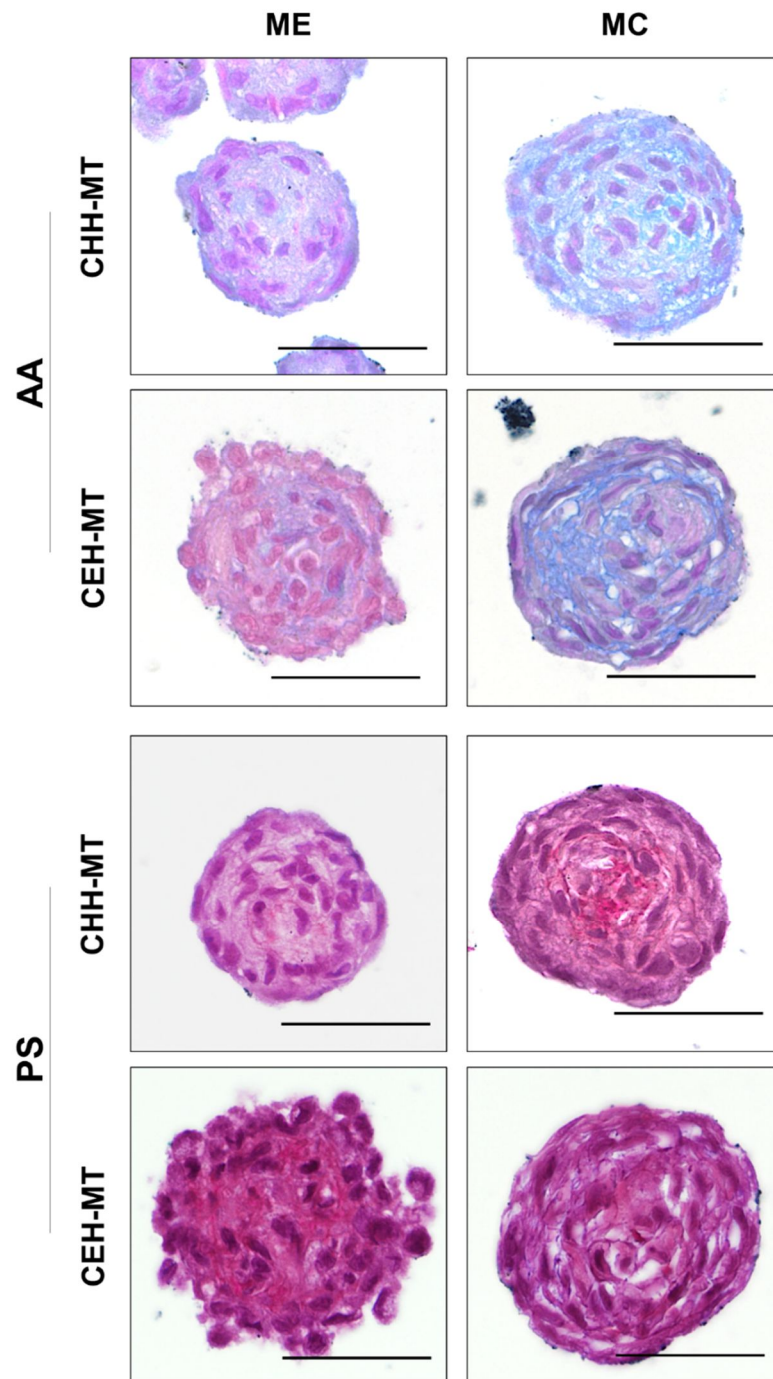
**Figura 26:** Análisis inmunohistoquímico de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) del marcador condrogénico S-100 y del antígeno de proliferación celular PCNA en los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

El estudio histoquímico de los proteoglicanos con la tinción de AA mostró diferencias importantes en la síntesis de estos componentes en función del medio de cultivo empleado. Estos análisis confirmaron que el uso de MC promueve un incremento progresivo en la síntesis de proteoglicanos por parte de los condrocitos que constituyen los CHH-MTs y los CEH-MTs en comparación a aquellos mantenidos con ME (Fig. 27 y 28). La evaluación histoquímica de los colágenos fibrilares con la técnica PS mostró algunos signos de síntesis y deposición extracelular de estos componentes en los grupos CHH-MT-MC y CEH-MT-ME. No obstante, la reacción fue menos evidente para CHH-MT-ME y CEH-MT-MC (Fig. 27 y 28). Analizando de manera específica la síntesis y deposición extracelular del colágeno del tipo II, la reacción inmunohistoquímica fue positiva en todos los grupos experimentales, siendo los MTs generados con MC los que mostraron un patrón de expresión más consistente (Fig. 29 y 30). Por otro lado, el estudio del colágeno tipo IV (elemento presente en la matriz pericelular), reveló un patrón positivo y pericelular en los CEH-MTs cultivados con ambos medios de cultivo a partir de los 7 días de DEV. En el caso de los CHH-MTs, la reacción fue débil y pobremente definida entre los 4 y los 21 días de DEV con independencia del medio de cultivo empleado. Sin embargo, la reacción fue más evidente en los CHH-MT-ME tras 28 días de DEV (Fig. 29).



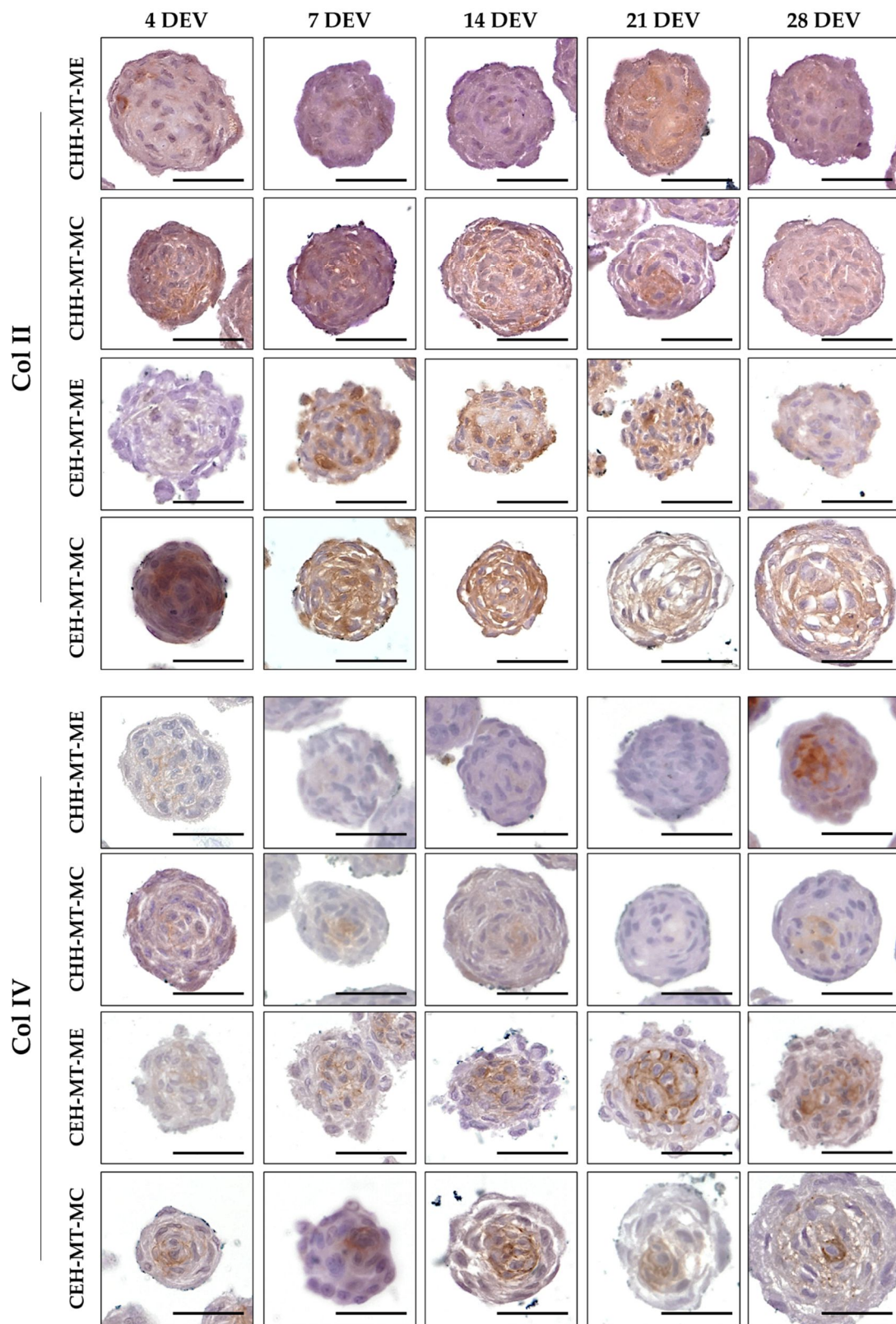


**Figura 27:** Análisis por microscopía óptica de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) de los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC) mediante los métodos de azul alcian (AA) y rojo picrosirius (PS) para la detección de proteoglucanos ácidos (teñidos de azul) y fibras colágenas (teñidas de rojo) respectivamente. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

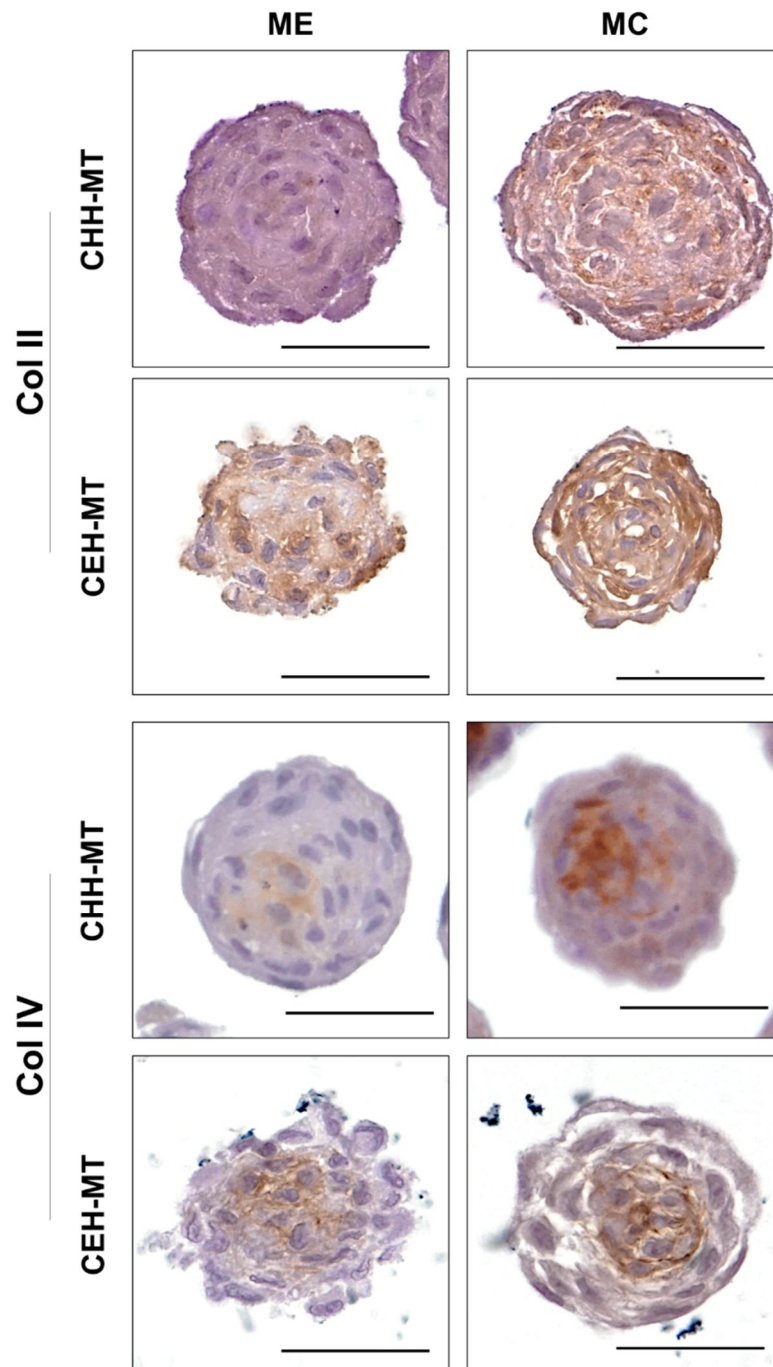


**Figura 28:** Imagen representativa a mayor detalle los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC) mediante los métodos histoquímicos azul alcian (AA) y rojo picrosirius (PS) para la detección de proteoglucanos ácidos y fibras colágenas respectivamente. Barra de escala 50  $\mu$ m.





**Figura 29:** Análisis inmunohistoquímico de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) de la expresión de los colágenos tipo II (Col II) y tipo IV (Col IV) por parte de los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC). Barra de escala = 50  $\mu$ m.



**Figura 30:** Imagen representativa a mayor detalle de la reacción inmunohistoquímica frente a los colágenos tipo II (Col II) y tipo IV (Col IV) de los microtejidos derivados de condrocitos hialinos humanos (CHH-MTs) y elásticos (CEH-MTs) bajo medio de expansión (ME) y medio condrogénico (MC). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Por último, la evaluación histoquímica de la síntesis de fibras elásticas con la tinción de orceína fue negativa en todos los grupos estudiados. Por tanto, los condrocitos derivados de cartílago elástico, capaces de producir estos componentes, no han sintetizado estas fibras en estas condiciones de cultivo (datos no mostrados).

## **2. Caracterización de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton**

### **2.1. Análisis histoquímico e inmunohistoquímico**

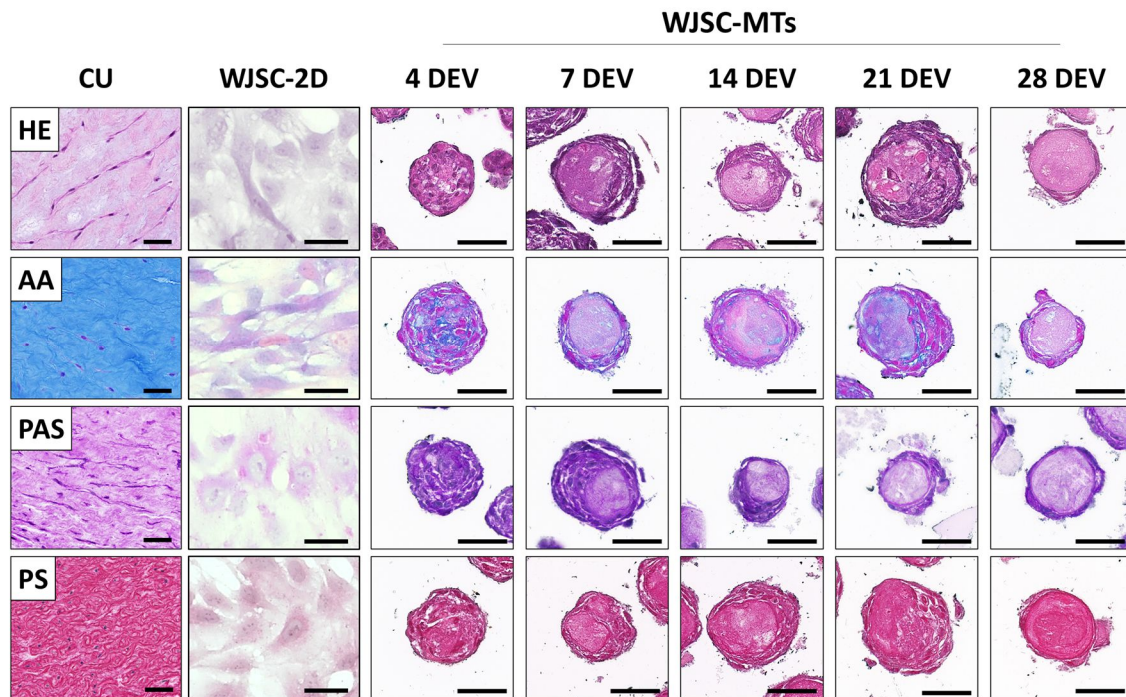
El análisis histológico mediante HE de los codones umbilicales a término confirma la presencia de células de morfología fusiforme interconectadas entre sí y con una orientación circular al cordón umbilical (Fig. 31). Por su parte, las técnicas histoquímicas AA y PS evidenciaron la presencia de gran cantidad de proteoglicanos ácidos y fibras colágenas en el estroma de la gelatina de Wharton (Fig. 31). Además, el método histoquímico de PAS reveló la existencia de gránulos citoplasmáticos y una región pericelular PAS positiva en las células del estroma de la gelatina de Wharton (Fig. 31).

