
Estudio y caracterización de andamios 2D y 3D funcionalizados con RGD-cys-D1 para su aplicación en ingeniería de tejidos en el tratamiento de lesiones de cartílago articular humano

Cristina Rodríguez Pereira

Tesis doctoral

2020

Directores: Dr. Francisco Javier Blanco García y Dra. Patricia Gálvez Martín

Tutor: Dr. Francisco Javier Blanco García

Programa Oficial de Doutoramento en Bioloxía Celular e Molecular

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

El Dr. Francisco Javier Blanco García, Director Científico del Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña (INIBIC) y la Dra. Patricia Gálvez Martín, Directora del área de Terapias Avanzadas y *R&D Project Manager* en el departamento de *Animal and Human Health* de la compañía Bioibérica.

CERTIFICAN:

Que Dña. Cristina Rodríguez Pereira, Graduada en Ciencias Biomédicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “Estudio y caracterización de andamios 2D y 3D funcionalizados con RGD-cys-D1 para su aplicación en ingeniería de tejidos en el tratamiento de lesiones de cartílago articular humano”. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctor en Biología celular y molecular.

Fdo. Dr. Francisco Javier Blanco García

Fdo. Dra. Patricia Gálvez Martín

Fdo. Cristina Rodríguez Pereira

Doctoranda

En A Coruña, 24 de febrero de 2020



Parte de la investigación que se incluye en esta tesis se realizó bajo la supervisión de la Dra. Anna Lagunas Targarona y Dr. Josep Samitier Martí, en el grupo de Nanobioingeniería del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2017.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Parte de la investigación que se incluye en esta tesis se realizó bajo la supervisión del Dr. Juan Antonio Marchal Corrales, líder del grupo CTS-963: “Diferenciación, Regeneración y Cáncer”, integrado en el Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER) del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM) de la Universidad de Granada, durante una estancia de investigación predoctoral en el año 2018.

A mi familia, mis amigos y Alberto

"With how many things are we on the brink of becoming acquainted, if cowardice or carelessness did not restrain our inquiries." - Mary Shelley, **Frankenstein**

En primer lugar, me gustaría agradecer a los donantes, dado que sin su altruismo este trabajo no se podría haber realizado.

También, quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Javier Blanco García y la Dra. Patricia Gálvez Martín, por haberme ayudado y guiado durante el proceso de realizar este trabajo.

Asimismo, me gustaría agradecer al Instituto Carlos III por haberme financiado como investigadora durante mi tesis. Además, de a todas las instituciones que han hecho esto posible, la Universidad de A Coruña, el Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña, el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas de A Coruña y Bioibérica SAU.

Por otro lado, agradecer por haberme acogido durante las estancias realizadas en el transcurso de mi tesis al grupo del Dr. Josep Samitier Martí en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña y al grupo del Dr. Juan Antonio Marchal Corrales del Centro de Investigaciones Biomédicas de Granada.

Gracias a todos los compañeros que han estado conmigo durante este tiempo, tanto del INIBIC, como del CICA, el IBEC y el CIBM. Sois muchos y soy mala con los nombres así que optaré por no nombraros por miedo a que me olvide de alguno.

Especialmente, me gustaría decir gracias, a la Dra. Tamara Hermida por su paciencia, consejos, ánimos y porque sin ella esto habría sido imposible; y a la Dra. Mercedes Fernández por su sinceridad, consejos y dedicación. Como no, también agradecer a Paula Catarina, Paula Casal, Lucía y María por ser mis compañeras de batalla, mis confidentes y mis amigas. El viaje bien acompañado siempre es más placentero.

Por último, pero no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia por haber siempre creído en mí y apoyarme incondicionalmente durante toda mi vida. Sin ellos nunca habría llegado aquí. A mis amigos por haberme hecho reír, pasármelo bien y obligarme a sacar tiempo de donde no existe para desconectar. Especialmente gracias a mis queridos Falcatrueiros, qué haría yo sin vosotros. Finalmente, gracias, Alberto, mi compañero de viaje, de alegrías y desgracias, que siempre has estado a mi lado en cada paso. Esta tesis es tan tuya como mía.

Podría seguir nombrando entidades y personas que han hecho posible esta tesis durante varias páginas, pero como dice el refrán “lo breve si bueno dos veces bueno”. En definitiva, **GRACIAS**.

RESUMEN

El cartílago es un tejido que presenta una limitada capacidad de regeneración, lo que provoca que pequeñas lesiones puedan desencadenar enfermedades como la artrosis. La ingeniería de tejidos usa células, biomateriales y estímulos para intentar generar tejidos *in vitro* que se puedan implantar en el paciente para sustituir o ayudar al tejido dañado del cuerpo humano. En el ámbito de la regeneración de cartílago, múltiples andamios constituidos de diferentes biomateriales se han desarrollado en un intento de generar un cartílago *in vitro* que presente la estructura y la función características del cartílago articular hialino. Sin embargo, aún se está lejos de conseguir este objetivo, obteniéndose en la mayoría de los casos cartílago fibroso. Por otro lado, la fibronectina, y más concretamente su secuencia RGD, se ha visto implicada en la diferenciación condrogénica. Es de particular interés su función, durante los primeros pasos de la condrogénesis embrionaria, ya que actúa guiando la distribución y deposición de la matriz cartilaginosa.

El objetivo de este estudio es determinar el potencial condrogénico de láminas de ácido poli-L-láctico y andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con diferentes concentraciones de dendrímeros RGD-Cys-D1.

Para ello, se han cultivado células estromales mesenquimales en ambos tipos de andamios con medio condrogénico y se hizo un estudio de expresión génica e histológico de las muestras. Como resultado, se observó que las células estromales mesenquimales responden a las diferentes concentraciones de dendrímeros y que estos estimulan la condrogénesis cuando las células son sembradas en las láminas de ácido poli-L-láctico. Sin embargo, no es así en los andamios de policaprolactona.

El uso de diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 para la regeneración de cartílago es prometedor, aun así, más estudios son necesarios para determinar su potencial.

RESUMO

A cartilaxe é un tecido que presenta unha limitada capacidade de rexeneración, o que provoca que pequenas lesións poidan desencadear enfermidades como a artrose. A enxeñaría de tecidos emprega biomateriais, células e estímulos para intentar xenerar tecidos que poidan ser implantados para substituír o axudar ao tecido danado do corpo humano. No ámbito da rexeneración de cartilaxe, múltiples andamios constituídos de diferentes biomateriais desarrolláronse nun intento de xenerar unha cartilaxe *in vitro* que presente unha estrutura e unha función características da cartilaxe articular humana hialina. Sen embargo, aínda estamos lonxe de conseguir este obxectivo, obténdose na maioría dos casos cartilaxe fibrosa. Por outro lado, a fibronectina, e máis concretamente a secuencia RGD, veuse implicada na diferenciación condroxénica. É de particular interese a súa función, durante os primeiros pasos da condroxénesis embrionaria, guiando a distribución e deposición da matriz cartilaxinosa.

O obxectivo de este estudo é determinar a potencial condroxénica de láminas de ácido poli-L-láctico e andamios tridimensionais de policaprolactona funcionalizados con diferentes concentracións de dendrímeros RGD-Cys-D1.

Para elo, cultiváronse células estromais mesenquimais en ambos tipos de andamios con medio condroxénico e fíxose un estudo da expresión xénica e histolóxico das mostras. Como resultado, observouse que as células estromais mesenquimais responden ás diferentes concentracións de dendrímeros e que estes estimulan a condroxénesis cando as células son sembradas nas láminas de ácido poli-L-láctico. Sen embargo, non é así nos andamios de policaprolactona.

O uso de diferentes concentracións de RGD-Cys-D1 para a rexeneración da cartilaxe é prometedor, aínda así, máis estudos son necesarios para determinar o seu potencial.

ABSTRACT

Cartilage is a tissue with a limited regenerative capacity. It causes that small lesions can develop in illness as arthrosis. Tissue engineering uses biomaterials, cells and stimulus with the intention of generating tissues, which could be implanted in the human body as a substitute or for helping the malfunctioning tissue. In the area of cartilage regeneration multiple scaffolds have been manufactured with different biomaterials, trying to generate an *in vitro* cartilage with the structure and function of the native articular cartilage. Even though, we are far away from getting to our objective, and most of the constructs generated are fibrocartilage. On the other hand, fibronectin, and specially its RGD sequence, has been described as participant during the chondrogenic differentiation. Of great interest is the function of the fibronectin as guide in the distribution and deposition of the cartilage matrix during embryonic chondrogenesis.

The objective of this work is determining the chondrogenic potential of the poly-L-lactic acid membranes and polycaprolactone three-dimensional scaffolds functionalized with different RGD-Cys-D1 dendrimer concentrations.

For obtaining this objective, mesenchymal stromal cells have been cultivated in both scaffolds with chondrogenic medium. The results have been obtaining by studying the gene expression and histologic test of the obtained samples after the culture. It has been observed that the mesenchymal stromal cells have different responses to the concentrations of dendrimers. The RGD-Cys-D1 stimulated the chondrogenesis in the mesenchymal stromal cells when cultured in the poly-L-lactic acid membranes, but not in the polycaprolactone scaffolds.

The use of different concentrations of RGD-Cys-D1 for cartilage regeneration is promising, but more studies are necessary for determining their potential.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN	1
1 <i>La articulación</i>	1
2 <i>Cartílago articular humano</i>	2
2.1 Composición.....	3
2.1.1 Matriz extracelular	3
2.1.2 Componente celular	4
2.2 Estructura.....	6
2.3 Función biomecánica	7
3 <i>Lesiones focales en el cartílago articular humano</i>	8
4 <i>Tratamientos para reparar lesiones de cartílago articular</i>	9
4.1 Nuevos tratamientos en ingeniería de tejidos.....	12
5 <i>Células mesenquimales estromales</i>	13
5.1 Características	14
5.2 Capacidad de diferenciación	14
5.2.1 Condrogénesis.....	14
5.2.1.1 Hipertrofia y desdiferenciación.....	16
5.2.2 Osteogénesis y adipogénesis.....	17
5.3 Fuentes de MSCs	17
5.3.1 Médula ósea	17
5.3.2 Tejido adiposo	18
5.3.3 Membrana sinovial.....	18
5.4 Líneas celulares	18
5.4.1 3a6- <i>hMSCs</i>	19
5.4.2 127TT- <i>hMSCs</i>	20
6 <i>Biomateriales y andamios para la ingeniería de tejidos del cartílago</i>	20
6.1 Características de los andamios	21

6.1.1	Características estructurales	21
6.1.2	Características biológicas	22
6.1.3	Composición química	22
6.2	Clasificación de los biomateriales	23
6.2.1	Ácido poli L-láctico	24
6.2.2	Policaprolactona.....	25
6.3	Diseño de andamios.....	26
6.3.1	Diseño de andamios para la regeneración de cartílago.....	28
6.3.2	Funcionalización de andamios	30
6.3.2.1	Fibronectina.....	31
6.3.2.2	Secuencia RGD.....	33
6.3.2.3	Dendrímeros.....	34
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS		37
OBJETIVOS.....		41
MATERIAL Y MÉTODOS		45
1	<i>Aislamiento y cultivo de células mesenquimales estromales</i>	47
2	<i>Aislamiento y cultivo de condrocitos</i>	48
3	<i>Cultivo de 3a6-hMSCs</i>	48
4	<i>Cultivo de 127TT-hMSCs</i>	48
5	<i>Subcultivo celular</i>	49
6	<i>Criopreservación celular</i>	49
7	<i>Diferenciación condrogénica</i>	49
7.1	Micromasa.....	50
7.2	Gota colgante	51
7.3	Membranas de PLLA 2D	51
7.4	Andamios de PCL 3D	52
8	<i>Procesado histológico</i>	53
8.1	Tinciones histoquímicas	53
8.1.1	Hematoxilina-Eosina.....	53
8.1.2	Safranina-O.....	53

8.1.3	Azul Alcían-PAS.....	53
8.1.4	Tricrómico de Masson	53
8.1.5	Rojo Alizarina.....	54
8.1.6	Tinción de von Kossa	54
8.1.7	Deshidratación y montaje	54
8.1.8	Fotografías.....	54
8.2	Tinciones inmunofluorescencia	54
8.3	Morfometría.....	55
9	<i>Análisis expresión génica</i>	55
9.1	Extracción de ARN.....	55
9.2	Retrotranscripción.....	56
9.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>rt-qPCR</i>)	57
10	<i>Dendrímeros RGD-Cys-D1</i>	60
11	<i>Membranas de PLLA</i>	60
11.1	Fabricación de membranas de <i>PLLA</i>	60
11.2	Funcionalización con dendrímeros RGD-Cys-D1 y Fn	61
12	<i>Andamios de PCL</i>	61
12.1	Fabricación de andamios de PCL.....	61
12.2	Esterilización de andamios de PCL	62
12.3	Funcionalización con dendrímeros RGD-Cys-D1 y fibronectina.....	62
12.4	Viabilidad celular	63
12.5	Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (<i>FESEM</i>)	63
13	<i>Análisis estadístico</i>	63
RESULTADOS		65
1	<i>Evaluación del potencial condrogénico de membranas de ácido poli-L-láctico transportadoras con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1</i>	67
1.1	Análisis de expresión génica en las membranas de <i>PLLA</i>	67
1.2	Análisis por inmunofluorescencia en las membranas de <i>PLLA</i>	70
1.2.1	Evaluación del tamaño de los agregados celulares formados en las membranas de <i>PLLA</i>	71
2	<i>Evaluación de la función de las uniones comunicantes y adhesiones focales en la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales humanas</i>	71

2.1	Células primarias <i>MSCs</i> de pacientes no <i>OA</i> y <i>OA</i> y líneas celulares 3a6- <i>hMSCs</i> y 127TT- <i>hMSCs</i>	71
2.1.1	Expresión génica en <i>MSCs</i>	72
2.2	Diferenciación condrogénica en las líneas celulares 3a6- <i>hMSCs</i> y 127TT- <i>hMSCs</i> ...	75
2.2.1	Línea celular 3a6- <i>hMSCs</i>	76
2.2.1.1	Expresión génica durante la condrogénesis en 3a6- <i>hMSCs</i>	76
2.2.1.2	Análisis histológico de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i>	80
2.2.1.3	Análisis por inmunofluorescencia de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i>	81
2.2.2	Línea celular 127TT- <i>hMSCs</i>	82
2.2.2.1	Expresión génica durante la condrogénesis en 127TT- <i>hMSCs</i>	82
2.2.2.2	Análisis histológico de los agregados de 127TT- <i>hMSCs</i> formados mediante gota colgante	88
3	<i>Evaluación del potencial condrogénico de andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1</i>	91
3.1	Caracterización fisicoquímica de los andamios de PCL.....	92
3.1.1	Diseño del poro de los andamios de PCL	92
3.2	Caracterización biológica de los andamios de PCL	92
3.2.1	Viabilidad celular de las 127TT- <i>hMSCs</i> en los andamios de PCL.....	92
3.2.2	Diferenciación condrogénica de las 127TT- <i>hMSCs</i> en los andamios de PCL.....	93
3.2.2.1	Expresión génica de las 127TT- <i>hMSCs</i> en los andamios de PCL.....	93
3.2.2.2	Análisis histológico de las 127TT- <i>hMSCs</i> en los andamios de PCL	94
3.2.2.3	Estudio de la morfología celular en los andamios de PCL mediante <i>FESEM</i>	96
	DISCUSIÓN.....	99
1	<i>Evaluar el potencial condrogénico de membranas de ácido poli-L-láctico transportadoras con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1</i>	101
2	<i>Evaluación del rol de las uniones comunicantes y adhesiones focales en la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales humanas</i>	103
2.1	Perfil de expresión de las <i>MSCs</i>	103
2.2	3a6- <i>hMSC</i> durante la condrogénesis	109
2.3	127TT- <i>hMSC</i> durante la condrogénesis	111
3	<i>Evaluar el potencial condrogénico de andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1</i>	114

CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de las articulaciones sinoviales. Figura tomada y modificada de OpenStax, 2013.	1
Figura 2. Partes de la articulación coxofemoral. Figura tomada y modificada de Foran y Miller, 2018.	2
Figura 3. Partes de la articulación de la rodilla. Figura tomada y modificada de OpenStax, 2013.	2
Figura 4. (a) Secuencia de activación de las integrinas. Figura tomada y modificada de Estevez <i>et al.</i> , 2015. (b) Vías de señalización activadas por las integrinas. Figura tomada y modificada de Legate <i>et al.</i> , 2009.	5
Figura 5. Esquema de la estructura de las (a) conexinas y (b) panexinas y (c) formación de hemicalanes y (d) uniones GAP. Figura tomada y modificada de Gajardo-Gómez <i>et al.</i> , 2016.	6
Figura 6. Estructura del cartílago articular humano adulto (Rodríguez-Pereira, 2020).....	6
Figura 7. Métodos de lubricación y transmisión de las fuerzas de carga en el cartílago. Imagen tomada y modificada de Landínez-Parra <i>et al.</i> , 2012.....	8
Figura 8. Tipos de lesiones de cartílago articular. Figura tomada y modificada de Simon y Jackson, 2006.....	9
Figura 9. Aproximaciones médicas a las lesiones de cartílago articular mayores de 1 cm (Rodríguez-Pereira, 2020).....	10
Figura 10. Diferenciación de las MSCs al linaje condrogénico. Figura tomada y modificada de Vinatier <i>et al.</i> , 2009.	15
Figura 11. Estructura de la Fn con lugares de interacción con integrinas e interacciones proteína-proteína (Rodríguez-Pereira, 2020).....	31
Figura 12. Modelo de RGD, arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D). Las esferas negras representan el carbón, las rojas el oxígeno, las azules el nitrógeno y las blancas el hidrógeno. Figura tomada y modificada de Wagstaffe <i>et al.</i> , 2019.....	33
Figura 13. Esquema de la estructura de los dendrímeros. Figura tomada y modificada de de Araújo <i>et al.</i> , 2018.	34
Figura 14. Formación de agregados celulares mediante el cultivo en gota colgante.....	51
Figura 15. Fabricación y siembra de las láminas de PLLA funcionalizadas con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 y Fn.....	61
Figura 16. Proporciones de los andamios de PCL diseñados e impresos mediante FDM. Siendo la h capa la altura de capa.....	62