Las células mesenquimales extraídas de esta región y cultivadas en 2D (WJSC-2D) mostraron capacidad de adherencia y proliferación en la superficie de cultivo. A su vez, se observó una reacción histoquímica débilmente positiva para AA y PAS, demostrando una limitada capacidad de síntesis de proteoglicanos ácidos y glucoproteínas en estas condiciones. Sin embargo, no se observó una reacción positiva para PS frente a fibras colágenas por parte de las WJSC-2D (Fig. 31).

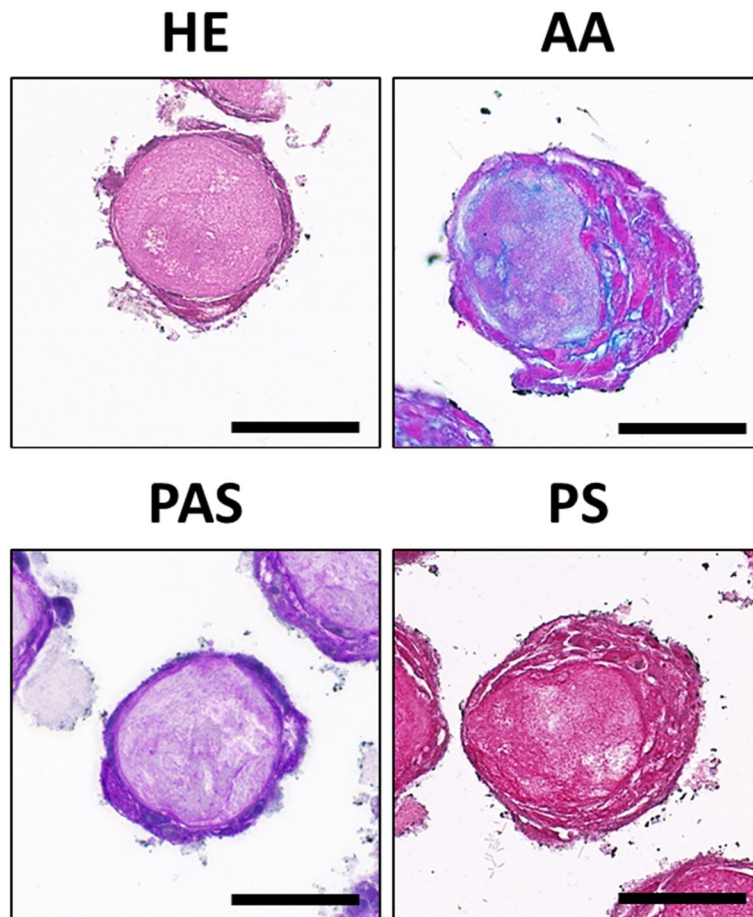
El análisis de los microtejidos derivados de estas células (WJSC-MTs) mediante HE constató la formación de una estructura 3D esférica y dinámica durante el periodo de estudio (Fig. 31). Inicialmente, a 4 días de DEV, los WJSC-MTs, mostraron una distribución celular uniforme. Sin embargo, a partir del día 7 de DEV se inició un proceso significativo de maduración de los MTs. A partir de este momento, se pudo observar una redistribución celular y notable remodelación de la MEC, lo que dio lugar a un patrón claramente diferenciado en los WJSC-MTs (Fig. 31 y 32). Estos MTs mostraron una zona periférica celular y un núcleo interno mayormente compuesto por MEC (Fig. 31 y 32). Las técnicas de AA y PAS revelaron la presencia de abundantes proteoglicanos y signos de presencia de glucoproteínas entre las células que componen los MTs. Curiosamente, se observó una redistribución de estos componentes a partir del día 7 de DEV, conformando una estructura PAS positiva de patrón pseudomembranoso



alrededor del núcleo de MEC (Fig. 31 y 32). Por otra parte, las zonas intercelulares y el núcleo de MEC mostraron una reacción débilmente positiva al método histoquímico de PS (Fig. 31 y 32).



**Figura 31:** Análisis por microscopía óptica de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJSC-MTs). A la izquierda, control in situ de la gelatina de Wharton del cordón umbilical a término (CU) y el control 2D de las WJSC (WJSC-2D). Para analizar la morfología general se utilizó la técnica histoquímica hematoxilina-eosina (HE) y los métodos de azul alcian (AA), ácido periódico-Schiff (PAS) y rojo picrosirius (PS) para analizar la síntesis de componentes específicos de la MEC. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .



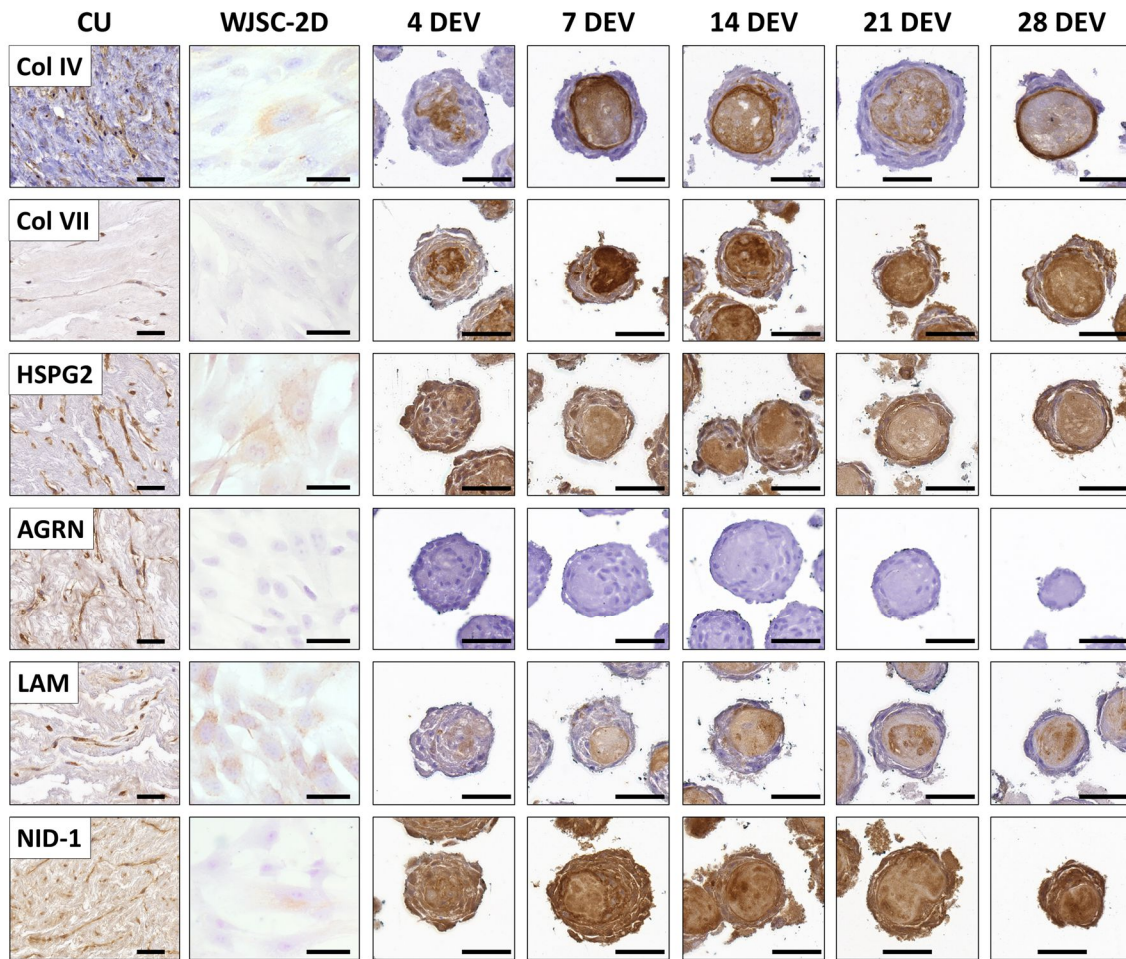
**Figura 32:** Imagen representativa a mayor detalle de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJSC-MTs) mediante los métodos histoquímicos de hematoxilina-eosina (HE) para el análisis morfológico general; azul alcian (AA), ácido periódico-Schiff (PAS) y rojo picrosirius (PS) para la síntesis de componentes específicos de la matriz extracelular (MEC). Nótese la presencia de una reacción pericelular positiva para AA y una zona PAS positiva periférica al núcleo de MEC en los WJSC-MTs. Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ .

Los análisis inmunohistoquímicos de los cordones umbilicales a término revelaron una expresión pericelular positiva para todos los componentes de membrana basal analizados. Sin embargo, los resultados de estos análisis en las WJSC demostraron diferente grado de positividad y distribución tridimensional entre las WJSC-2D y los WJSC-MT en función de las condiciones de cultivo bajo las que fueron cultivadas. En cuanto a los análisis inmunohistoquímicos concernientes a las WJSC-2D, se observó una escasa capacidad de síntesis de las principales moléculas de la membrana basal, como colágeno tipo IV y la glucoproteína nidogenina-1, mientras que se detectó una expresión ligeramente superior de HSPG2 y la glucoproteína laminina (Fig. 33).

Por el contrario, no se encontraron reacciones inmunohistoquímicas positivas para el colágeno tipo VII y el proteoglicano agrina (Fig. 33).

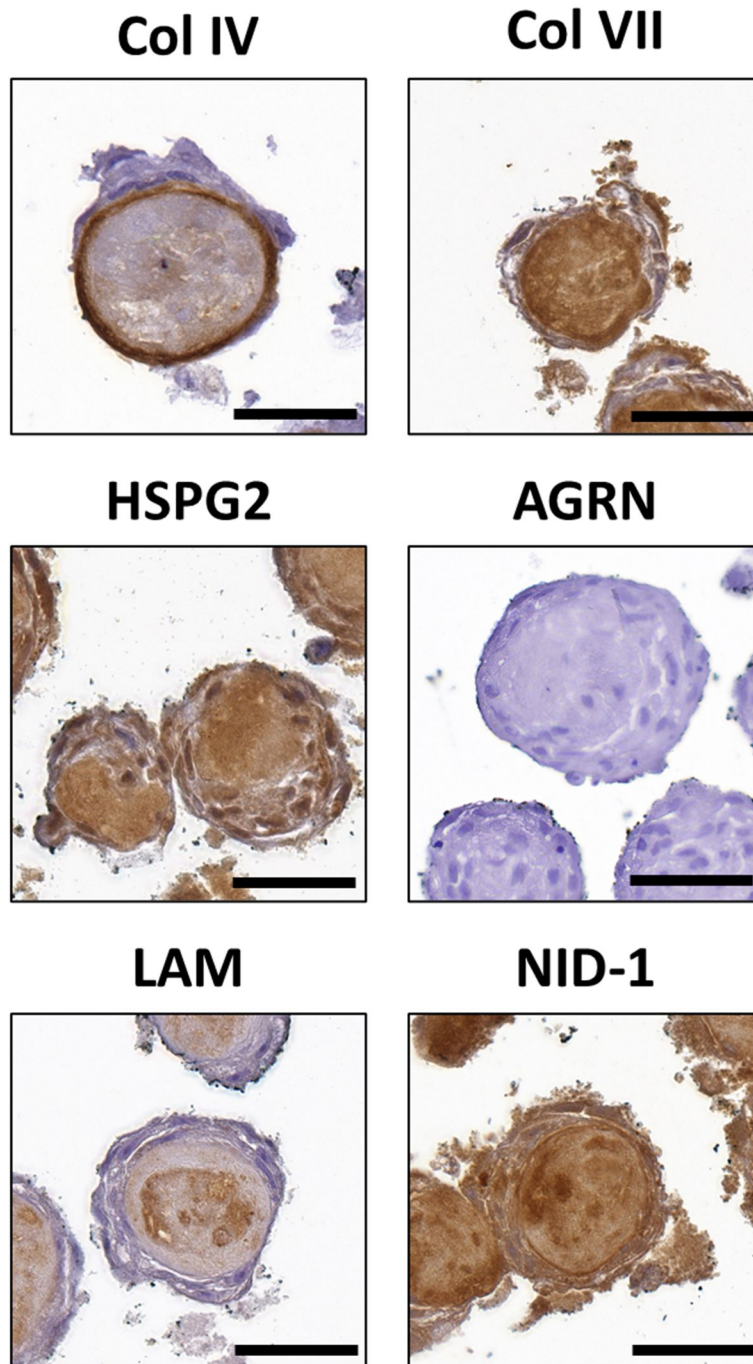
Atendiendo al perfil molecular de expresión de componentes de la membrana basal por parte de las WJSC-MT es posible apreciar un claro proceso de evolución a lo largo del tiempo. En relación con el colágeno tipo IV, inicialmente se encontró localizado de manera pericelular dentro de los MTs. Sin embargo, a partir del día 7 de DEV, la expresión del colágeno tipo IV acompañó a la formación del núcleo interno de MEC, tornándose este mismo positivo para este marcador. Además, progresó hacia un distintivo patrón membranoso que delimitaba la interfaz entre núcleo de MEC interno y las células periféricas, siendo especialmente notable a los 28 días de DEV (Fig. 33 y 34). El colágeno tipo VII mostró un comportamiento similar al del tipo IV, pero su reacción positiva fue más pronunciada y homogénea dentro del núcleo de MEC a lo largo del tiempo, no apreciándose el patrón membranoso distintivo del colágeno tipo IV (Fig. 33 y 34). Por su parte, el análisis de los proteoglicanos HSPG2 y agrina mostró claras diferencias. Mientras que el HSPG2 fue consistentemente positivo tanto a nivel pericelular como del núcleo de MEC, no se apreció una reacción positiva para AGRN en ninguno de los tiempos (Fig. 33 y 34). A su vez, también fue posible evidenciar claras diferencias entre la expresión de las glucoproteínas laminina y nidogenina-1. En el caso de la laminina, se observó una débil reacción pericelular a los 4 días de DEV para posteriormente ser localizado dentro del núcleo de MEC a partir del día 7 de DEV. Además, la laminina adoptó un patrón homogéneo en este tiempo que progresó en acúmulos positivos bien diferenciados entre los 21 y 28 días de DEV (Fig. 33 y 34). Por el contrario, la nidogenina-1 mostró una distribución positiva homogénea en todo el WJSC-MT, sin un comportamiento diferencial a nivel pericelular o del núcleo de MEC como se observó con otras moléculas (Fig. 33 y 34).

WJSC-MTs



**Figura 33:** Análisis inmunohistoquímicos de la evolución temporal durante 28 días de desarrollo ex vivo (DEV) de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJSC-MTs) para los principales componentes de la membrana basal. A la izquierda, control in situ de la gelatina de Wharton del cordón umbilical a término (CU) y el control 2D de las WJSC (WJSC-2D). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

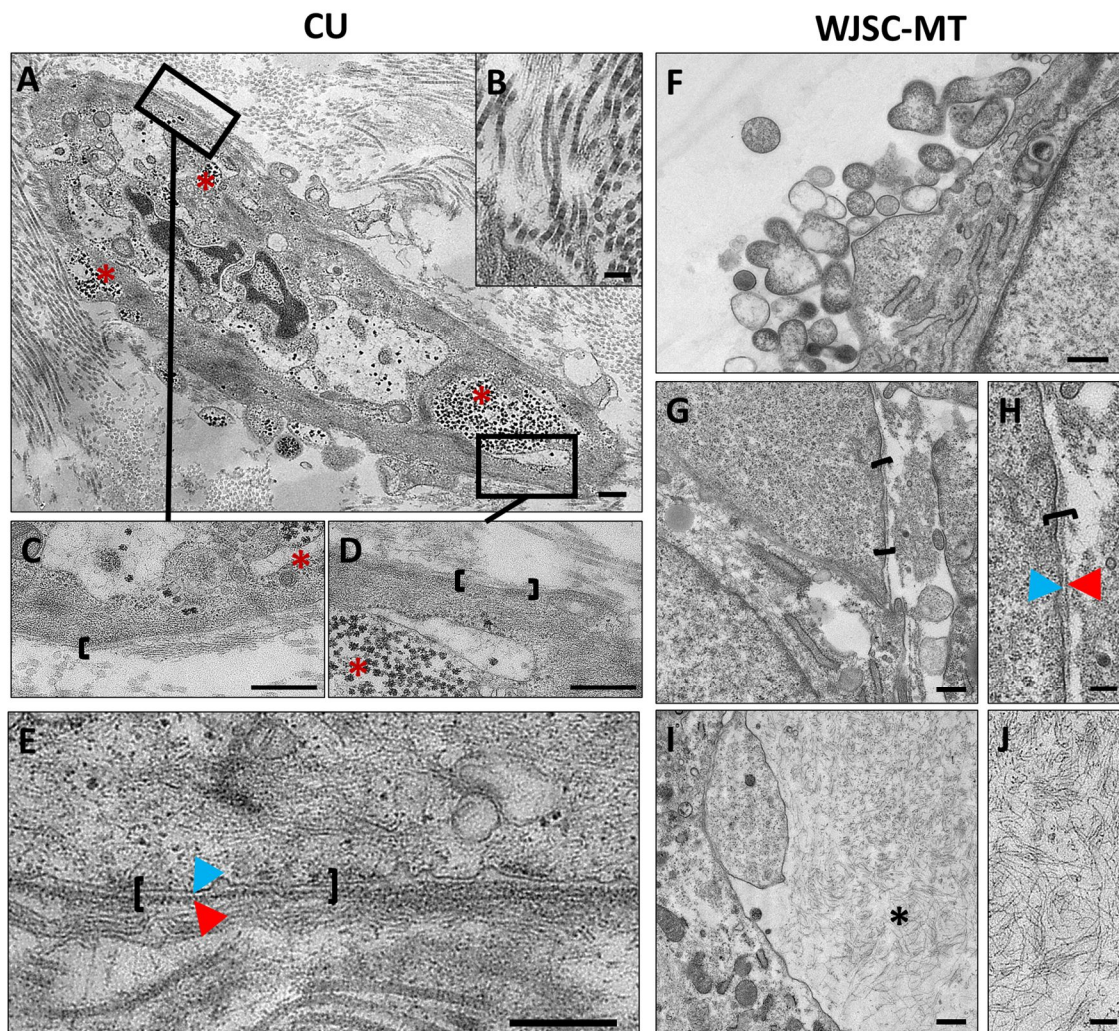




**Figura 34:** Imagen representativa de los análisis inmunohistoquímicos para determinar la expresión de los principales componentes de la membrana basal por parte de los microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton (WJSC-MTs). Barra de escala: 50 µm

## 2.2. Análisis ultraestructural

Los análisis ultraestructurales mediante MET de los CU y los WJSC-MTs revelaron la presencia de una matriz pericelular poco estructurada y de apariencia similar a las láminas basales alrededor de algunas células (Fig. 35). Además, en el caso de los WJSC-MTs, las imágenes relativas al núcleo de MEC revelaron una composición basada principalmente en moléculas fibrilares aparentemente desorganizadas, no siendo observable la presencia de fibrillas de colágena maduras (Fig. 35). Por otro lado, cabe destacar la presencia de numerosas vesículas extracelulares en la superficie de las WJSC de los MTs.



**Figura 35:** Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de las células madre humanas derivadas de gelatina de Wharton (WJSC) en el cordón umbilical (CU) a término y en los microtejidos derivados del mismo tipo celular (WJSC-MT). Se observan grandes cantidades de glucógeno intracelular (asteriscos rojos) en una imagen celular a menor aumento (A) y en zonas ampliadas de la misma

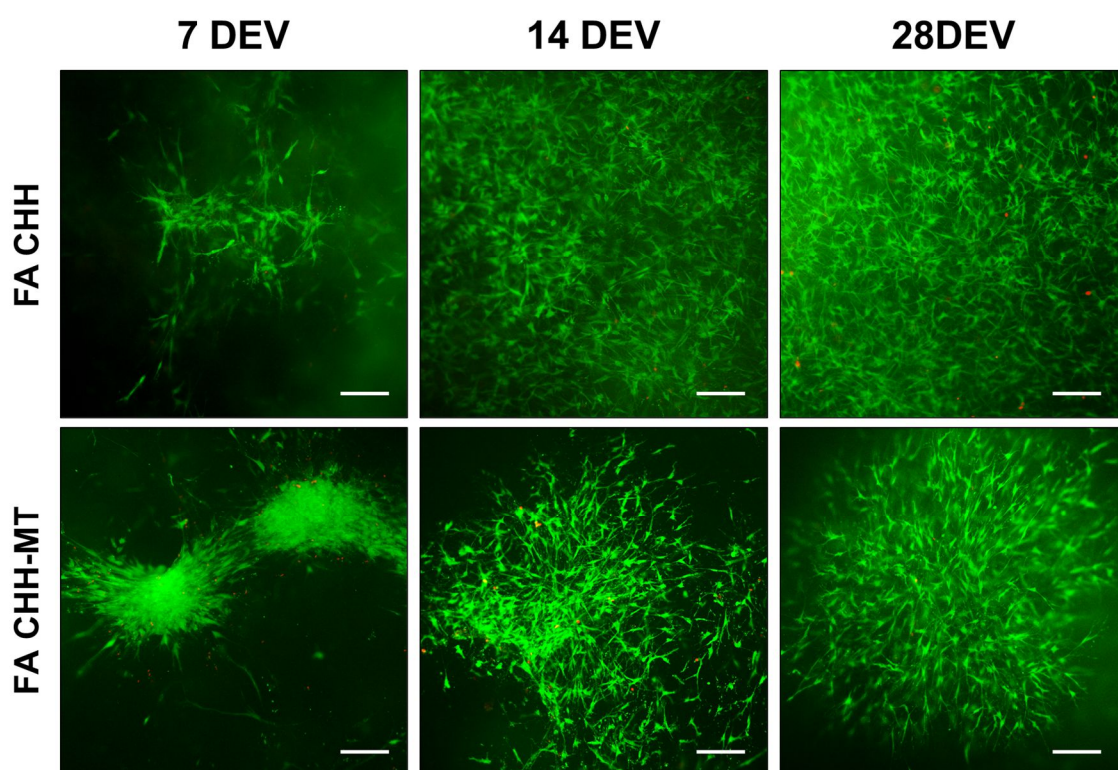
(C, D). Imagen representativa de las fibras de colágeno y los componentes no fibrilares de la MEC del CU a término (B). También se observa una estructura pericelular discontinua similar a una lámina basal (corchetes negros), compuesta por una lámina lucida (punta de flecha azul) y una lámina densa (punta de flecha roja), visible tanto en el CU a término (C-E) como en WJSC-MTs a los 4 días de desarrollo ex vivo (DEV) (G,H). Gran cantidad de vesículas extracelulares en los WJSC-MTs a los 4 días de DEV (F) y contenido no fibrilar (asterisco negro) en el núcleo de la MEC de los WJSC-MTs a los 7 días de DEV (I ,J). Escala 500 nm (A, C-G, I) y 200 nm (B,H,J).



### 3. Evaluación de los sustitutos generados mediante la combinación de MTs e hidrogeles de fibrina-agarosa.

#### 3.1 Análisis microscópico de la viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad realizados mediante el método *Live/Dead* demostraron que todos los grupos experimentales basados en hidrogeles de FA estaban compuestos por células vivas durante los 28 días de DEV evaluados, no existiendo apreciables diferencias entre la viabilidad entre los mismos (Fig. 36). Además, las imágenes por microscopia de fluorescencia revelaron un aumento de celularidad en el tiempo sin signos significativos de muerte celular. En el caso de los hidrogeles con MTs, fue posible apreciar la migración de los condrocitos formadores de MTs para colonizar el biomaterial (Fig. 36).

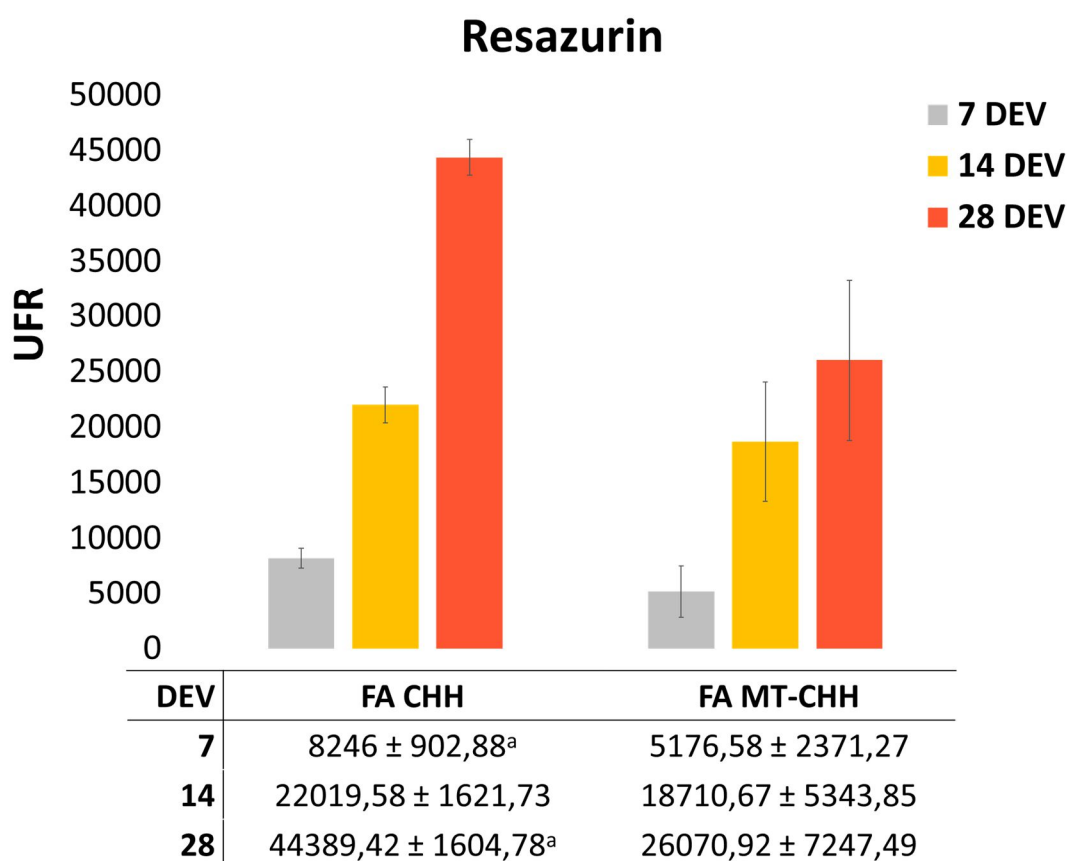


**Figura 36:** Resultados de la viabilidad celular mediante la técnica *Live/Dead* en los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). En verde se muestran las células vivas y en rojo las muertas. Barra de escala: 100  $\mu$ m.



### 3.2. Determinación de la actividad metabólica

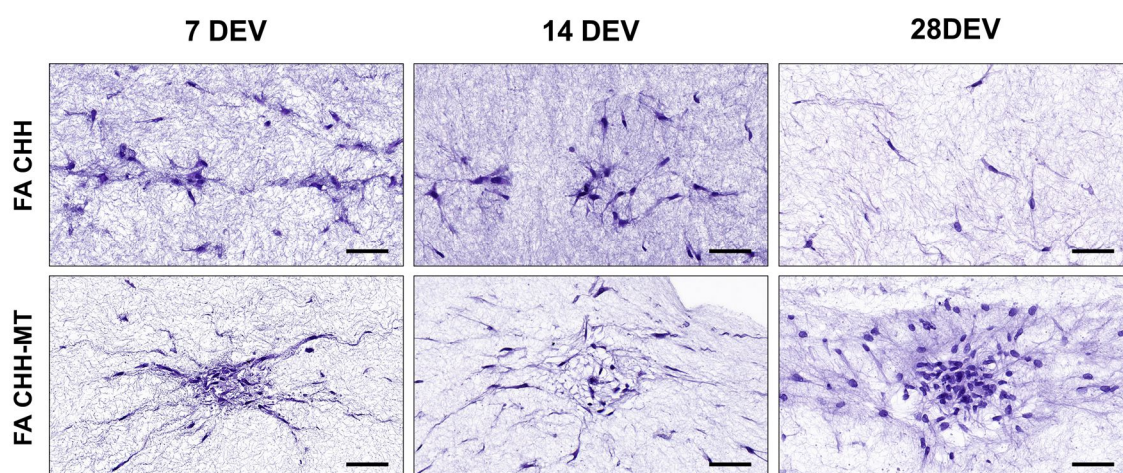
El análisis bioquímico realizado con el ensayo de resazurina confirmó la presencia de células metabólicamente activas en todos los grupos de estudio y tiempos de evaluación (Fig. 37). Analizando el perfil de desarrollo, fue posible apreciar una clara correlación positiva en el tiempo durante los 28 días de DEV, confirmando los resultados previos de viabilidad celular. Además, atendiendo a su composición, los grupos conformados por células dispersas mostraron niveles de fluorescencia para el producto de metabolismo de la resazurina significativamente superiores a los grupos con MTs en los tiempos de estudio analizados (Fig. 37).