Figura 17. Esterilización, fabricación y siembra de los andamios de PCL funcionalizados con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 y Fn.	63
Figura 18. Expresión génica relativa de (a) COL2A1; (b) SOX9; (c) COL1A1; (d) TNC; y (e) GJA1 (gen de referencia empleado RPL13A) en MSCs de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) sembradas sobre las láminas de PLLA funcionalizadas con Fn (FN-PLLA), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PLLA) a 3 días estimuladas. a, b, c, d $p < 0,05$	69
Figura 19. Inmunofluorescencia de COL2 (verde) y GJA1 (rojo) con contratinción de DAPI (azul) de las células MSCs de pacientes no artrósicos (no OA) y artrósicos (OA) sembradas sobre las láminas de PLLA funcionalizadas con Fn (FN-PLLA), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} %p/p) y sin funcionalizar (PLLA) a 3 días estimuladas. Barra de escala de 200 μm	70
Figura 20. Inmunofluorescencia de COL2 (verde) y GJA1 (rojo) con contratinción de DAPI (azul) de las células MSCs de pacientes no artrósicos (no OA) y artrósicos (OA) sembradas en micromasa a 3 días estimuladas. Barra de escala de 200 μm	70
Figura 21. (a) Gráfica del área (μm^2) de los agregados formados por las MSCs de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) sembradas sobre las láminas de PLLA funcionalizadas con Fn (FN-PLLA), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PLLA) a 3 días estimuladas. (b) Gráfica del área (mm^2) de las micromasas de células MSCs de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) a 3 días estimuladas.	71
Figura 22. Expresión génica relativa en MSCs no OA (Nc, barra blanca) y OA (OAc, barra negra) y en MSCs de las líneas celulares (barras azules) 3a6-hMSCs (3a6) y 127TT-hMSCs (127TT) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: SOX9 y COL2A1; (b) gen marcador de la desdiferenciación: COL1A1; y (c) gen marcador de la hipertrofia: COL10A1. Datos representados como media con desviación estándar.	73
Figura 23. Expresión génica relativa en MSCs no OA (Nc, barra blanca) y OA (OAc, barra negra) y en MSCs de las líneas celulares (barras azules) 3a6-hMSCs (3a6) y 127TT-hMSCs (127TT) de las conexinas y panexinas expresadas principalmente por (a) MSCs y condrocitos: GJA1, GJC1 y PANX3; (b) MSCs: GJA1; y (c) condrocitos: GJA3 y GJB1. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c $p < 0,05$	74
Figura 24. Expresión génica relativa en MSCs no OA (Nc, barra blanca) y OA (OAc, barra negra) y en MSCs de las líneas celulares (barras azules) 3a6-hMSCs (3a6) y 127TT-hMSCs (127TT) de subunidades alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD: ITGA2B, ITGA5,	

ITGAV e ITGA8. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c $p < 0,05$	75
Figura 25. Expresión génica relativa en <i>MSCs</i> de la línea celular 3a6- <i>hMSCs</i> a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: <i>SOX9</i> y <i>COL2A1</i> ; (b) gen marcador de la desdiferenciación: <i>COL1A1</i> ; y (c) gen marcador de la hipertrofia: <i>COL10A1</i> . Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$	77
Figura 26. Expresión génica relativa en <i>MSCs</i> de la línea celular 3a6- <i>hMSCs</i> a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por <i>MSCs</i> y condrocitos: <i>GJA1</i> , <i>GJC1</i> y <i>PANX3</i> . Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$	78
Figura 27. Expresión génica relativa en <i>MSCs</i> de la línea celular 3a6- <i>hMSCs</i> a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por (a) <i>MSCs</i> : <i>GJA5</i> y (b) condrocitos: <i>GJA3</i> y <i>GJB1</i> . Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$	79
Figura 28. Expresión génica relativa en <i>MSCs</i> de la línea celular 3a6- <i>hMSCs</i> a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de la subunidad alfa de la integrina reconocedora de RGD: <i>ITGA5</i> . Datos representados como media con desviación estándar. a $p < 0,05$	80
Figura 29. (a) Tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y safranina-o (SO) de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i> a 3, 9 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm. (b) Gráficas del área (%) y circularidad (0-1) de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i> a 3, 9 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b $p < 0,05$	81
Figura 30. (a) Inmunofluorescencia de <i>GJA1</i> (verde) y <i>COL2</i> (rojo) con contratinción de <i>DAPI</i> (azul) de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i> a 3, 9 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 200 μ m. (b) Gráficas del área (%) de fluorescencia de <i>GJA1</i> y <i>COL2</i> en proporción al área (%) de fluorescencia de <i>DAPI</i> de las micromasas de 3a6- <i>hMSCs</i> a 3, 9 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b $p < 0,05$	82

- Figura 31. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; (b) gen marcador de la desdiferenciación: *COL1A1*; y (c) gen marcador de la hipertrofia: *COL10A1*. Datos representados como media con desviación estándar. 84
- Figura 32. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por (a) *MSCs* y condrocitos: *GJA1*, *GJC1* y *PANX3*; y (b) condrocitos: *GJA3*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d $p < 0,05$ 86
- Figura 33. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las subunidades alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD: *ITGA2B*, *ITGA5* e *ITGAV*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d $p < 0,05$ 87
- Figura 34. (a) Tinción de hematoxilina (HE) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm. (b) Gráficas del área (%) y circularidad (0-1) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b, c $p < 0,05$ 89
- Figura 35. Tinciones de safranina-o (SO) y tricrómico de Masson (TM) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm..... 90
- Figura 36. Tinciones de rojo alizarina (RA) y von Kossa (VK) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm. 91
- Figura 37. (a) Imagen *FESEM* del poro de los andamios de PCL con flecha blanca indicando tamaño de poro correspondiente a 1 mm. (b) Gráfica de la media del tamaño de poro (μm) de tres andamios de PCL diferentes..... 92
- Figura 38. Gráfica de los datos obtenidos mediante la técnica de alamar blue, medidas tomadas a lo largo del tiempo de 127TT-*hMSCs* sembradas en andamios de PCL no estimuladas. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$ 93
- Figura 39. Expresión génica relativa de (a) *GJC1*; (b) *ITGA5*; y (c) *SOX9* (gen de referencia empleado 18S) en 127TT-*hMSCs* sembradas a nivel basal (0d, barra gris) y sembradas sobre

los andamios de PCL funcionalizados con Fn (Fn), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas (N, barra blanca) y estimuladas (E, barra negra).....	94
Figura 40. Tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y azul alcian (AA-PAS) de las células 127TT- <i>hMSCs</i> sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.	95
Figura 41. Tinción de tricrómico de Masson (TM) de las células 127TT- <i>hMSCs</i> sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.	95
Figura 42. Tinciones de rojo alizarina (RA) y von Kossa (VK) de las células 127TT- <i>hMSCs</i> sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.	96
Figura 43. Imágenes de <i>FESEM</i> a 1000 aumentos (línea superior) y 100 aumentos (línea inferior) de las células 127TT- <i>hMSCs</i> sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala en fotos a 100 aumentos de 100 μm y barra de escala en fotos de 1000 aumentos de 10 μm	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales. Tabla tomada y modificada de Masaeli <i>et al.</i> , 2019.	23
Tabla 2. Propiedades deseadas de los andamios diseñados mediante ingeniería de tejidos para la correcta regeneración del cartílago. Tabla tomada y modificada de Bassi <i>et al.</i> , 2011..	29
Tabla 3. Cultivos realizados para el estudio de la diferenciación condrogénica.....	50
Tabla 4. Sondas y cebadores para los genes de interés diseñados a través de la página web de Roche.	58
Tabla 5. Sondas y cebadores diseñados a través de la página web de Roche para los genes de referencia probados.	59
Tabla 6. Proceso de fabricación de las láminas de <i>PLLA</i> en el <i>Spin Coater</i>	60

ABREVIATURAS

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

ACI: Implantación de condrocitos autólogos o *autologous chondrocyte implantation*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AH: Ácido hialurónico

AR: Artritis reumatoide

Bm-MSC: MSC de médula ósea o *Bone marrow MSC*

BMP: Proteína morfogénica ósea o *bone morphogenic protein*

COL1: Colágeno tipo I

COL2: Colágeno tipo II

COL4: Colágeno tipo IV

COL6: Colágeno tipo VI

COL9: Colágeno tipo IX

COL10: Colágeno tipo X

COL11: Colágeno tipo XI

E7: Péptido EPLQLKM

ECM: Matriz extracelular o *extracellular matrix*

EMA: Agencia del medicamento europea o *European Medicines Agency*

ERK: Quinasas reguladas por la señal extracelular o *extracellular signal regulated kinase*

FDA: Administración de control de alimentos y medicamentos de Estados Unidos o *Food and drugs administration*

FDM: Deposición de material fundido o *Fused deposition modeling*

FFF: Extrusión de filamento de material o *Fused filament fabrication*

Fn: Fibronectina

GJA1: Conexina 43 o *gap junction alpha 1*

GJA3: Conexina 46 o *gap junction alpha 3*

GJA5: Conexina 40 o *Gap junction Alpha 5*

GJB1: Conexina 32 o *gap junction beta 1*

GJC1: Conexina 45 o *gap junction gamma 1*

hTERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa humana o *Human telomerase reverse transcriptase*

IL-10: Interleuquina 10

Inkjet: Inyección de material

MACI: *Matrix induced autologous chondrocyte implantation*

MAP2: Proteína asociada a microtúbulo 2 o *Microtubule associated protein 2*

MFDS: Ministerio de seguridad alimentaria y del medicamento o *Ministry of Food and Drug Safety*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad o *Major histocompatibility complex*

MMP13: Metaloproteasa 13

MSCs: Células estromales mesenquimales o *mesenchymal stromal cells*

Neu-N: *Neuronal nuclei*

NSE: Enolasa específica de neuronas o *Neuron-specific enolase*

NURR1: Receptor nuclear asociado 1 o *nuclear receptor related 1*

OA: Artrosis o *osteoarthritis*

PAMAM: Poliamidoamina

PANX3: Panexina 3

PCL: Policaprolactona

PGA: Ácido poliglicólico o *polyglycolic acid*

PhaP-RGD: Proteína de unión polihidroxialcanato fusionada con RGD

PITX3: Homeobox 3 pituitaria o pituitary homeobox 3

PLA: Ácido poliláctico o polylactic acid

PLGA: Poli (ácido láctico-co- ácido glicólico) o poly(lactic-co-glycolic acid)

PLLA: Ácido poli L-láctico o poly L-lactic acid

PPAR γ : Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma o peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PRP: Plasma rico en plaquetas

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

RUNX2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2 o Runt-related transcription factor

SOX9: Factor de transcripción nuclear región Y de determinación del sexo-caja 9 o SRY (sex determining region Y)-box 9

TERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa o Telomerase reverse transcriptase

TFG- β : Factor de crecimiento transformante beta o transforming growth factor beta

TNC: Tenascina-C

UV: Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1 La articulación

Las articulaciones son aquellos puntos donde elementos esqueléticos contactan. En general podemos clasificarlas como articulaciones sólidas o articulas sinoviales. En las primeras no hay cavidad entre los elementos esqueléticos y estos se mantienen unidos gracias a un tejido conjuntivo. En las segundas, hay una cavidad articular que separa los elementos (Juneja y Hubbard, 2019).

Las articulaciones sinoviales se caracterizan por tener una capa de cartílago hialino cubriendo las superficies de los elementos esqueléticos, de tal modo que los huesos no contacten entre sí de forma directa. Una cápsula articular conformada por una membrana sinovial

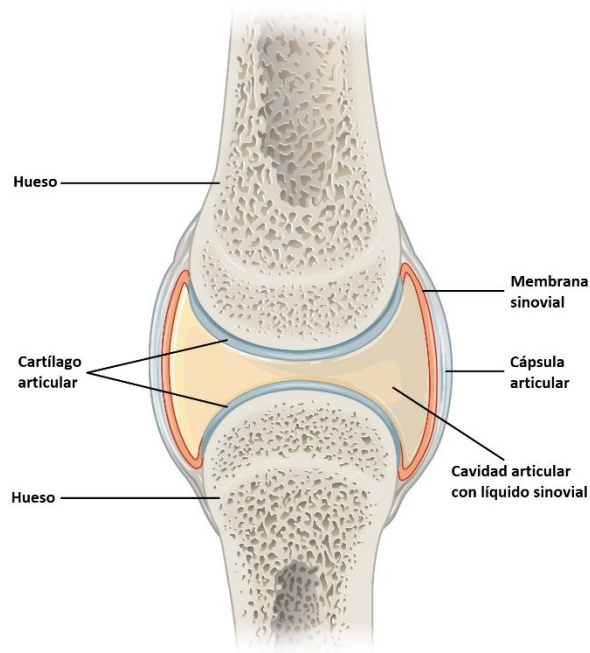


Figura 1. Partes de las articulaciones sinoviales. Figura tomada y modificada de OpenStax, 2013.

interna y una membrana fibrosa externa envuelve la articulación, en cuyo interior se halla el líquido sinovial (Figura 1). Estas estructuras reducen la fricción entre los elementos (Drake *et al.*, 2015).

Las articulaciones sinoviales de las extremidades inferiores más estudiadas son la articulación de la cadera o coxofemoral y la articulación de la rodilla. Dichas articulaciones soportan altas cargas al caminar, correr y saltar; esto ocasiona que lesiones en ellas causen un mayor impacto en el correcto desarrollo de las tareas diarias de los pacientes (Keenan *et al.*, 2006).

La articulación de la cadera o coxofemoral es una articulación sinovial que relaciona la cavidad acetabular del hueso coxal con la cabeza femoral (Figura 2) (Lippert, 2003). Es una articulación de alta estabilidad que tiene que soportar numerosos ciclos de carga y movimiento a lo largo de la vida. Cualquier defecto o interrupción de la estabilidad de esta articulación puede llevar a lesiones estructurales y degeneración articular (Marín-Peña *et al.*, 2016).

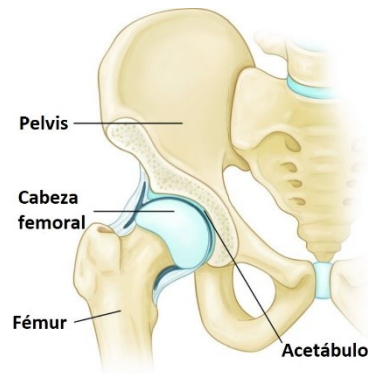


Figura 2. Partes de la articulación coxofemoral. Figura tomada y modificada de Foran y Miller, 2018.

La articulación de la rodilla es una articulación sinovial que relaciona el fémur en su porción distal con la porción proximal de la tibia; además de disponer de la rótula, un pequeño hueso que se articula en la parte anterior-inferior del fémur (Figura 3). Esta articulación permite movimientos de flexión y extensión y en los humanos es la articulación central de las extremidades inferiores (Lippert, 2003).

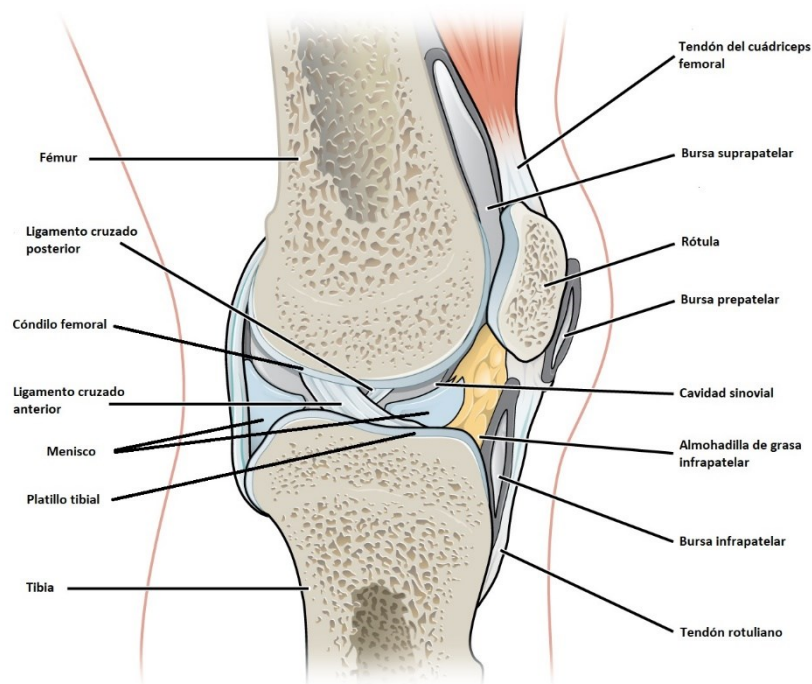


Figura 3. Partes de la articulación de la rodilla. Figura tomada y modificada de OpenStax, 2013.