**Figura 37:** Valores de actividad metabólica mediante el ensayo resazurina de los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Los resultados (normalizados respecto a los controles de FA acelular) se muestran en unidades relativas de fluorescencia (URF) ± desviación estándar. En este estudio,  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo para la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. a: Diferencias significativas entre los sustitutos de FA (CHH vs CHH-MT).

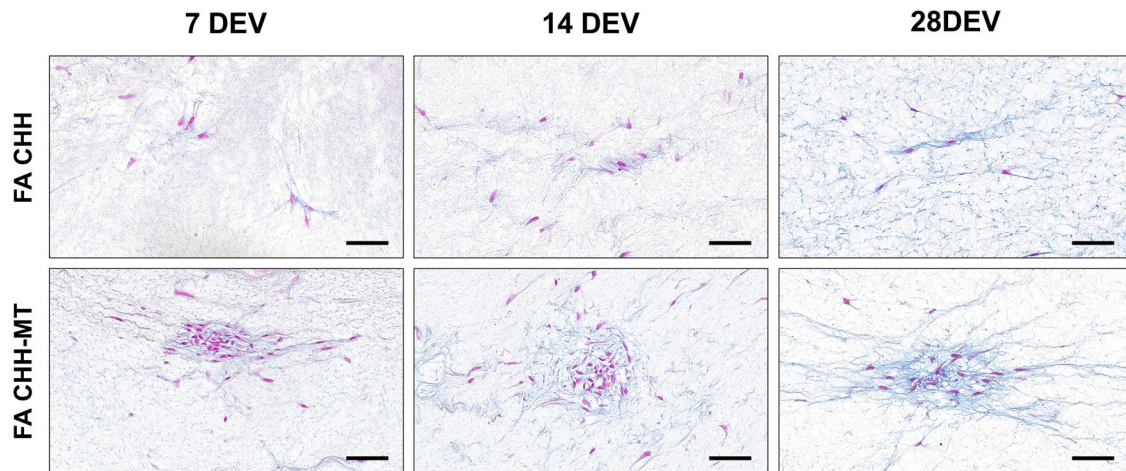
### 3.3. Análisis histológico e histoquímico

El estudio mediante HE demostró la presencia homogénea de células con morfología elongada y proyecciones citoplasmáticas hacia el interior de los hidrogeles. En el caso de los geles compuestos por MTs, las imágenes confirman la aparición de estas estructuras y su distribución a lo largo del hidrogel (Fig. 38). Estos análisis también revelan la salida e invasión del hidrogel por parte de los condrocitos que componen los microtejidos. A su vez, indicios de procesos de remodelación del hidrogel de FA y de la MEC interna de los MTs son visibles desde el primer periodo evaluado, siendo claramente aparentes en los tiempos posteriores (Fig. 38). Estos análisis confirman los hallazgos obtenidos en las pruebas de viabilidad mediante microscopia de fluorescencia.



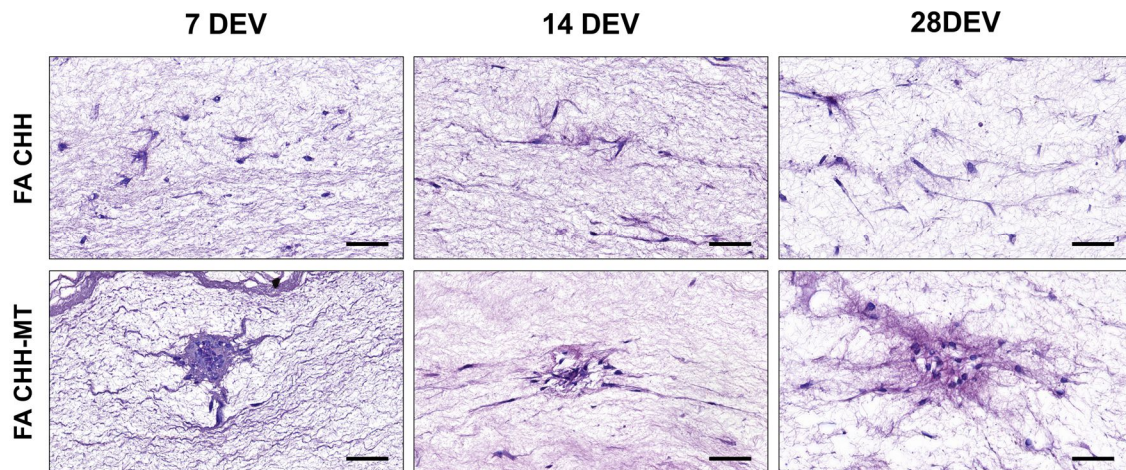
**Figura 38:** Resultados histológicos mediante hematoxilina-eosina de los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

La caracterización de los proteoglucanos y fibras colágenas sintetizados durante el desarrollo de los sustitutos reveló diferencias respecto a la conformación del componente celular aportado inicialmente. La técnica de AA permitió detectar una síntesis pericelular de proteoglucanos progresiva en el tiempo. Sin embargo, algunas diferencias fueron observadas entre grupos, existiendo una reacción AA positiva superior en el interior de los MTs en comparación a la reacción pericelular observada en los respectivos controles con células dispersas (Fig. 39).



**Figura 39:** Resultados histológicos para la detección de proteoglucanos ácidos mediante el método azul alcian de los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

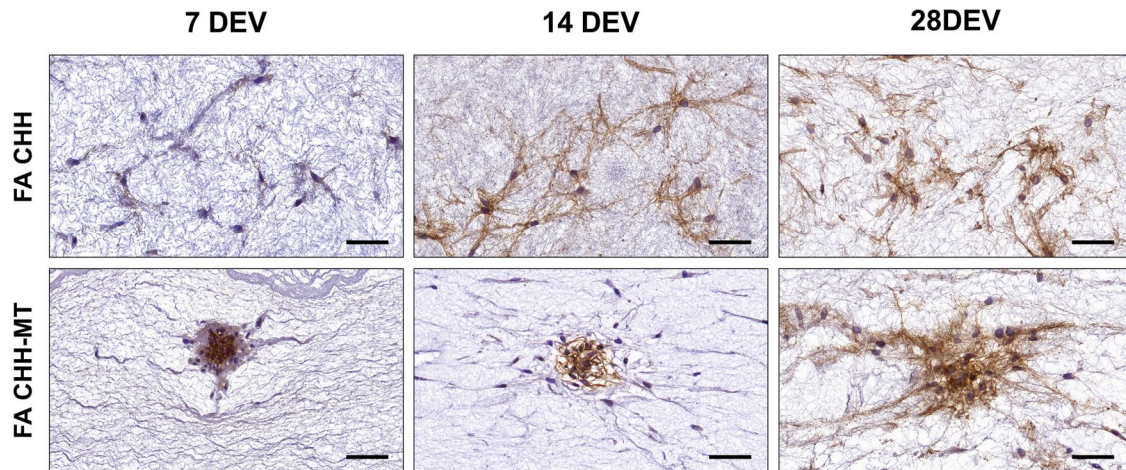
Atendiendo a la síntesis de colágenos fibrilares en los primeros estadios del estudio (Fig. 40), el método PS no reveló una respuesta favorable en ninguno de los grupos. No obstante, se pudo observar una leve respuesta positiva en el interior de los MTs después de 28 días de cultivo (Fig. 40).



**Figura 40:** Resultados histológicos para la detección de fibras colágenas mediante el método de rojo picosirius de los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Barra de escala: 50  $\mu$ m.



Por último, la determinación inmunohistoquímica del colágeno tipo IV, componente fundamental de la matriz pericelular de los condrocitos, demostró la expresión de este compuesto en el interior de los MTs de manera consistente en el tiempo (Fig. 41). Sin embargo, una menor reacción fue observada en los grupos con células dispersas, siendo esta negativa hasta los 14 – 28 días de DEV (Fig. 41).



**Figura 41:** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de colágeno tipo IV en los hidrogeles generados mediante la combinación de fibrina-agarosa (FA), condrocitos derivados de cartílago hialino humano (CHH) y microtejidos derivados de esta fuente celular (CHH-MT) a los 7, 14 y 28 días de desarrollo ex vivo (DEV). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## **VIII. DISCUSIÓN**

Los tejidos cartilagosos hialinos pueden verse afectados por patologías de diversa índole, ya sea por defectos congénitos, degenerativos, autoinmunes, neoplásicos o traumáticos [7, 24, 48]. Cabe destacar la osteoartritis, patología de carácter degenerativo y etiología multifactorial con una elevada tasa de prevalencia del 29,35% en España [62]. Además, el cartílago presenta la peculiaridad de ser avascular y de sufrir una disminución de la actividad celular condrocítica en fases adultas, características que dificultan e impiden los procesos de regeneración intrínseca ante posibles daños [4, 6, 59, 61]. Las terapias actuales no han sido capaces de lograr resultados satisfactorios a largo plazo en términos funcionales y de calidad de vida de los pacientes [73, 74]. En este contexto, varios modelos de tejidos artificiales han sido generados mediante Ingeniería Tisular (IT) para el tratamiento de estas patologías, sin embargo, los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios [49, 117, 191].

La mayor parte de las estrategias actuales de la IT pasan por el empleo de células dispersas, normalmente condrocitos, o en combinación con distintos biomateriales [49, 50, 89, 91, 119, 175]. En el apartado celular, la aplicación de los condrocitos hialinos ha sido la más ampliamente evaluada en la IT de cartílago [49, 89], debido quizás a la mayor prevalencia de las patologías asociadas a esta variedad de tejido cartilaginoso en comparación a otras. Sin embargo, es importante poner en relieve las posibles limitaciones que puede conllevar el empleo de esta fuente celular, como son el limitado número de células que pueden obtenerse de una biopsia cartilaginosa, la escasa capacidad de proliferación y la desdiferenciación condrocitaria que se produce durante el subcultivo y la expansión *ex vivo* [96, 97]. Además, cabe destacar que en términos generales los condrocitos hialinos humanos (CHH) son una variedad de células con reducida capacidad de proliferación en comparación a otras estirpes, como los fibrocondrocitos o los condrocitos elásticos (CEH) [49]. Debido a la predisposición de generar estructuras fibrosas, los fibrocondrocitos no se presentan como alternativa para la generación de estructuras hialinas [59, 98, 191, 192], por lo que no han sido evaluados en la presente Tesis Doctoral. Por el contrario, los condrocitos elásticos si presentan interesantes características como una alta capacidad de proliferación y una elevada capacidad de síntesis de componentes específicos de la matriz extracelular (MEC), como el colágeno

tipo II [193]. En este sentido, el empleo de nuevas fuentes celulares como los condrocitos elásticos u otras fuentes celulares con capacidad condrogénica, como las células madre mesenquimales, podrían suponer una alternativa interesante para solventar los problemas de proliferación celular a la vez que mantienen de una elevada síntesis de componentes de la MEC.

Estudios previos han demostrado que la generación de estructuras 3D produce un aumento en las características fenotípicas y funcionales en comparación a los cultivos celulares en 2D [194, 195]. Además, los sustitutos artificiales compuestos por células viables y funcionales en combinación con biomateriales naturales han generado mejores resultados que la aplicación de biomateriales sintéticos [91, 117, 119-121]. Entre los biomateriales naturales, en la bibliografía destaca el empleo de hidrogeles basados en elementos comunes de la MEC, como el colágeno tipo I o el ácido hialurónico. Sin embargo, cabe resaltar que estas moléculas no corresponden a los componentes distintivos del cartílago hialino, lo que puede derivar en procesos de pérdida de marcadores, formación de fibrocartílago y el fracaso de las terapias [59-61, 191]. Todo ello pone de manifiesto la vigencia del reto que supone reproducir la estructura tridimensional, la actividad biológica y la composición molecular de la MEC de los tejidos cartilagosos a la hora de generar nuevos sustitutos artificiales.

En este sentido surge la técnica de los microtejidos (MTs), una nueva alternativa para generar unidades funcionales altamente biomiméticas con diferentes aplicaciones en IT [115, 173, 196, 197]. Conformadas exclusivamente por células y las moléculas que ellas mismas producen, estas estructuras 3D aprovechan la capacidad de síntesis de moléculas de la MEC y replican con mayor fidelidad las interacciones célula-célula o célula-MEC que tienen lugar en los tejidos, suponiendo una mejora en comparación a los cultivos celulares tradicionales [115, 172, 176, 194, 195]. Entre las diferentes metodologías para generar estos MTs, destaca la técnica de los microchips de agarosa. Es un método relativamente sencillo y de bajo coste, el cual permite generar de manera controlada un elevado número de MTs con dimensiones predefinidas y uniformes, obteniendo así unidades con un alto potencial para su aplicación en IT [115, 173, 175, 198, 199].

En el campo de la IT del cartílago, trabajos previos han evidenciado la viabilidad y funcionalidad de la generación de MTs a partir de condrocitos hialinos o fibrocondrocitos [153, 175, 200-204], y de células madre mesenquimales [115, 205, 206], siempre que se proporcionen las condiciones de cultivo adecuadas. Sin embargo, es importante apuntar que multitud de estos estudios han sido realizados principalmente con fuentes celulares animales (de cerdos, vacas o roedores) [153, 201, 204], y por tanto los resultados obtenidos son de más difícil extrapolación a nuestra especie [207, 208]. Cabe señalar que estudios previos con condrocitos derivados de cartílago elástico han mostrado su capacidad para generar estructuras esféricas. Por ejemplo, mediante cultivo dinámico (en agitación), se demostró que estas células pueden agregarse y sintetizar componentes de la MEC [209] y también han demostrado resultados prometedores tras la combinación con biomateriales en la reparación de cartílago nasal [100]. Estos estudios apoyan la hipótesis de que los MTs basados en cartílago hialino o elástico podrían utilizarse indistintamente en el tratamiento de diversos defectos cartilagosos. No obstante, aún se desconoce si los condrocitos humanos derivados del cartílago elástico son una fuente celular óptima para la generación de MTs funcionales y las características de estos. Asimismo, se requiere una mayor comprensión sobre las similitudes o diferencias en las propiedades biológicas, estructurales y/o funcionales entre los MTs derivados del cartílago hialino y los derivados de cartílago elástico, especialmente cuando se generan en condiciones de expansión (ME) o cultivo condrogénico (MC) [210]. La obtención de este conocimiento podría resultar esencial para diseñar estrategias más eficaces y biomiméticas en el campo de la IT.

A este respecto, la presente Tesis Doctoral aborda, en primer lugar, la posibilidad de generar nuevos sustitutos funcionales para el tratamiento de lesiones de cartílago hialino. Para ello, se generaron y evaluaron *ex vivo* durante 28 días de desarrollo MTs derivados de cartílago hialino, cartílago elástico y células madre del cordón umbilical, siendo los dos primeros mantenidos en condiciones de expansión o condrogénicas. Posteriormente se evaluó el comportamiento y capacidad de integración de los MTs derivados de condrocitos hialinos en MC tras su incorporación en hidrogeles de fibrina-agarosa (FA). La elección de este



biomaterial está sustentada por su versatilidad y eficacia terapéutica en diferentes modelos tisulares como la piel [82, 211, 212], córnea [189, 213, 214], nervio [215, 216] y cartílago hialino y elástico [92, 178].

Mediante microscopía de contraste de fases, nuestros resultados demuestran que las dos fuentes de condrocitos humanas empleadas permiten generar MTs, observando claras diferencias en el desarrollo de estos según el tipo celular y medio empleado. Por un lado, el empleo de MC permitió generar MTs más compactos y morfológicamente estables. Por el contrario, al aplicar ME a los MTs, especialmente a los compuestos por CEH, se generaron estructuras más irregulares y con signos de desagregación y deposición de restos celulares a partir de los 14 días de DEV. Estos hallazgos fueron comparables al comportamiento de los MTs derivados de las células madre de la gelatina de Wharton [115]. Esta desagregación periférica podría estar relacionada con un aumento de integrinas dentro de los MTs, ya que algunas evidencias relacionan una menor compactación de los mismos con la expresión de estas moléculas [172]. Otra explicación puede estar en relación con la actividad metabólica y requerimientos energéticos de estos tipos celulares al conformar MTs. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran el impacto y eficiencia del MC en la estabilidad estructural y distribución celular de los MTs. Nuestros hallazgos son consistentes con el grado de compactación y circularidad obtenido con el uso de MC en MTs derivados de fibrocondrocitos porcinos [182], condrocitos hialinos bovinos [201] y microagregados de condrocitos humanos [217-219].

El impacto que podrían tener estos aspectos morfométricos observados en los MTs para su uso en IT no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo, estudios previos *in vivo* respaldan que el empleo de MTs estables mejora la eficiencia de reparación y regeneración de tejidos en comparación al uso de células en suspensión [199]. Existen indicios que sugieren la posibilidad de que el aumento de la circularidad y compactación observados en estas microestructuras 3D podría deberse a un mayor número de interacciones celulares y con la MEC. Estudios previos han demostrado que, en el interior de MTs derivados de diversas fuentes celulares, se sintetizan diversas moléculas como N-CAM, cadherinas y conexinas, que están asociadas a las interacciones

célula-célula y célula-MEC [172, 198, 220]. Estas interacciones están involucradas en procesos de agregación y compactación de los MTs, así como con las funciones celulares. A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, el uso de MC podría estimular la síntesis de algunas de estas moléculas, explicando el alto grado de compactación y estabilidad obtenido. Por otra parte, deficiencias en la expresión de estas moléculas por parte de los condrocitos han sido asociadas a diferentes estados patológicos [221-223]. En este sentido, nuevos estudios son necesarios para demostrar la síntesis de estas moléculas y su relación con el patrón tridimensional y comportamiento celular.

En cuanto a los niveles de actividad metabólica, los valores reducidos observados en los MTs podrían estar causados por el ambiente no adherente que restringe la capacidad de expansión de las células. Por el contrario, en las condiciones control, las células pueden colonizar la superficie de cultivo, aumentando la población celular y, por consiguiente, los valores metabólicos. Por otra parte, la mayor actividad de los MTs elásticos concuerda con experimentos previos que confirman una mayor tasa de actividad por parte esta fuente de condrocitos [193] y el efecto de estabilización morfológica y metabólica observada al emplear MC [182, 204]. Probablemente, la aplicación de MC favorece un estado metabólico más quiescente y diferenciado por parte de los condrocitos que forman el MT, mimetizando en mayor medida el comportamiento fisiológico de estas células en el tejido nativo [7]. Si bien el impacto de la aplicación del MC en los cultivos celulares hialinos es bien conocido, esta es la primera vez en la que se evalúan y observa un comportamiento diferencial entre MTs de origen hialino y elástico según el medio de cultivo empleado, siendo estas diferencias más evidentes en el caso de los condrocitos de origen elástico. Por lo demás, estos resultados respaldan la hipótesis de que una mayor actividad metabólica, y por ende de requerimientos energéticos, podría estar relacionada con la disgregación de los condrocitos de cartílago elástico durante la formación de los MTs.

Como se ha mencionado anteriormente, la MEC del tejido cartilaginoso es abundante, compleja, y determina las propiedades fisicoquímicas del tejido. Por esta razón, los MTs derivados de condrocitos generados en la presente Tesis

Doctoral han sido evaluados histológicamente mediante diferentes métodos de coloración. Estos análisis evidenciaron que ambas fuentes celulares empleadas para generar MTs eran capaces de producir y depositar progresivamente diversas moléculas de MEC a lo largo del tiempo, además de revelar al MC como un potenciador de su síntesis. El análisis de la expresión de la proteína S-100 demostró la idoneidad del método de los MTs para el mantenimiento del linaje celular, al igual que en estudios previos [92, 178]. Si bien este marcador no es específico de condrocitos [186], ha sido ampliamente empleado con este fin. A su vez, los CHH-MTs demostraron encontrarse en un estado de proliferación activa durante el periodo de evaluación independientemente del medio de cultivo. Curiosamente, los CEH demostraron una clara respuesta al MC durante el desarrollo del MT, con una disminución de la proliferación celular en tiempos tardíos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la aplicación del MC puede inducir un estado avanzado de diferenciación y/o quiescencia en los condrocitos, siendo la fuente celular derivada de cartílago elástico más sensible a la composición del medio de cultivo empleado. Esta cualidad se ve corroborada con los hallazgos morfométricos y metabólicos descritos previamente.

Del mismo modo, al realizar los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos de componentes de la MEC fue posible observar diferencias en función del tipo celular y medio de cultivo aplicado. Los MTs derivados de condrocitos mostraron un incremento en la síntesis de proteoglicanos tras el uso de MC respecto al ME, siendo esta mejora más evidente en los CEH-MT a tiempos tempranos, confirmando la mayor sensibilidad de estas células al medio de cultivo. De nuevo, nuestros resultados confirman la utilidad del MC para promover la diferenciación condrogénica y, en especial, para incrementar la síntesis de proteoglicanos. Sin embargo, el análisis de la síntesis de colágenos fibrilares no reveló una respuesta tan evidente. Esto se puede relacionar con el estado de maduración de la MEC, ya que en una primera instancia se sintetizan las moléculas no fibrilares de la MEC y luego ocurre el ensamblaje y organización de las fibras [39]. Al ser un proceso complejo y multifactorial, el período de estudio es insuficiente para observar la maduración de estos componentes *ex vivo*.

Por otra parte, el método de la orceína para la identificación de fibras elásticas maduras no arrojó resultados positivos en el caso de las CEH-MTs. Similar a lo que ocurre con las fibras colágenas, los precursores de estas fibras (tropoelastina y fibrilina) son secretados extracelularmente donde tendrá lugar la polimerización y ensamblado de las fibras maduras. Es un proceso lento, dependiente de la concentración de monómeros y de otros componentes de la MEC [224]. Experimentos previos empleando este tipo celular encapsulado en hidrogeles nanoestructurados de FA demostraron la síntesis de estos componentes *in vitro* [92] pero no de manera consistente (asociado a agrupaciones celulares). Estos resultados sugieren que las condiciones generadas en la MEC de los CEH-MTs pueden no alcanzar el ambiente necesario para la síntesis y/o polimerización de las fibras elásticas maduras. Nuevos análisis para determinar la presencia de posibles precursores de fibras elásticas en los MTs o la posibilidad de incorporar estas estructuras a biomateriales son necesarios para determinar la capacidad *ex vivo* de los CEH-MTs para producir estos componentes.

Continuando la línea de resultados, el estudio de la síntesis de colágeno tipo II, molécula característica de los cartílagos hialino y elástico, reveló un patrón positivo y homogéneo en todos los grupos analizados, siendo ligeramente superior en los grupos mantenidos con MC. Teniendo en cuenta la escasa reactividad observada en los MTs con el método rojo picrosirius (que permite la identificación de colágenos tipo I y tipo III principalmente), podemos concluir que estas células poseen la capacidad de sintetizar la principal molécula de la matriz cartilaginosa, el colágeno del tipo II. El colágeno del tipo I está descrito en la matriz cartilaginosa hialina y elástica, pero en una proporción muy baja [19]. Por lo tanto, estos resultados apoyan un adecuado perfil de diferenciación de las células durante el proceso de formación de los MTs, especialmente cuando se utiliza MC.

En la IT de cartílago, el colágeno tipo IV no es frecuentemente evaluado. Sin embargo, desempeña un papel esencial en la capsula pericelular de los condrocitos [19]. Su expresión es crucial, ya que deficiencias en esta molécula se han asociado con procesos patológicos [42]. Por esta razón, su identificación

podría ayudar a determinar si en los MTs se están formando estructuras relacionadas con la capsula o matriz pericelular. Atendiendo a los resultados, los MTs fueron capaces de expresar este componente de manera independiente al medio de cultivo empleado. Sin embargo, si se observaron claras diferencias en el nivel de expresión según el tipo celular, mostrando los CEH-MTs una mayor síntesis de estos componentes durante todo el periodo de desarrollo. Interesantemente, se observó un distintivo patrón pericelular en las células internas de los MTs que sugiere el establecimiento de una matriz pericelular a los condrocitos (elásticos principalmente). Estos resultados destacan la importancia del sistema de cultivo tridimensional. Sin embargo, el proceso de generación de matriz pericelular *ex vivo* por los MTs sigue siendo poco conocido y más estudios se presentan necesarios para que sea esclarecido. Además, la formación de esta matriz tiene un claro rol biomecánico, y es probable que sea necesario incluir estímulos físicos para inducir o potenciar la síntesis de estos componentes [156-158].

Los datos morfométricos, metabólicos e histológicos obtenidos en la presente Tesis Doctoral confirman que el uso de MC favorece la diferenciación condrogénica durante el proceso de formación y desarrollo *ex vivo* de los MTs derivados de condrocitos. Asimismo, los resultados reflejan que no todas las fuentes de condrocitos presentan el mismo comportamiento en cultivo, revelando a los CEH como una fuente celular con mayor sensibilidad al MC. Estos hallazgos subrayan la relevancia de considerar las particularidades de cada tipo celular al desarrollar estrategias de IT, a la vez que enfatizan la necesidad de evaluar meticulosamente el impacto de los medios de cultivo para alcanzar resultados óptimos en la generación de MTs. Las estructuras celulares tridimensionales generadas han demostrado su estabilidad y funcionalidad, al tiempo que exhiben un alto nivel de similitud con los tejidos naturales. Como resultado, ofrecen una valiosa contribución al enriquecimiento del potencial regenerativo de las terapias existentes ya que proporcionan moléculas esenciales que pueden mejorar significativamente la eficacia de las intervenciones terapéuticas actuales. Sin embargo, alcanzar una completa diferenciación cartilaginosa *ex vivo* sigue siendo un reto vigente. Todavía es necesario evaluar el comportamiento de todos los MTs aquí generados en

combinación con otras técnicas de biofabricación, como el mantenimiento en condiciones de cultivo hipóxicas y/o bajo estimulación mecánica, ya que estas técnicas también han mostrado resultados positivos en este sentido [92, 153, 155-158].

Interesantemente, los resultados positivos para la expresión del colágeno tipo IV, coincidieron con la expresión positiva de esta molécula en estudios previos del grupo de Investigación en el que se desarrollaron MTs con similar metodología en conjunción con células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton (WJSC) [115]. La expresión de este componente, primordial en el establecimiento de la capsula pericelular, plantearon la hipótesis de poder emplear los MTs derivados de células mesenquimales del cordón umbilical como generadores de estructuras basales con posible aplicación a la IT de cartílago u otros tejidos. Por esta razón, se procedió a generar y evaluar la capacidad de expresión de componentes de MEC y membrana basal en dichos WJSC-MTs. Es importante destacar que, además del rol fundamental en términos biomecánicos y de transmisión de señales en la capsula pericelular de los condrocitos [31], estos componentes también se encuentran en las membranas basales de otros tejidos, como la piel, la córnea, los vasos sanguíneos y el tejido renal, y en las láminas basales o láminas externas localizadas en las células de Schwann, células perineurales y las fibras musculares [39, 40, 225]. El hecho de que estos componentes se encuentren presentes en diferentes tejidos del cuerpo resalta aún más su importancia en el mantenimiento adecuado de la estructura y función tisular. Por lo tanto, la expresión de estos componentes en los MTs derivados de células mesenquimales del cordón umbilical los convierte en candidatos prometedores para la biofabricación de sustitutos artificiales de dichos tejidos.

Los análisis histoquímicos revelaron la evolución interna de los MTs durante 28 días de DEV. La distribución celular cambió de homogénea a periférica, y los componentes de la MEC mostraron una expresión inicial pericelular positiva a azul alcian y PAS, reorganizándose estos componentes alrededor de un núcleo de MEC generado durante el desarrollo del MT. Además, los análisis inmunohistoquímicos revelaron la expresión del colágeno tipo IV en un patrón

membranoso, confirmando hallazgos previos con el mismo tipo celular [115]. Sin embargo, la expresión del resto de componentes fundamentales de las membranas basales no replicó el mismo patrón, viendo localizada su expresión en los MTs de manera generalizada o localizada exclusivamente en el interior del núcleo de MEC. En cambio, las WJSC del cordón nativo si demostraron la síntesis pericelular de todos estos componentes. Sin embargo, hay que poner en relieve la utilidad de la técnica de los MTs para la preservación de la expresión de estos componentes, ya que análisis en paralelo demostraron una reducción significativa en la expresión de estos componentes en cultivos tradicionales 2D, coincidiendo con experimentos previos en los que la generación de estructuras 3D mejora a los cultivos 2D [176, 194, 226].

Los hallazgos histológicos se ven respaldados por los análisis ultraestructurales mediante MET, al revelar estos la presencia de una fina y discontinua estructura pericelular similar a una lámina lucida y una lámina densa rodeando tanto a las WJSC del cordón como a las formadoras de MTs. Estas estructuras se asemejan a las láminas basales encontradas en otros tipos celulares [54]. Observando el núcleo de MEC generado durante el desarrollo de los MTs, las imágenes obtenidas de los WJSC-MTs a los 7 días de DEV muestran la presencia de material fibrilar aparentemente poco organizado y ausencia de fibras colágenas en su interior. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente mediante inmunohistoquímica y sugieren de nuevo la capacidad de estas células para sintetizar componentes de membrana basal. Sin embargo, estas moléculas no han adquirido en los MTs la compleja organización observada en las membranas basales de otros tejidos [39, 40, 225]. En el organismo, el proceso de generación de la membrana basal está iniciado por la interacción célula-laminina. Este paso es continuado por la polimerización de una red de colágeno tipo IV, conformando así el armazón principal de todas las membranas basales que será posteriormente estabilizado mediante la unión de nidogenina y HSPG2 [38]. Sin embargo, también ha sido reportada la capacidad de autoensamblaje del colágeno tipo IV [38], pudiendo explicar de esta manera que solo el colágeno tipo IV, y no el resto de las moléculas, exprese el patrón membranoso observado en los WJSC-MTs. A la vista de nuestros resultados, hipotetizamos que la expresión de moléculas relacionadas con la membrana basal por parte de los

WJSC-MTs pueden verse relacionadas tanto con el crecimiento y migración celular como con el patrón 3D adquirido por las WJSC durante el proceso de desarrollo de los MTs. Por lo tanto, las diferencias observadas entre el cordón umbilical y los cultivos celulares podrían radicar en la pérdida de factores biológicos y físicos en las condiciones de cultivo 2D y 3D.