2 Cartilago articular humano

El cartílago es un tipo de tejido conjuntivo avascular y aneural, compuesto por condrocitos y una abundante matriz extracelular (*extracellular matrix, ECM*) muy especializada. En el ser humano adulto, hay tres tipos de cartílago según las características de la *ECM* que presenten: hialino, elástico y fibroso (Ross y Pawlina, 2007).

El cartílago articular humano es un tipo de cartílago hialino que recubre las superficies de los elementos óseos en las articulaciones y es fundamental para el correcto funcionamiento de éstas (Drake *et al.*, 2015).

2.1 Composición

2.1.1 Matriz extracelular

La *ECM* del cartílago hialino está compuesta principalmente por moléculas de colágeno, proteoglicanos y glucoproteínas multiadhesivas.

El colágeno es la principal proteína de la *ECM*. En concreto, el colágeno tipo II (COL2) es el más abundante al formar la mayor parte de las fibrillas matriciales en las que se estructuran estas proteínas. También podemos encontrar colágeno tipo IX (COL9), facilitando la interacción de las fibrillas con los proteoglicanos de la *ECM*; colágeno tipo XI (COL11); y colágeno tipo X (COL10), que ayuda a organizar las fibrillas en una red hexagonal tridimensional. En la *ECM* que rodea los condrocitos podemos encontrar a su vez colágeno tipo VI (COL6) colaborando en la adhesión de las células a la *ECM* (Ross y Pawlina, 2007; Luo *et al.*, 2017).

El colágeno tipo I (COL1) es un tipo de colágeno propio de la *ECM* del cartílago fibroso, por lo que su presencia en cartílago hialino es señal de que el cartílago está dañado e intentando repararse formando fibrocartílago (Hall, 2019).

Los proteoglicanos son moléculas fundamentales del cartílago hialino dado que son los que permiten que éste tenga sus características propiedades biomecánicas. El agregano es el proteoglicano más importante del cartílago hialino. Está formado por glucoproteínas de condroitín sulfato y queratán sulfato que se unen a una proteína central. Esto le confiere una gran cantidad de grupos sulfatos, haciendo que posea una elevada carga negativa que le da gran afinidad por las moléculas de agua. Más de 300 moléculas de agregano se unen a cada molécula lineal de la glucoproteína hialuronano, formando grandes aglomeraciones de proteoglicanos. Éstas interaccionan a su vez con las fibrillas de colágeno a través de interacciones electrostáticas y glucoproteínas multiadhesivas, dando lugar a las propiedades biomecánicas del cartílago hialino (Roughley, 2006; Ross y Pawlina, 2007).

Las glucoproteínas multiadhesivas son pequeñas proteínas reguladoras y estructurales que actúan sobre las interacciones entre los condrocitos y la *ECM* y que tienen valor clínico como marcadores del recambio y de la degeneración del cartílago. Algunas de ellas son: la anexina V (que actúa como receptor de colágeno en los condrocitos) (Kurtis *et al.*, 2001), la tenascina, la

fibronectina (Fn) y las integrinas (que ayudan a fijar los condrocitos a la *ECM*) (Ross y Pawlina, 2007).

La tenascina es una glucoproteína importante en la adhesión celular. Pese a no ser de un modo directo un componente estructural de la *ECM*, presenta un papel dinámico mediando la comunicación entre las células y la *ECM* (Chiquet-Ehrismann y Tucker, 2004). Este papel la convierte en un elemento clave como modificadora de las señales, lo que conlleva que esté altamente regulada. La tenascina-C (TNC) está relacionada con el desarrollo del cartílago articular y disminuye durante la maduración de los condrocitos, siendo prácticamente indetectable en el cartílago articular adulto. Sin embargo, se ha encontrado elevada en el líquido sinovial de pacientes con artrosis (*osteoarthritis, OA*) y artritis reumatoide (AR) (Hasegawa *et al.*, 2018).

La Fn es una proteína multidominio que contiene sitios de unión para integrinas, colágeno y otras proteínas de la *ECM*, como los glucosaminoglicanos, así como sitios de unión consigo misma. Esta característica le permite hacer de puente de unión de modo simultáneo entre dichos componentes haciendo de base para la red de comunicación celular (Singh y Schwarzbauer, 2012).

Otro componente muy importante de la *ECM* del cartílago es el agua, llegando a formar el 60-80% del cartílago, y que conforma el líquido intersticial junto con sales minerales, azúcares, ácidos grasos, aminoácidos, coenzimas y productos de desecho de las células. De esta manera, la difusión de pequeños metabolitos a través del agua de la *ECM* tiene un papel fundamental en el aporte de oxígeno y nutrientes y la eliminación de desechos en este tejido avascular. Además, como se detalla más adelante, es clave a la hora de determinar las propiedades biomecánicas del cartílago (Ross y Pawlina, 2007).

2.1.2 Componente celular

Los condrocitos son células especializadas que conforman aproximadamente solo el 2% del volumen total del cartílago articular. Se distribuyen solos o en grupos isogénicos (cuando proceden de células que acaban de dividirse), que posteriormente se van dispersando a medida que van produciendo *ECM* (Fox *et al.*, 2009). Los condrocitos son los encargados de producir, mantener y remodelar la *ECM* del cartílago. Cualquier lesión o proceso degenerativo que altere su balance homeostático podrá resultar en la reactivación de su proliferación y activar la expresión de genes proinflamatorios y catabólicos (Akkiraju y Nohe, 2015; Carballo *et al.*, 2017).

Los condrocitos se comunican con la *ECM* y con otros condrocitos a través de diversos receptores de membrana, como las integrinas y las conexinas.

Las integrinas son las principales proteínas receptoras de las células animales. Se unen a la mayoría de las proteínas de la *ECM* y ejercen una labor fundamental a la hora de transmitir mensajes desde la ésta al interior de la célula y viceversa. Existen 24 integrinas diferentes, y éstas están constituidas por una subunidad alfa y una subunidad beta unidas de un modo no covalente. Estas subunidades pueden formar uniones transitorias o más estables, las cuales se denominan adhesiones focales. Las integrinas tienen una conformación activa y otra inactiva, siendo la unión a un ligando extracelular el estímulo que hará que cambie de conformación, activándose y permitiendo una mayor afinidad (Figura 4, a) (Alberts *et al.*, 2010). En la literatura está descrito que los condrocitos de cartílago articular adulto expresan las integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha10\beta1$, $\alphaV\beta1$, $\alphaV\beta3$ y $\alphaV\beta5$, mientras que los condrocitos de pacientes *OA* expresan también $\alpha2\beta1$, $\alpha4\beta1$ y $\alpha6\beta1$. Estas integrinas se unen principalmente a la Fn y el COL2 y 6 de la *ECM*, dando lugar a señales que regulan la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación y la remodelación de la *ECM* (Figura 4, b) (Loeser, 2014).

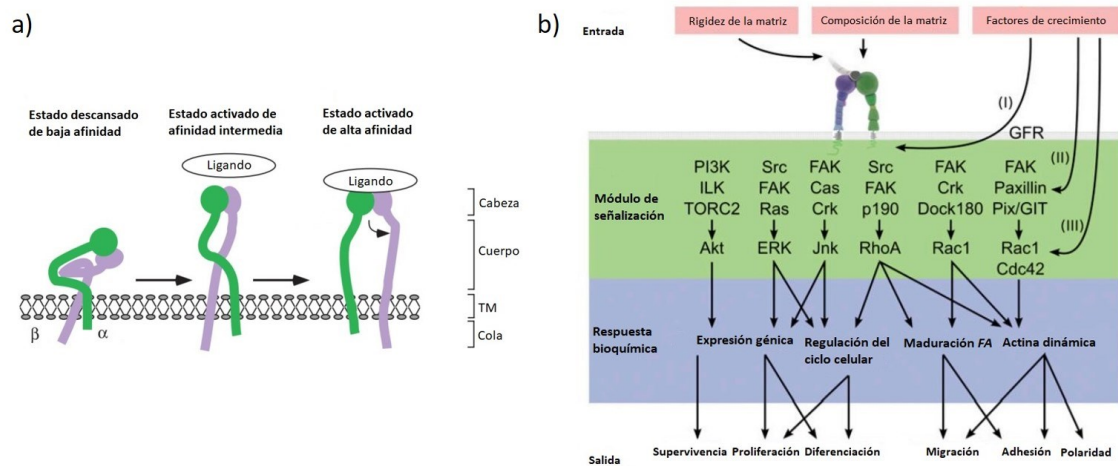


Figura 4. (a) Secuencia de activación de las integrinas. Figura tomada y modificada de Estevez *et al.*, 2015. (b) Vías de señalización activadas por las integrinas. Figura tomada y modificada de Legate *et al.*, 2009.