La capacidad de las WJSC para sintetizar moléculas de la membrana basal *ex vivo*, especialmente durante el desarrollo de los MTs, abre nuevas posibilidades para aplicaciones de IT. Estos componentes pueden ser vitales en tejidos como cartílago, nervios, vasos sanguíneos o piel. Como se ha mencionado anteriormente, los condrocitos están rodeados por una capsula pericelular compuesta por diversas moléculas analizadas en la presente Tesis Doctoral (como el colágeno tipo IV, la laminina, el HSPG2 y el nidógeno-1), que desempeñan importantes roles estructurales, de transmisión de señales y en procesos regenerativos [31, 227-230]. Además, estudios previos muestran prometedores resultados de esta fuente celular mesenquimal en la IT de cartílago [111, 114]. Otra posible aplicación de estos MTs mesenquimales podría ser en el campo de la IT neural. Por ejemplo, está demostrado que la composición molecular y el grosor de la lámina basal de las fibras nerviosas periféricas juegan un importante rol en la regeneración del tejido nervioso [231]. De hecho, la laminina promueve la formación de bandas de Büngner, la proliferación de las células de Schwann y la migración celular, sustentando la regeneración axonal [216, 231]. Sin embargo, experimentos futuros son necesarios para determinar la capacidad de diferenciación *ex vivo* de estas estructuras tridimensionales compuestas por células mesenquimales, así como su comportamiento al ser encapsulados en biomateriales y la eficacia terapéutica de los posibles sustitutos derivados de los mismos.

Tras la caracterización *ex vivo* de los MTs derivados de condrocitos y células madre mesenquimales generados en la presente Tesis Doctoral, se procedió a evaluar el comportamiento de los MTs, en concreto de los CHH-MT-MC tras 7 días de DEV, tras ser combinados con biomateriales de FA. Las propiedades biológicas, biomecánicas y de biocompatibilidad (*ex vivo* e *in vivo*) respaldan la elección del biomaterial de FA para estos ensayos [186, 189, 212, 213, 232]. Las



pruebas de viabilidad y función celular han demostrado la idoneidad de este biomaterial para mantener altos niveles de viabilidad y función celular de los CHH aislados o formando MTs. Estos resultados están en línea con lo observado en estudios previos llevados a cabo con estos biomateriales y células [178]. Por otro lado, el estudio histológico confirma que estas células tienen la capacidad de migrar a través del biomaterial y colonizarlo, sintetizando moléculas esenciales de la MEC como proteoglucanos y colágeno del tipo IV. Sin embargo, estos resultados son de carácter preliminar, siendo necesario realizar más estudios para confirmar la capacidad de migración celular, el índice de proliferación, así como la expresión de moléculas esenciales del tejido cartilaginoso, como la síntesis de colágeno del tipo II, ácido hialurónico y agregano. Por otro lado, el comportamiento *ex vivo* del resto de MTs generados en la presente Tesis Doctoral al ser combinados con biomateriales, así como la eficacia de los sustitutos cartilaginosos basados en los distintos MTs generados en la presente Tesis Doctoral aún debe ser preclínicamente evaluada en modelos animales de reparación y regeneración de cartílago.

En conclusión, los hallazgos de esta Tesis Doctoral respaldan las mejoras funcionales y biomiméticas alcanzadas en cultivos *ex vivo* de condrocitos hialinos, condrocitos elásticos y células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton mediante la técnica de los MTs, así como posibilidad de generar sustitutos cartilaginosos viables y funcionales a partir de MTs derivados de condrocitos hialinos e hidrogeles de FA. De esta manera, los MTs y sustitutos generados en la presente Tesis Doctoral pueden ofrecer una perspectiva prometedora para la IT, siendo necesarios futuros experimentos para evaluar con mayor precisión el potencial *ex vivo* de los MTs generados, así como la eficacia terapéutica de los posibles sustitutos derivados de los mismos en el tratamiento de lesiones de tejido cartilaginoso u otros tejidos como el nervio periférico.

## **IX. CONCLUSIONES**

# 1. Conclusiones

De los resultados alcanzados en la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral, se pueden inferir las siguientes conclusiones:

1. La metodología utilizada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, sustentada en la utilización de microchips de agarosa, condrocitos derivados de cartílagos hialino y elástico y condiciones de cultivo condrogénicas, ha permitido la generación *ex vivo* de microtejidos, tridimensionalmente estables, que reproducen, biomimética y funcionalmente, las características tisulares patognomónicas del tejido cartilaginoso hialino, sin que en la implementación del proceso se identifiquen alteraciones artefactuales significativas.
2. La utilización de la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral para la elaboración de microtejidos derivados de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, ha permitido igualmente la generación *ex vivo* de microtejidos tridimensionalmente estables, que reproducen, biomimética y funcionalmente, matrices extracelulares con los distintos componentes que la integran, incluidos los componentes moleculares de la membrana basal, y que constituyen un excelente modelo alternativo al implementado con células cartilaginosas.
3. La evaluación *ex vivo* de los constructos formados por microtejidos derivados de condrocitos hialinos, generados de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral, y el biomaterial de fibrina agarosa utilizado en los protocolos de Ingeniería Tisular, pone de relieve la biointegración temporal de ambos componentes sin que se interrumpa el programa de síntesis de los distintos elementos de la matriz extracelular que desarrollan las células vinculadas al microtejido.
4. Los modelos de microtejidos de células cartilaginosas y de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton, generados mediante la metodología desarrollada en la presente tesis doctoral, ponen de relieve

que tanto el proceso de biofabricación de los mismos como los resultados derivados de su evaluación y control de calidad, capacita a los microtejidos generados como posibles modelos de sustitutos tisulares o proveedores de matrices, aplicables a protocolos de Ingeniería Tisular, en los que se requieran dichos componentes, como ocurre en constructos esqueletógenos o conductos de distinta naturaleza, incluidos los nervios periféricos. Ello se refuerza por los resultados que se derivan de la evaluación positiva del complejo microtejido–biomaterial, especialmente con fibrina agarosa; un biomaterial cuya eficacia ha sido demostrada en los tipos de tejidos a sustituir antes citados.

# 1. Conclusions

From the results achieved in the research carried out in this Doctoral Thesis, the following conclusions can be inferred:

1. The methodology used in the development of this Doctoral Thesis, based on the use of agarose microchips, chondrocytes derived from hyaline and elastic cartilage and chondrogenic culture conditions, has allowed the generation *ex vivo* of three-dimensionally stable microtissues, which reproduce, biomimetically and functionally, the pathognomonic tissue characteristics of hyaline cartilage tissue, without significant artifactual alterations being identified in the implementation of the process.
2. The use of the methodology developed in this Doctoral Thesis for the elaboration of microtissues derived from Wharton's jelly mesenchymal stem cells has also allowed the generation *ex vivo* of three-dimensionally stable microtissues, which reproduce, biomimetically and functionally, extracellular matrices with the different components that integrate it, including the molecular components of the basement membrane, and which constitute an excellent alternative model to that implemented with cartilage cells.
3. The *ex vivo* evaluation of the constructs formed by microtissues derived from hyaline chondrocytes, generated according to the methodology developed in this doctoral thesis, and the fibrin-agarose biomaterial used in the Tissue Engineering protocols, highlights the temporary biointegration of both components without interrupting the synthesis program of the different elements of the extracellular matrix developed by the cells linked to the microtissue.
4. The microtissue models of cartilage cells and mesenchymal stem cells from Wharton's jelly, generated by means of the methodology developed in this doctoral thesis, show that both the biofabrication process and the results

derived from their evaluation and quality control, qualifies the generated microtissues as possible models of tissue substitutes or matrix suppliers, applicable to Tissue Engineering protocols, in which such components are required as occurs in skeletogenic constructs or ducts of different nature, including peripheral nerves. This is reinforced by the results derived from the positive evaluation of the microtissue-biomaterial complex, especially with agarose fibrin; a biomaterial whose efficacy has been demonstrated in the types of tissues to be replaced mentioned above.

## **X. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS**

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
2. Campos A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la Descripción Microscópica a la Ingeniería Tisular*. Real Academia Nacional de Medicina; 2004.
3. Ross MH, Pawlina W. *Histology : a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 8th edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; 2018. xvi, 1045 pages p.
4. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic histology : text & atlas*. 15th ed ed. New York: Lange Medical Books McGraw-Hill; 2018.
5. Grässel S, Aszódi A, SpringerLink (Online service). *Cartilage : Volume 1: Physiology and Development*. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer; 2016. 1 recurso en línea p.
6. Gartner LP, Hiatt JL. *Cell biology and histology*. 7th. ed ed. Baltimore: Wolters Kluwer; 2015.
7. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224.
8. Gartner LP, Hiatt JL. *Color atlas and text of histology*. 6th ed ed. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins; 2014. XVIII, 525 p. p.
9. Milaire J. Lectin binding sites in developing mouse limb buds. *Anat Embryol (Berl)*. 1991;184(5):479-88.
10. O'Sullivan J, D'Arcy S, Barry FP, Murphy JM, Coleman CM. Mesenchymal chondroprogenitor cell origin and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(1):8.
11. Decker RS, Koyama E, Enomoto-Iwamoto M, Maye P, Rowe D, Zhu S, Schultz PG, Pacifici M. Mouse limb skeletal growth and synovial joint development are coordinately enhanced by Kartogenin. *Dev Biol*. 2014;395(2):255-67.
12. Burdan F. [Development and congenital malformations of the skeleton]. *Pol Merkur Lekarski*. 2005;19(109):94-7.
13. Wehland M, Steinwerth P, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lutzenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
14. Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Guilak F. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(9):889-97.
15. Campos A. En el cincuenta aniversario de la muerte de Luis Urtubey (1962-2012). *Actualidad Médica*. 2012;97(786):4.



16. Bretaud S, Guillon E, Karppinen SM, Pihlajaniemi T, Ruggiero F. Collagen XV, a multifaceted multiplexin present across tissues and species. *Matrix Biol Plus*. 2020;6-7:100023.
17. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
18. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):247-57.
19. Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernandez V, Granados MM, Dominguez JM. 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*. 2021;22(24).
20. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods : Theory and practice*. 4th ed ed. Oxford: Scion; 2010. 606 p. p.
21. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*. 2015;42:11-55.
22. Alcaide-Ruggiero L, Cugat R, Dominguez JM. Proteoglycans in Articular Cartilage and Their Contribution to Chondral Injury and Repair Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13).
23. Sanchez-Porras D, Varas J, Godoy-Guzman C, Bermejo-Casares F, San Martin S, Carriel V. Histochemical and Immunohistochemical Methods for the Identification of Proteoglycans. *Methods Mol Biol*. 2023;2566:85-98.
24. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461-8.
25. Welsch U, Sobotta J, Deller T. *Histología : Sobotta Welsch : con la colaboración de Thomas Deller*. 3\* ed ed: Editorial Médica Panamericana; 2014. 593 p. p.
26. Zaucke F. Cartilage Glycoproteins. In: Springer, editor. *Cartilage*. 2016. p. 55-81.
27. Hewitt AT, Varner HH, Silver MH, Martin GR. The role of chondronectin and cartilage proteoglycan in the attachment of chondrocytes to collagen. *Prog Clin Biol Res*. 1982;110 Pt B:25-33.
28. Acharya C, Yik JH, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol*. 2014;37:102-11.
29. Haudenschild DR, Hong E, Yik JH, Chromy B, Morgelin M, Snow KD, Acharya C, Takada Y, Di Cesare PE. Enhanced activity of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) bound to cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem*. 2011;286(50):43250-8.

30. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:498-512.
31. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014;39:25-32.
32. Vincent TL, McClurg O, Troeberg L. The Extracellular Matrix of Articular Cartilage Controls the Bioavailability of Pericellular Matrix-Bound Growth Factors to Drive Tissue Homeostasis and Repair. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11).
33. Saini S, Wick TM. Effect of low oxygen tension on tissue-engineered cartilage construct development in the concentric cylinder bioreactor. *Tissue Eng.* 2004;10(5-6):825-32.
34. Ummarino D. Osteoarthritis: Hypoxia protects against cartilage loss by regulating Wnt signalling. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(6):315.
35. Lafont JE. Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol.* 2010;91(2):99-106.
36. Geneser F, Brüel A. Geneser histología. Primera reimpression de la 4\* edición, noviembre 2016 ed. Buenos Aires ; Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2016. 754 p.
37. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasheri A, Onnerfjord P, Bay-Jensen A. The minor collagens in articular cartilage. *Protein Cell.* 2017;8(8):560-72.
38. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2).
39. Kreis T, Vale R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2011. xix, 568 p. p.
40. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232(9):1121-9.
41. Sanchez-Porras D, Durand-Herrera D, Carmona R, Blanco-Elices C, Garzon I, Pozzobon M, San Martin S, Alaminos M, Garcia-Garcia OD, Chato-Astrain J, Carriel V. Expression of Basement Membrane Molecules by Wharton Jelly Stem Cells (WJSC) in Full-Term Human Umbilical Cords, Cell Cultures and Microtissues. *Cells.* 2023;12(4).
42. Foldager CB, Toh WS, Gomoll AH, Olsen BR, Spector M. Distribution of Basement Membrane Molecules, Laminin and Collagen Type IV, in Normal and Degenerated Cartilage Tissues. *Cartilage.* 2014;5(2):123-32.
43. Wang C, Brisson BK, Terajima M, Li Q, Hoxha K, Han B, Goldberg AM, Sherry Liu X, Marcolongo MS, Enomoto-Iwamoto M, Yamauchi M, Volk SW, Han L. Type III collagen is a key regulator of the collagen fibrillar structure

and biomechanics of articular cartilage and meniscus. *Matrix Biol.* 2020;85-86:47-67.

44. Schminke B, Frese J, Bode C, Goldring MB, Miosge N. Laminins and Nidogens in the Pericellular Matrix of Chondrocytes: Their Role in Osteoarthritis and Chondrogenic Differentiation. *Am J Pathol.* 2016;186(2):410-8.
45. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol.* 2018;71-72:40-50.
46. Hunziker EB, Lippuner K, Shintani N. How best to preserve and reveal the structural intricacies of cartilaginous tissue. *Matrix Biol.* 2014;39:33-43.
47. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials.* 1992;13(2):67-97.
48. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;87:77-95.
49. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng.* 2009;37(1-2):1-57.
50. Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis.* 2008;4(1):28-32.
51. Mow VC, Guo XE. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:175-209.
52. Saito T. The superficial zone of articular cartilage. *Inflamm Regen.* 2022;42(1):14.
53. Roberts S, Menage J, Flannery CR, Richardson JB. Lubricin: Its Presence in Repair Cartilage following Treatment with Autologous Chondrocyte Implantation. *Cartilage.* 2010;1(4):298-305.
54. Mills SE. *Histology for pathologists.* 4th ed ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2012. XXI, 1331 p. p.
55. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000;8(5):309-34.
56. Chen H, Tan XN, Hu S, Liu RQ, Peng LH, Li YM, Wu P. Molecular Mechanisms of Chondrocyte Proliferation and Differentiation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:664168.
57. Coelho CN, Kosher RA. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev Biol.* 1991;144(1):47-53.