Otras proteínas implicadas en la comunicación célula-célula y célula-matriz importantes en el cartílago son las conexinas o proteínas formadoras de las uniones comunicantes (Figura 5, a) y panexinas (Figura 5, b). Las uniones comunicantes son uniones célula-célula que están formadas por seis conexinas que se unen para formar complejos llamados conexones, los cuales se unen a otro conexón de una célula adyacente (Figura 5, c). Las conexinas también pueden dar lugar a conexones, los cuales que comunican con la *ECM* dando lugar a hemicanales, aunque estas

conformaciones son más propias de las panexinas (Figura 5, d). A través de estos canales se pueden transmitir iones y moléculas de pequeño tamaño que regulan la actividad celular (Dbouk *et al.*, 2009). En los condrocitos del cartílago articular se ha descrito la presencia de altos niveles de conexina 43 (*gap junction alpha 1, GJA1*); también se han encontrado expresadas la conexina 32 (*gap junction beta 1, GJB1*), conexina 45 (*gap junction gamma 1, GJC1*) y conexina 46 (*gap junction alpha 3, GJA3*). Por otro lado, la panexina 3 (PANX3) está ampliamente expresada en las células del

sistema esquelético, pero también se encuentra en los condrocitos hipertróficos (Plotkin y Stains, 2015).

2.2 Estructura

El cartílago articular humano en los adultos se caracteriza por estar dividido en cuatro zonas: la zona superficial o tangencial, la zona intermedia o transicional, la zona profunda o radial y la zona calcificada (Figura 6).

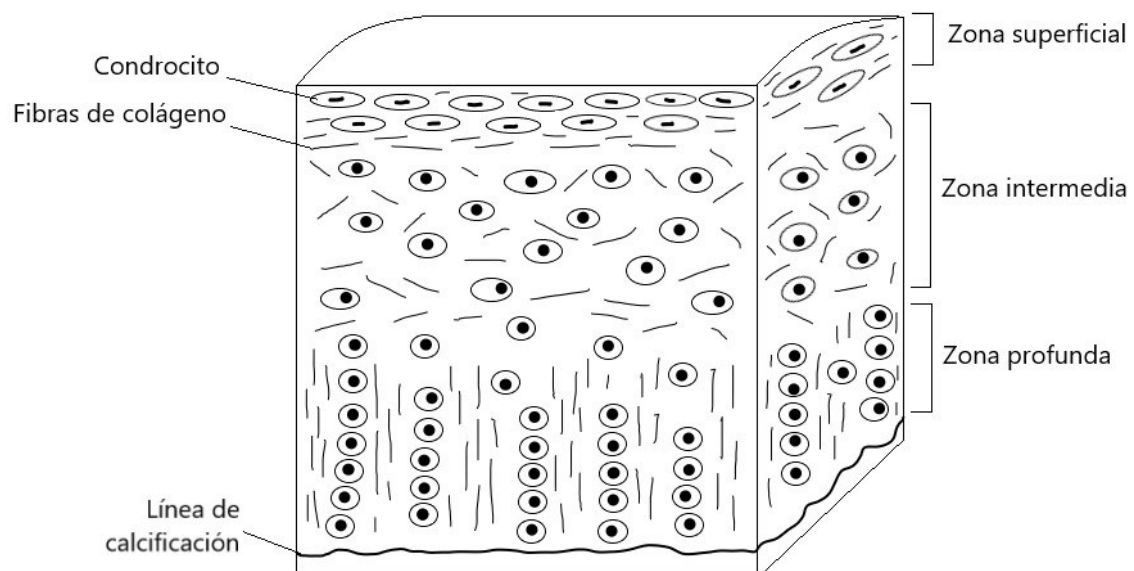


Figura 6. Estructura del cartílago articular humano adulto (Rodríguez-Pereira, 2020).

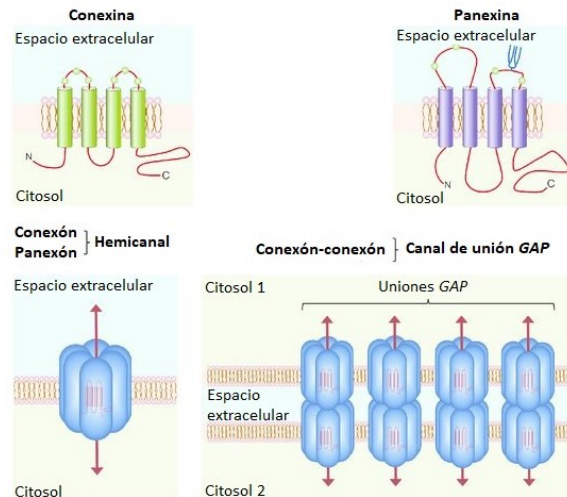


Figura 5. Esquema de la estructura de las (a) conexinas y (b) panexinas y (c) formación de hemicanales y (d) uniones GAP. Figura tomada y modificada de Gajardo-Gómez *et al.*, 2016.

La zona superficial es la región que está en contacto con el espacio articular y, por tanto, el líquido sinovial. Es la zona más resistente a la compresión con abundantes condrocitos y fibras de COL2 que se distribuyen paralelas a la superficie.

La siguiente zona que nos encontramos, a medida que profundizamos en el grueso del cartílago, es la zona intermedia. Ésta presenta unos condrocitos más redondeados distribuidos de un modo menos organizado. Las fibrillas de colágeno también se hayan menos organizadas con una orientación oblicua con respecto a la superficie.

A continuación, se halla la zona profunda, que se caracteriza por presentar condrocitos pequeños y redondeados que se organizan en columnas, con las fibrillas de colágeno dispuestas entre ellas y perpendiculares a la superficie.

Por último, el área más próxima al hueso es la zona calcificada. Esta franja se caracteriza por tener una *ECM* calcificada y condrocitos pequeños. Esta zona está separada de la zona profunda por la línea de calcificación, una línea regular, ondulada y muy calcificada. Por encima de la línea de calcificación está la línea de proliferación de los condrocitos, desde donde los condrocitos migran hacia la zona superficial a medida que se da la renovación del cartílago.

A causa de la estabilidad de la red de COL2, la elevada vida media de las moléculas de proteoglicanos y la baja actividad de las metaloproteinasas en el cartílago sano, el proceso de renovación del cartílago articular maduro es lento (Ross y Pawlina, 2007; Fox *et al.*, 2009; Brody, 2015).

2.3 Función biomecánica

Las principales funciones del cartílago articular son: (1) aportar una superficie lisa y lubricada que permita una baja fricción en la articulación y (2) facilitar la transmisión de fuerzas de carga hasta el hueso subcondral.

La lubricación de la superficie del cartílago tiene lugar a través de dos métodos: (1) la lubricina, glicoproteína que se encuentra en la superficie del cartílago articular y que permite una lubricación de barrera, independiente de la rigidez del cartílago y la viscosidad del líquido lubricante, en este caso, el líquido sinovial (Jay y Waller, 2014; Lee *et al.*, 2018); y (2) la lubricación película-fluido, que puede ser hidrodinámica (las superficies se deslizan entre sí y el líquido sinovial se comporta como una cuña que separa ambas superficies) o película-prensa (las superficies se mueven perpendicularmente entre sí y el líquido sinovial proporciona una resistencia viscosa que soporta altas cargas durante corta duración) (Figura 7) (Landínez-Parra *et al.*, 2012; Rodríguez-Camacho y Correa-Mesa, 2018).

La función de facilitar la transmisión de fuerzas de carga es posible gracias a la composición de la *ECM* del cartílago articular, la cual le confiere sus características biomecánicas. Cuando una fuerza llega a la superficie del cartílago, éste se comporta como un material bifásico: con una fase acuosa (el agua con iones) y una fase sólida (la *ECM*). La aplicación de fuerzas causa un incremento inmediato de la presión en el líquido intersticial, que fluye hacia fuera de la *ECM*. Esto es, el agua deja de interactuar con los grupos fosfato del agregano y pasa a localizarse entre las moléculas. Cuando la fuerza compresiva se relaja, el agua vuelve a fluir hacia la *ECM* y vuelve a interactuar con el agregano. Este comportamiento permite disipar fuerzas y disminuir los índices de fricción, permitiendo el correcto funcionamiento de la articulación (Carballo *et al.*, 2017).