58. Shapiro F, Forriol F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 2005;49(1):55-67.
59. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;146:289-305.
60. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995;28(5):847-64.
61. Stocum DL. *Regenerative biology and medicine*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2006. 1 online resource (x, 448 pages) p.
62. Blanco FJ, Silva-Diaz M, Quevedo Vila V, Seoane-Mato D, Perez Ruiz F, Juan-Mas A, Pego-Reigosa JM, Narvaez J, Quilis N, Cortes R, Romero Perez A, Fabregas Canales D, Font Gaya T, Bordoy Ferrer C, Sanchez-Piedra C, Diaz-Gonzalez F, Bustabad-Reyes S, en representacion del Grupo de Trabajo del Proyecto E. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2020.
63. Siciliani A, Rendina EA, Ibrahim M. State of the art in tracheal surgery: a brief literature review. *Multidiscip Respir Med*. 2018;13:34.
64. Sajjadian A, Naghshineh N, Rubinstein R. Current status of grafts and implants in rhinoplasty: Part II. Homologous grafts and allogenic implants. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(3):99e-109e.
65. Sajjadian A, Rubinstein R, Naghshineh N. Current status of grafts and implants in rhinoplasty: part I. Autologous grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(2):40e-9e.
66. Baluch N, Nagata S, Park C, Wilkes GH, Reinisch J, Kasrai L, Fisher D. Auricular reconstruction for microtia: A review of available methods. *Plast Surg (Oakv)*. 2014;22(1):39-43.
67. Vina ER, Kwoh CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(2):160-7.
68. Han S. Osteoarthritis year in review 2022: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(12):1575-82.
69. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752-7.
70. Rim YA, Nam Y, Ju JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
71. Zhang JF, Wang GL, Zhou ZJ, Fang XQ, Chen S, Fan SW. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, and Interleukins in Vertebral Cartilage Endplate. *Orthop Surg*. 2018;10(4):306-11.

72. Molnar V, Maticic V, Kodvanj I, Bjelica R, Jelec Z, Hudetz D, Rod E, Cukelj F, Vrdoljak T, Vidovic D, Staresinic M, Sabalic S, Dobricic B, Petrovic T, Anticevic D, Boric I, Kosir R, Zmrzljak UP, Primorac D. Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
73. Richter DL, Schenck RC, Jr., Wascher DC, Treme G. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sports Health.* 2016;8(2):153-60.
74. Inderhaug E, Solheim E. Osteochondral Autograft Transplant (Mosaicplasty) for Knee Articular Cartilage Defects. *JBJS Essent Surg Tech.* 2019;9(4).
75. Talesa G, Manfreda F, Pace V, Ceccarini P, Antinolfi P, Rinonapoli G, Caraffa A. The treatment of knee cartilage lesions: state of the art. *Acta Biomed.* 2022;93(4):e2022099.
76. Gill TJ, Steadman JR. Bone Marrow Stimulation Techniques: Microfracture, Drilling, and Abrasion. In: Cole BJ, Malek MM, editors. *Articular Cartilage Lesions: A Practical Guide to Assessment and Treatment.* New York, NY: Springer New York; 2004. p. 63-72.
77. Camp CL, Stuart MJ, Krych AJ. Current concepts of articular cartilage restoration techniques in the knee. *Sports Health.* 2014;6(3):265-73.
78. Williams GM, Chan EF, Temple-Wong MM, Bae WC, Masuda K, Bugbee WD, Sah RL. Shape, loading, and motion in the bioengineering design, fabrication, and testing of personalized synovial joints. *J Biomech.* 2010;43(1):156-65.
79. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10(3):569-76.
80. Paternoster JL, Vranckx JJ. State of the Art of Clinical Applications of Tissue Engineering in 2021. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022;28(3):592-612.
81. Cuende N, Rasko JEJ, Koh MBC, Dominici M, Ikonomou L. Cell, tissue and gene products with marketing authorization in 2018 worldwide. *Cytherapy.* 2018;20(11):1401-13.
82. Egea-Guerrero JJ, Carmona G, Correa E, Mata R, Arias-Santiago S, Alaminos M, Gacto P, Cuende N. Transplant of Tissue-Engineered Artificial Autologous Human Skin in Andalusia: An Example of Coordination and Institutional Collaboration. *Transplant Proc.* 2019;51(9):3047-50.
83. Rico-Sanchez L, Garzon I, Gonzalez-Andrades M, Ruiz-Garcia A, Punzano M, Lizana-Moreno A, Munoz-Avila JI, Sanchez-Quevedo MDC, Martinez-Atienza J, Lopez-Navas L, Sanchez-Pernaute R, Oruezabal RI, Medialdea S, Gonzalez-Gallardo MDC, Carmona G, et al. Successful development and clinical translation of a novel anterior lamellar artificial cornea. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(12):2142-54.

84. Cuende N, Izeta A. Clinical translation of stem cell therapies: a bridgeable gap. *Cell Stem Cell*. 2010;6(6):508-12.
85. Izeta A, Cuende N. Regulation of advanced therapies in Europe: Are we on the right track? *Cell Stem Cell*. 2023;30(8):1013-6.
86. Muller-Wille S. Cell theory, specificity, and reproduction, 1837-1870. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. 2010;41(3):225-31.
87. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, Vitale L, Pelleri MC, Tassani S, Piva F, Perez-Amodio S, Strippoli P, Canaider S. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*. 2013;40(6):463-71.
88. Campos Muñoz A. Objetivos conceptuales y metodológicos de la investigación histológica. *Educación Médica*. 2004;7(2):36-40.
89. Huang K, Li Q, Li Y, Yao Z, Luo D, Rao P, Xiao J. Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells, Stimulating Factors and Scaffolds. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):547-67.
90. Johnstone B, Alini M, Cucchiaroni M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013;25:248-67.
91. Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann Phys Rehabil Med*. 2016;59(3):139-44.
92. Garcia-Martinez L, Campos F, Godoy-Guzman C, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Garzon I, Alaminos M, Campos A, Carriel V. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol*. 2017;147(1):83-95.
93. Barbero A, Grogan S, Schafer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(6):476-84.
94. Hsieh-Bonassera ND, Wu I, Lin JK, Schumacher BL, Chen AC, Masuda K, Bugbee WD, Sah RL. Expansion and redifferentiation of chondrocytes from osteoarthritic cartilage: cells for human cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3513-23.
95. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(1):62-70.
96. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nestic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in

- surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):731-42.
97. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res.* 2005;23(2):425-32.
  98. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA, Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:19-46.
  99. Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng.* 2004;10(5-6):762-70.
  100. Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohmori K. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(6):2019-30; discussion 31-2.
  101. Pittenger MF, Discher DE, Peault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med.* 2019;4:22.
  102. Garcia-Bernal D, Garcia-Arranz M, Yanez RM, Hervas-Salcedo R, Cortes A, Fernandez-Garcia M, Hernando-Rodriguez M, Quintana-Bustamante O, Bueren JA, Garcia-Olmo D, Moraleda JM, Segovia JC, Zapata AG. The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells: Controversies, Unresolved Issues and Some Promising Solutions to Improve Their Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:650664.
  103. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, Svinarich D, Dodds R, Govind CK, Chaudhry GR. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(9):1738-55.
  104. Yamasaki S, Mera H, Itokazu M, Hashimoto Y, Wakitani S. Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies. *Cartilage.* 2014;5(4):196-202.
  105. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003. *J Clin Pathol.* 2005;58(4):406-8.
  106. Zha K, Li X, Yang Z, Tian G, Sun Z, Sui X, Dai Y, Liu S, Guo Q. Heterogeneity of mesenchymal stem cells in cartilage regeneration: from characterization to application. *NPJ Regen Med.* 2021;6(1):14.
  107. Ma T, Sun J, Zhao Z, Lei W, Chen Y, Wang X, Yang J, Shen Z. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):124.
  108. Mazini L, Ezzoubi M, Malka G. Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart

and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):1.

109. Danisovic L, Varga I, Polak S, Ulicna M, Hlavackova L, Bohmer D, Vojtassak J. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28(1):56-62.
110. Kim HJ, Im GI. Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res.* 2009;27(5):612-9.
111. Yang J, Zhao Y, Fan L, Gao C, Liu X, Jing X, Zhang H, Huang Y, Guo R, Long C, Guo Q, Liu J. Cartilage Injury Repair by Human Umbilical Cord Wharton's Jelly/Hydrogel Combined with Chondrocyte. *Tissue Eng Part C Methods.* 2023;29(3):110-20.
112. Garzon I, Miyake J, Gonzalez-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sanchez-Quevedo Mdel C, Campos A, Alaminos M. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(8):625-32.
113. Alfonso-Rodriguez CA, Gonzalez-Andrades E, Jaimes-Parra BD, Fernandez-Valades R, Campos A, Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Garzon I. Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord Wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes. *Histol Histopathol.* 2015;30(11):1321-32.
114. Park D, Choi YH, Kang SH, Koh HS, In Y. Bone Marrow Aspirate Concentrate versus Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells for Combined Cartilage Regeneration Procedure in Patients Undergoing High Tibial Osteotomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(3).
115. Durand-Herrera D, Campos F, Jaimes-Parra BD, Sanchez-Lopez JD, Fernandez-Valades R, Alaminos M, Campos A, Carriel V. Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(4):379-93.
116. Jha BS, Farnoodian M, Bharti K. Regulatory considerations for developing a phase I investigational new drug application for autologous induced pluripotent stem cells-based therapy product. *Stem Cells Transl Med.* 2021;10(2):198-208.
117. Armiento AR, Stoddart MJ, Alini M, Eglin D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomater.* 2018;65:1-20.
118. Duarte Campos DF, Drescher W, Rath B, Tingart M, Fischer H. Supporting Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Cartilage.* 2012;3(3):205-21.



119. Gu Z, Wang J, Fu Y, Pan H, He H, Gan Q, Liu C. Smart Biomaterials for Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Advanced Functional Materials*. 2023;33(10):2212561.
120. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*. 2013;3(3).
121. Eldeeb AE, Salah S, Elkasabgy NA. Biomaterials for Tissue Engineering Applications and Current Updates in the Field: A Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23(7):267.
122. Witherel CE, Ababayehu D, Barker TH, Spiller KL. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(4):e1801451.
123. Reis LA, Chiu LL, Feric N, Fu L, Radisic M. Biomaterials in myocardial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(1):11-28.
124. Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life*. 2019;12(3):225-9.
125. Xue J, Qin C, Wu C. 3D printing of cell-delivery scaffolds for tissue regeneration. *Regen Biomater*. 2023;10:rbad032.
126. Hu S, Yi Y, Ye C, Liu J, Wang J. Advances in 3D printing techniques for cartilage regeneration of temporomandibular joint disc and mandibular condyle. *Int J Bioprint*. 2023;9(5):761.
127. Sadeghianmaryan A, Naghieh S, Yazdanpanah Z, Alizadeh Sardroud H, Sharma NK, Wilson LD, Chen X. Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2022;204:62-75.
128. Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Chao PH, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng*. 2000;122(3):252-60.
129. Nebelung S, Gavenis K, Luring C, Zhou B, Mueller-Rath R, Stoffel M, Tingart M, Rath B. Simultaneous anabolic and catabolic responses of human chondrocytes seeded in collagen hydrogels to long-term continuous dynamic compression. *Ann Anat*. 2012;194(4):351-8.
130. Pulkkinen HJ, Tiitu V, Valonen P, Jurvelin JS, Rieppo L, Toyras J, Silvast TS, Lammi MJ, Kiviranta I. Repair of osteochondral defects with recombinant human type II collagen gel and autologous chondrocytes in rabbit. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(3):481-90.
131. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices

- implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 1998;19(24):2313-28.
132. Lin Y, Chen S, Liu Y, Guo F, Miao Q, Huang H. A composite hydrogel scaffold based on collagen and carboxymethyl chitosan for cartilage regeneration through one-step chemical crosslinking. *Int J Biol Macromol*. 2023;226:706-15.
  133. Lind M, Larsen A, Clausen C, Osther K, Everland H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16(7):690-8.
  134. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng*. 2006;12(5):1151-68.
  135. Westreich R, Kaufman M, Gannon P, Lawson W. Validating the subcutaneous model of injectable autologous cartilage using a fibrin glue scaffold. *Laryngoscope*. 2004;114(12):2154-60.
  136. Sims CD, Butler PE, Cao YL, Casanova R, Randolph MA, Black A, Vacanti CA, Yaremchuk MJ. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101(6):1580-5.
  137. Chen S, Zhang Q, Nakamoto T, Kawazoe N, Chen G. Gelatin Scaffolds with Controlled Pore Structure and Mechanical Property for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(3):189-98.
  138. Park YB, Ha CW, Lee CH, Yoon YC, Park YG. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(2):613-21.
  139. Lee J, Lee SH, Kim BS, Cho YS, Park Y. Development and Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Hybrid Bio-Ink for Tissue Regeneration. *Tissue Eng Regen Med*. 2018;15(6):761-9.
  140. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med*. 2019;4(1):83-95.
  141. Urtaza U, Guaresti O, Gorrionogitia I, Zubiarraín-Laserna A, Muinos-Lopez E, Granero-Molto F, Lamo de Espinosa JM, Lopez-Martinez T, Mazo M, Prosper F, Zaldua AM, Anakabe J. 3D printed bioresorbable scaffolds for articular cartilage tissue engineering: a comparative study between neat polycaprolactone (PCL) and poly(lactide-b-ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymer. *Biomed Mater*. 2022;17(4).
  142. Liang R, Yang X, Yew PYM, Sugiarto S, Zhu Q, Zhao J, Loh XJ, Zheng L, Kai D. PLA-lignin nanofibers as antioxidant biomaterials for cartilage

regeneration and osteoarthritis treatment. *J Nanobiotechnology*. 2022;20(1):327.

143. Mantha S, Pillai S, Khayambashi P, Upadhyay A, Zhang Y, Tao O, Pham HM, Tran SD. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials (Basel)*. 2019;12(20).
144. Alizadeh Sardroud H, Wanlin T, Chen X, Eames BF. Cartilage Tissue Engineering Approaches Need to Assess Fibrocartilage When Hydrogel Constructs Are Mechanically Loaded. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:787538.
145. Depprich RA. Biomolecule Use in Tissue Engineering. In: Meyer U, Handschel J, Wiesmann HP, Meyer T, editors. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 121-35.
146. Chato-Astrain J, Sanchez-Porras D, Garcia-Garcia OD, Vairo C, Villar-Vidal M, Villullas S, Sanchez-Montesinos I, Campos F, Garzon I, Alaminos M. Improvement of Cell Culture Methods for the Successful Generation of Human Keratinocyte Primary Cell Cultures Using EGF-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Biomedicines*. 2021;9(11).
147. Chandrasekhar S, Harvey AK, Stack ST. Degradative and repair responses of cartilage to cytokines and growth factors occur via distinct pathways. *Agents Actions Suppl*. 1993;39:121-5.
148. Zhu Y, Tao H, Jin C, Liu Y, Lu X, Hu X, Wang X. Transforming growth factor-beta1 induces type II collagen and aggrecan expression via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med Rep*. 2015;12(4):5573-9.
149. Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(7):559-67.
150. Whitty C, Pernstich C, Marris C, McCaskie A, Jones M, Henson F. Sustained delivery of the bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-7 for cartilage repair and regeneration in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil Open*. 2022;4(1):100240.
151. Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(4):278-86.
152. DePhillipo NN, Hendsi H, Aman ZS, Lind DRG, Smith J, Dodge GR. Preclinical Use of FGF-18 Augmentation for Improving Cartilage Healing Following Surgical Repair: A Systematic Review. *Cartilage*. 2023;14(1):59-66.