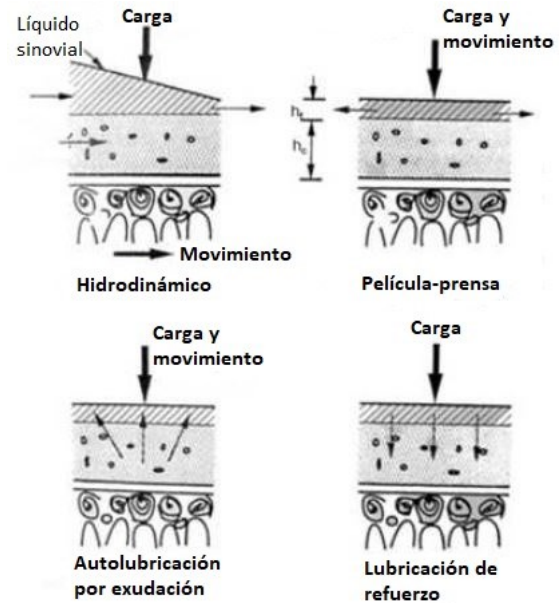


Figura 7. Métodos de lubricación y transmisión de las fuerzas de carga en el cartílago. Imagen tomada y modificada de Landínez-Parra *et al.*, 2012.

3 Lesiones focales en el cartílago articular humano

El cartílago articular humano presenta una limitada capacidad de regeneración, dada la limitada capacidad de los condrocitos maduros para formar suficiente *ECM*. La principal razón es la naturaleza avascular del cartílago articular humano que le impide formar un coágulo, primer paso de la reparación (Carballo *et al.*, 2017).

Las lesiones en el cartílago se pueden producir por impactos repetidos, traumatismos, o procesos de degeneración mecánicos progresivos. Se pueden encontrar tres tipos de lesiones: las lesiones limitadas a la zona superficial y media, las lesiones que llegan hasta el hueso subcondral pero no penetran en la médula ósea, y las lesiones que llegan hasta la médula ósea (Figura 8) (Simon y Jackson, 2006). Las lesiones que no penetran en la médula ósea son las más comunes en clínica y en ellas se ha observado muerte celular en los márgenes de la lesión, pero también se encuentra proliferación de las células, formación de agrupaciones de condrocitos y síntesis de *ECM*. Por otro lado, las lesiones que sí penetran en la médula ósea provocan un flujo de sangre y células mesenquimales estromales (*mesenchymal stromal cells, MSC*) que permiten la formación de un coágulo y estimulan un cierto grado de reparación. Aun así, no son capaces de emular la *ECM* del cartílago hialino, sólo obteniendo un cartílago fibroso con elevado

contenido en COL1 en proporción a COL2, no tan apropiado para realizar las funciones biomecánicas del cartílago articular humano (Carballo *et al.*, 2017).

Por otro lado, lesiones en el cartílago, el envejecimiento, la inflamación o causas genéticas derivan en una serie de cambios fisiológicos que pueden llevar al desarrollo de la OA. La OA resulta en la degeneración del cartílago articular, diversos grados de hipertrofia de los condrocitos y la membrana sinovial, remodelación del hueso subcondral, e inflamación crónica de la articulación y sistémica (Li *et al.*, 2017). Los últimos datos obtenidos en el estudio de la prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española (EPISER) 2016 indican que la prevalencia en España en personas de 40 años o más es del 10,10

% de OA cervical; 15,52% de OA lumbar; 5,13% de OA de cadera; 13,83% de OA de rodilla; y 7,73% de OA de mano. La OA es una enfermedad que causa una importante disminución de la calidad de vida en personas de avanzada edad.

4 Tratamientos para reparar lesiones de cartílago articular

Las lesiones en el cartílago mayores de 1 cm generan un aumento del estrés celular en el borde de la lesión. Esta situación, si no se controla o trata, puede provocar dolor e importantes limitaciones para el paciente en el futuro. Actualmente hay dos tipos de aproximaciones médicas a estas lesiones, las opciones no quirúrgicas y las quirúrgicas (Figura 9).

Las opciones no quirúrgicas se emplean para controlar los síntomas y disminuir la progresión de los cambios degenerativos asociados con el daño articular. Se dividen en dos grupos: (1) tratamientos no farmacológicos, que incluyen modificar estilos de vida del paciente, fisioterapia o ayudas ortopédicas; y (2) tratamientos farmacológicos, como fármacos antiinflamatorios, analgésicos, viscosuplementos e inyecciones locales de corticoesteroides (Simon y Jackson, 2006; Marcacci *et al.*, 2013).

Las opciones quirúrgicas empleadas dependerán de la etiología y cronicidad de la lesión, la edad, nivel de actividad y estado de salud general del paciente, el grado de la lesión, el número de lesiones, la integridad del ligamento y el menisco, y de los tratamientos previos recibidos. También se ha de tener en cuenta la profundidad, localización y forma de la lesión y el estado

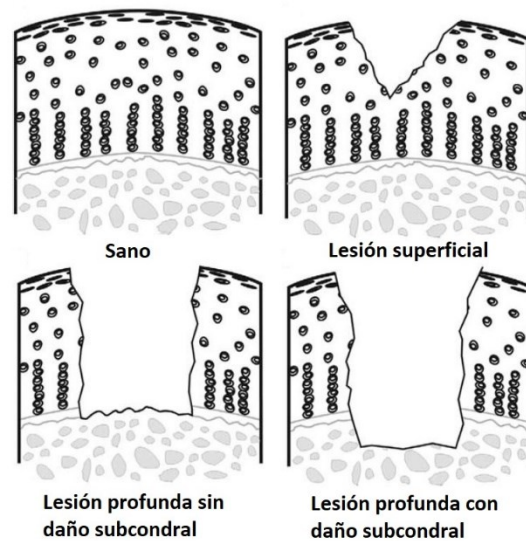


Figura 8. Tipos de lesiones de cartílago articular. Figura tomada y modificada de Simon y Jackson, 2006.

del cartílago articular que la rodea y del hueso subcondral inferior. Existen numerosas opciones quirúrgicas y su ratio de éxito variará dependiendo de los factores que se han mencionado anteriormente (Simon y Jackson, 2006).

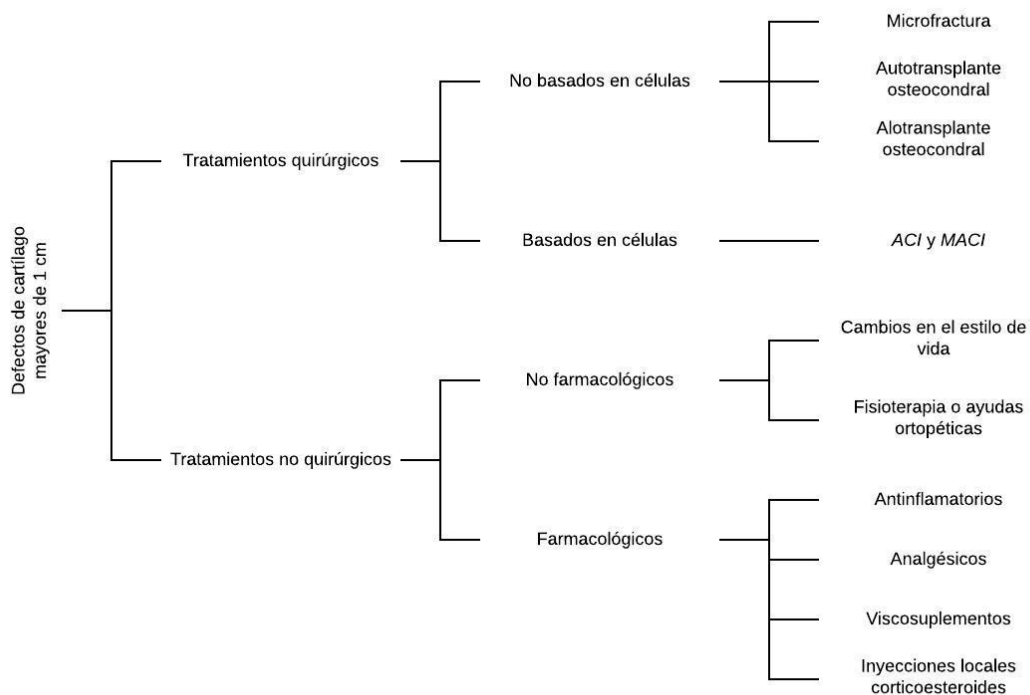


Figura 9. Aproximaciones médicas a las lesiones de cartílago articular mayores de 1 cm (Rodríguez-Pereira, 2020).

Dentro de las opciones quirúrgicas actuales encontramos dos grandes bloques: los tratamientos no basados en células y los tratamientos basados en células (Rossy y Strauss, 2017).