153. Shi Y, Ma J, Zhang X, Li H, Jiang L, Qin J. Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7(3):289-97.
154. Li H, Li X, Jing X, Li M, Ren Y, Chen J, Yang C, Wu H, Guo F. Hypoxia promotes maintenance of the chondrogenic phenotype in rat growth plate chondrocytes through the HIF-1alpha/YAP signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018;42(6):3181-92.
155. Martinez-Armenta C, Suarez-Ahedo C, Olivos-Meza A, Camacho-Rea MC, Martinez-Gomez LE, Jimenez-Gutierrez GE, Martinez-Nava GA, Gomez-Quiroz LE, Pineda C, Lopez-Reyes A. The Critical Role of Hypoxia in the Re-Differentiation of Human Articular Chondrocytes. *Cells*. 2022;11(16).
156. Fahy N, Alini M, Stoddart MJ. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res*. 2018;36(1):52-63.
157. Choi JR, Yong KW, Choi JY. Effects of mechanical loading on human mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2018;233(3):1913-28.
158. Salinas EY, Hu JC, Athanasiou K. A Guide for Using Mechanical Stimulation to Enhance Tissue-Engineered Articular Cartilage Properties. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018;24(5):345-58.
159. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol*. 2007;22(6):631-40.
160. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*. 2008;213(1):66-72.
161. Gonzalez-Quevedo D, Diaz-Ramos M, Chato-Astrain J, Sanchez-Porras D, Tamimi I, Campos A, Campos F, Carriel V. Improving the regenerative microenvironment during tendon healing by using nanostructured fibrin/agarose-based hydrogels in a rat Achilles tendon injury model. *Bone Joint J*. 2020;102-B(8):1095-106.
162. Ortiz-Arrabal O, Carmona R, Garcia-Garcia OD, Chato-Astrain J, Sanchez-Porras D, Domezain A, Oruezabal RI, Carriel V, Campos A, Alaminos M. Generation and Evaluation of Novel Biomaterials Based on Decellularized Sturgeon Cartilage for Use in Tissue Engineering. *Biomedicines*. 2021;9(7).
163. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*. 2017;49:1-15.
164. El Soury M, Garcia-Garcia OD, Tarulli I, Chato-Astrain J, Perroteau I, Geuna S, Raimondo S, Gambarotta G, Carriel V. Chitosan conduits enriched with fibrin-collagen hydrogel with or without adipose-derived mesenchymal stem

cells for the repair of 15-mm-long sciatic nerve defect. *Neural Regen Res.* 2023;18(6):1378-85.

165. Chato-Astrain J, Philips C, Campos F, Durand-Herrera D, Garcia-Garcia OD, Roosens A, Alaminos M, Campos A, Carriel V. Detergent-based decellularized peripheral nerve allografts: An in vivo preclinical study in the rat sciatic nerve injury model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2020;14(6):789-806.
166. Sanchez-Porras D, Caro-Magdaleno M, Gonzalez-Gallardo C, Garcia-Garcia OD, Garzon I, Carriel V, Campos F, Alaminos M. Generation of a Biomimetic Substitute of the Corneal Limbus Using Decellularized Scaffolds. *Pharmaceutics.* 2021;13(10).
167. Hakansson J, Jenndahl L, Simonsson S, Johansson ME, Larsson K, Strehl R, Olsen Ekerhult T. De- and recellularized urethral reconstruction with autologous buccal mucosal cells implanted in an ovine animal model. *Biomed Tech (Berl).* 2023.
168. Gungor-Ozkerim PS, Inci I, Zhang YS, Khademhosseini A, Dokmeci MR. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci.* 2018;6(5):915-46.
169. Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep.* 2020;10(1):14023.
170. Guoqing Z, Junxin L, Xiaoyu Z, Yongsheng Z, Bai Y. The design and processing of a 3D-printed high-performance biological fixation plate. *Int J Bioprint.* 2023;9(2):658.
171. Brodin E, Boehmer M, Prentice A, Neff E, McCoy K, Mueller J, Saul J, Sparks JL. Extrusion 3D printing of keratin protein hydrogels free of exogenous chemical agents. *Biomed Mater.* 2022;17(5).
172. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J.* 2008;3(9-10):1172-84.
173. Napolitano AP, Dean DM, Man AJ, Youssef J, Ho DN, Rago AP, Lech MP, Morgan JR. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. *Biotechniques.* 2007;43(4):494, 6-500.
174. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(10):1347-60.
175. Yu Y, Wang J, Li Y, Chen Y, Cui W. Cartilaginous Organoids: Advances, Applications, and Perspectives. *Advanced NanoBiomed Research.* 2023;3(1):2200114.
176. Corro C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;319(1):C151-C65.

177. Sanchez-Porras D, Durand-Herrera D, Paes AB, Chato-Astrain J, Verplancke R, Vanfleteren J, Sanchez-Lopez JD, Garcia-Garcia OD, Campos F, Carriel V. Ex Vivo Generation and Characterization of Human Hyaline and Elastic Cartilaginous Microtissues for Tissue Engineering Applications. *Biomedicines*. 2021;9(3).
178. Bonhome-Espinosa AB, Campos F, Durand-Herrera D, Sanchez-Lopez JD, Schaub S, Duran JDG, Lopez-Lopez MT, Carriel V. In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;104:103619.
179. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Garcia-Martinez L, Duran JD, Lopez-Lopez MT, Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Carriel V. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomed Mater*. 2016;11(5):055004.
180. de Sousa BM, Correia CR, Ferreira JAF, Mano JF, Furlani EP, Soares Dos Santos MP, Vieira SI. Capacitive interdigitated system of high osteoinductive/conductive performance for personalized acting-sensing implants. *NPJ Regen Med*. 2021;6(1):80.
181. Czekanska EM. Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye. In: Stoddart MJ, editor. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 27-32.
182. Berneel E, Philips C, Declercq H, Cornelissen R. Redifferentiation of High-Throughput Generated Fibrochondrocyte Micro-Aggregates: Impact of Low Oxygen Tension. *Cells Tissues Organs*. 2016;202(5-6):369-81.
183. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014;16(2):266-77.
184. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaino G, Rodriguez IA, Duran-Herrera D, Lopez-Lopez MT, Sanchez-Montesinos I, Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Carriel V. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomed Mater*. 2018;13(2):025021.
185. Carriel V, Garzón I. Aplicación del método de bloque celular para evaluar la población de fibroblastos de mucosa oral en ingeniería tisular. *Actualidad Médica*. 2009;94(778):07-11.
186. Chato-Astrain J, Campos F, Roda O, Miralles E, Durand-Herrera D, Saez-Moreno JA, Garcia-Garcia S, Alaminos M, Campos A, Carriel V. In vivo Evaluation of Nanostructured Fibrin-Agarose Hydrogels With Mesenchymal Stem Cells for Peripheral Nerve Repair. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:501.
187. Oliveira AC, Garzon I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, Gonzalez-Andrades M, Perez Mdel M, Alaminos M, Campos A. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One*. 2013;8(6):e66538.

188. Vela-Romera A, Carriel V, Martin-Piedra MA, Aneiros-Fernandez J, Campos F, Chato-Astrain J, Prados-Olleta N, Campos A, Alaminos M, Garzon I. Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. *Histochem Cell Biol.* 2019;151(1):57-73.
189. Alaminos M, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Munoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(8):3311-7.
190. Philips C, Cornelissen M, Carriel V. Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts. *J Neural Eng.* 2018;15(2):021003.
191. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(5):431-40.
192. Goldberg VM, Caplan AI. Biological resurfacing: an alternative to total joint arthroplasty. *Orthopedics.* 1994;17(9):819-21.
193. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(5):1109-18.
194. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020;7:33.
195. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839-45.
196. Dean DM, Napolitano AP, Youssef J, Morgan JR. Rods, tori, and honeycombs: the directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. *FASEB J.* 2007;21(14):4005-12.
197. Napolitano AP, Chai P, Dean DM, Morgan JR. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue Eng.* 2007;13(8):2087-94.
198. Sart S, Tsai AC, Li Y, Ma T. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(5):365-80.
199. Lee WY, Chang YH, Yeh YC, Chen CH, Lin KM, Huang CC, Chang Y, Sung HW. The use of injectable spherically symmetric cell aggregates self-assembled in a thermo-responsive hydrogel for enhanced cell transplantation. *Biomaterials.* 2009;30(29):5505-13.

200. Anderer U, Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage. *J Bone Miner Res.* 2002;17(8):1420-9.
201. Moreira Teixeira LS, Leijten JC, Sobral J, Jin R, van Apeldoorn AA, Feijen J, van Blitterswijk C, Dijkstra PJ, Karperien M. High throughput generated micro-aggregates of chondrocytes stimulate cartilage formation in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater.* 2012;23:387-99.
202. Burdis R, Kronemberger GS, Kelly DJ. Engineering High-Quality Cartilage Microtissues Using Hydrocortisone Functionalized Microwells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2023;29(4):121-33.
203. Futrega K, Palmer JS, Kinney M, Lott WB, Ungrin MD, Zandstra PW, Doran MR. The microwell-mesh: A novel device and protocol for the high throughput manufacturing of cartilage microtissues. *Biomaterials.* 2015;62:1-12.
204. De Moor L, Beyls E, Declercq H. Scaffold Free Microtissue Formation for Enhanced Cartilage Repair. *Ann Biomed Eng.* 2020;48(1):298-311.
205. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(31):13724-9.
206. Ma D, Zhong C, Yao H, Liu Y, Chen F, Li J, Zhao J, Mao T, Ren L. Engineering injectable bone using bone marrow stromal cell aggregates. *Stem Cells Dev.* 2011;20(6):989-99.
207. Kamisan N, Naveen SV, Ahmad RE, Kamarul T. Chondrocyte density, proteoglycan content and gene expressions from native cartilage are species specific and not dependent on cartilage thickness: a comparative analysis between rat, rabbit and goat. *BMC Vet Res.* 2013;9:62.
208. Leenaars CHC, Kouwenaar C, Staffleu FR, Bleich A, Ritskes-Hoitinga M, De Vries RBM, Meijboom FLB. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J Transl Med.* 2019;17(1):223.
209. de Chalain T, Phillips JH, Hinek A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J Biomed Mater Res.* 1999;44(3):280-8.
210. Okubo R, Asawa Y, Watanabe M, Nagata S, Nio M, Takato T, Hikita A, Hoshi K. Proliferation medium in three-dimensional culture of auricular chondrocytes promotes effective cartilage regeneration in vivo. *Regen Ther.* 2019;11:306-15.
211. Martin-Piedra MA, Carmona G, Campos F, Carriel V, Fernández-González A, Campos A, Cuende N, Garzón I, Gacto P, Alaminos M. Histological



assessment of nanostructured fibrin-agarose skin substitutes grafted in burnt patients. A time-course study. *Bioengineering & Translational Medicine*.n/a(n/a):e10572.

212. Carriel V, Garzon I, Jimenez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(1):1-12.
213. Garzon I, Chato-Astrain J, Gonzalez-Gallardo C, Ionescu A, Cardona JC, Mateu M, Carda C, Perez MDM, Martin-Piedra MA, Alaminos M. Long-Term in vivo Evaluation of Orthotypical and Heterotypical Bioengineered Human Corneas. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:681.
214. Gonzalez-Andrades M, Mata R, Gonzalez-Gallardo MDC, Medialdea S, Arias-Santiago S, Martinez-Atienza J, Ruiz-Garcia A, Perez-Fajardo L, Lizana-Moreno A, Garzon I, Campos A, Alaminos M, Carmona G, Cuende N. A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open*. 2017;7(9):e016487.
215. Carriel V, Scionti G, Campos F, Roda O, Castro B, Cornelissen M, Garzon I, Alaminos M. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(5):1412-26.
216. Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P, Garzon I, Garcia-Garcia S, Saez-Moreno JA, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Campos A, Alaminos M. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng*. 2013;10(2):026022.
217. Kutaish H, Bengtsson L, Matthias Tscholl P, Marteyn A, Braunersreuther V, Guerin A, Bena F, Gimelli S, Longet D, Ilmjarv S, Dietrich PY, Gerstel E, Jaquet V, Hannouche D, Menetrey J, Assal M, Krause KH, Cosset E, Tieng V. Hyaline Cartilage Microtissues Engineered from Adult Dedifferentiated Chondrocytes: Safety and Role of WNT Signaling. *Stem Cells Transl Med*. 2022;11(12):1219-31.
218. Klinder A, Kussauer S, Hiemer B, Wree A, Bader R, Jonitz-Heincke A. Influence of Conditioned Media on the Re-Differentiation Capacity of Human Chondrocytes in 3D Spheroid Cultures. *J Clin Med*. 2020;9(9).
219. Eschen C, Kaps C, Widuchowski W, Fickert S, Zinser W, Niemeyer P, Roel G. Clinical outcome is significantly better with spheroid-based autologous chondrocyte implantation manufactured with more stringent cell culture criteria. *Osteoarthr Cartil Open*. 2020;2(1):100033.
220. Bao B, Jiang J, Yanase T, Nishi Y, Morgan JR. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J*. 2011;25(1):255-64.

221. Delise AM, Tuan RS. Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Dev Dyn*. 2002;225(2):195-204.
222. Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Martinez-de-Illarduya O, Wang HZ, Valiunas V, Brink P, Blanco FJ. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1337-46.
223. Cheng BF, Lian JJ, Yang HJ, Wang L, Yu HH, Bi JJ, Gao YX, Chen SJ, Wang M, Feng ZW. Neural cell adhesion molecule regulates chondrocyte hypertrophy in chondrogenic differentiation and experimental osteoarthritis. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(2):273-83.
224. Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, Knutsen RH, Wagenseil JE, Levy MA, Mecham RP. Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J Cell Physiol*. 2006;207(1):87-96.
225. Leblond CP, Inoue S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. *Am J Anat*. 1989;185(4):367-90.
226. Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *J Biotechnol*. 2006;122(3):372-81.
227. SundarRaj N, Fite D, Ledbetter S, Chakravarti S, Hassell JR. Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci*. 1995;108 ( Pt 7):2663-72.
228. Foldager CB, Toh WS, Christensen BB, Lind M, Gomoll AH, Spector M. Collagen Type IV and Laminin Expressions during Cartilage Repair and in Late Clinically Failed Repair Tissues from Human Subjects. *Cartilage*. 2016;7(1):52-61.
229. Chu WC, Zhang S, Sng TJ, Ong YJ, Tan WL, Ang VY, Foldager CB, Toh WS. Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation. *Int J Oral Sci*. 2017;9(1):43-52.
230. Zhang Z. Chondrons and the pericellular matrix of chondrocytes. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(3):267-77.
231. Haggerty AE, Bening MR, Pherribo G, Dauer EA, Oudega M. Laminin polymer treatment accelerates repair of the crushed peripheral nerve in adult rats. *Acta Biomater*. 2019;86:185-93.
232. Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Chato-Astrain J, Sanchez-Porras D, Garcia-Garcia OD, Carmona R, Lopez-Lopez MT, Alaminos M, Carriel V, Rodriguez IA. Evaluation of Fibrin-Agarose Tissue-Like Hydrogels Biocompatibility for Tissue Engineering Applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:596.