Los tratamientos no basados en células son la microfractura o estimulación de la médula ósea y los autotrasplantes y alotrasplantes osteocondrales.

- La microfractura consiste en penetrar el hueso subcondral con un punzón artroscópico para provocar el sangrado en el defecto articular, llevando a la migración de MSCs y factores de crecimiento que generarán un coágulo que promoverá la reparación formando cartílago fibroso. Sin embargo, como se dijo previamente, el cartílago fibroso no presenta las mismas cualidades que el cartílago hialino, lo que suele conllevar un rápido deterioro con el tiempo (Mithoefer *et al.*, 2005; Asik *et al.*, 2008; Erggelet y Vavken, 2016).
- Los autotrasplantes osteocondrales implican coger una porción de cartílago de una zona de la articulación del propio paciente que no soporte fuerzas y colocarlo en la zona

dañada. La principal limitación que presentan es el tamaño de la porción que se puede coger (Hangody *et al.*, 2008).

- Los alotrasplantes osteocondrales se basan en coger una porción de cartílago cadavérico y trasplantarlo a la lesión del paciente. Esto es posible gracias al ambiente privilegiado de inmunidad que presenta la articulación. Permiten coger una porción de cartílago mayor que los autotrasplantes, lo que los vuelve una buena opción con lesiones de un cierto tamaño o en las que el hueso esté dañado (Gross *et al.*, 2008; Demange y Gomoll, 2012; Nikolaou y Giannoudis, 2017).

Los tratamientos basados en células para el tratamiento de defectos del cartílago articular implican usar células específicas, normalmente condrocitos, para generar cartílago hialino. La implantación de condrocitos autólogos (*autologous chondrocyte implantation, ACI*) es un proceso en dos pasos. El primero consiste en obtener mediante artroscopia un trozo de cartílago sano de la zona sin carga de la articulación. De este cartílago se extraen los condrocitos y se expanden *in vitro* para pasar al segundo paso, consistente en implantar de nuevo los condrocitos expandidos en la zona dañada (Niemeyer *et al.*, 2016). Vanlauwe y colaboradores demostraron en un estudio clínico en pacientes con lesiones de cartílago una mayor eficacia del tratamiento con *ACI* respecto al tratamiento quirúrgico con microfractura en pacientes con lesiones entre 1 y 5 cm² a los 5 años de tratamiento (Vanlauwe *et al.*, 2011). También se demostró eficacia en lesiones mayores de 10 cm² y complejas (Ossendorf *et al.*, 2011).

De este tratamiento derivó la opción de implantar los condrocitos, pero en una *ECM* tridimensional de colágeno (*matrix induced autologous chondrocyte implantation, MACI*) (Jacobi *et al.*, 2011). Los estudios clínicos realizados mostraron una mejora de los pacientes con lesiones de cartílago sintomáticas de 3 cm² o superiores a los 5 años de seguimiento, en comparación con aquellos tratados con microfractura (Brittberg *et al.*, 2018). *MACI* es un tratamiento que está aprobado por la administración de control de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drugs Administration, FDA*) para su uso en la reparación de lesiones profundas de cartílago sintomáticas en adultos (*FDA*, 2019). La Agencia Europea del Medicamento (*European Medicines Agency, EMA*) también aprobó su uso en defectos de cartílago sintomáticos en 2013, sin embargo, desde julio del 2018 se encuentra retirado del mercado en la Unión Europea hasta que se registre un sitio de fabricación para la sustancia activa, el producto terminado y la liberación del lote (*EMA*, 2018).

Uno de los principales problemas tanto para el *ACI* como para el *MACI* es la necesidad de realizar dos operaciones al paciente, la primera para obtener la biopsia y la segunda para la

implantación. Otro de los problemas es que el cartílago obtenido es un cartílago fibroso que no conserva la estructura del cartílago nativo (Rossy y Strauss, 2017).

Chondrocelet es un tratamiento similar al *ACI* de primera generación que se basa en la implantación de condrocitos con un perfil de marcadores genéticos determinado para optimizar la posibilidad de que el cartílago obtenido sea hialino (Harris *et al.*, 2011). Fue aprobado por la *EMA* en el 2009 pero tuvo que ser retirado del mercado en 2016 (EMA, 2017a; Negoro *et al.*, 2018).

Asimismo, Spherex es otro tratamiento similar al *ACI* que se basa en la implantación de esferoides, agregados esféricos, de condrocitos. Este tratamiento está aprobado por la *EMA* desde el 2017 para defectos de cartílago de rodillas de adultos que tengan un área afectada menor de 10 cm² (EMA, 2017b). Ensayos clínicos con Spherex muestran su efectividad en pacientes con lesiones de hasta 10 cm² durante al menos 4 años, lo que supone una ventaja sobre *ACI* que estaría recomendado para lesiones de tamaños inferiores a 2 cm² (Armoiry *et al.*, 2019).

Cartistem® es un medicamento indicado para el tratamiento de defectos de cartílago de rodilla de pacientes con *OA* avanzada. Se basa en la administración de *MSCs* de cordón umbilical humano alogénicas junto con un hidrogel de ácido hialurónico y está aprobado desde el 2012 en Corea del Sur por el ministerio de seguridad alimentaria y de medicamentos (*Ministry of Food and Drug Safety, MFDS*) (MFDS, 2016). Los ensayos clínicos realizados muestran una mejora significativa de los pacientes tratados, en los cuales se observó al año, mediante artroscopia, tejido de reparación maduro y a los 2 años una mejora clínica, la cual persistía a los 7 años de la administración (Park *et al.*, 2017).

Finalmente, JACC es un tratamiento basado en la implantación de condrocitos autólogos embebidos en un gel de atelocolágeno (colágeno de origen marino). Este tratamiento fue aprobado para su uso clínico en el tratamiento de artritis traumáticas y osteocondritis disecante de la rodilla en Japón en 2012 (Negoro *et al.*, 2018; JTEC, 2019).

4.1 Nuevos tratamientos en ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos evolucionó a partir del desarrollo en el campo de los biomateriales, definiendo biomaterial como un material que interacciona con los sistemas biológicos. De este modo, la ingeniería de tejidos se refiere a la práctica que combina el uso de andamios, células y moléculas biológicamente activas para intentar obtener tejidos funcionales. El objetivo de la

ingeniería de tejidos es obtener constructos que permitan restaurar, mantener o mejorar tejidos dañados o incluso órganos enteros (NIBIB, 2020).

En este ámbito, las aproximaciones que se están estudiando en el tratamiento de las lesiones de cartílago van dirigidas al desarrollo de nuevos andamios, sin células o en combinación con células, y el estudio de diferentes terapias celulares y estímulos (Medvedeva *et al.*, 2018).

Las terapias celulares se basan en el trasplante de células humanas tanto células madre como células diferenciadas (Andia y Maffulli, 2019). La combinación de terapias ampliamente empleadas en clínica junto con nuevas aproximaciones puede llevar a la obtención de mejores resultados. Por ejemplo, la combinación de la microfractura con la inyección de MSCs de médula ósea (*bone marrow-MSC*, *BM-MSC*) y ácido hialurónico (AH) en comparación con la implantación de *BM-MSC* para el tratamiento de lesiones de rodilla sintomáticas, mostró una mejora de los pacientes en ambos casos a los 2 años (Lee *et al.*, 2012).

El uso de andamios sin células para la regeneración de cartílago se ve limitada por la necesidad de que el andamio induzca la migración de las células adyacentes del cartílago o la médula ósea para colonizarlo y regenerar el tejido (Medvedeva *et al.*, 2018). Por otro lado, el empleo de combinaciones de andamios junto con células es una buena alternativa. El uso de solo andamios se comparó con andamios más plasma rico en plaquetas (PRP) y andamios con *BM-MSC* en pacientes con defectos de cartílago profundos de rodilla; al año de implantación, el resultado fue mejor en el caso de los andamios con *BM-MSC* (Krych *et al.*, 2016).

Aún hay un amplio abanico de posibilidades por explorar dentro del tratamiento de las lesiones del cartílago. Es necesario seguir probando y evaluando nuevos tratamientos basados en células e ingeniería de tejidos para conseguir finalmente promover e inducir la regeneración del cartílago (Carballo *et al.*, 2017).

5 Células mesenquimales estromales

Las MSCs se describieron por primera vez en 1968 por el grupo de Friedenstein. Inicialmente se consideraron una subpoblación de células de la médula ósea con potencial osteogénico (Friedenstein *et al.*, 1968). No fue hasta 1991 cuando Caplan propuso que estas células pudieran ser células madre mesenquimales capaces de diferenciarse a todas las células de la línea del mesodermo (Caplan, 1991). Su capacidad de diferenciación multilínea la demostró posteriormente Pittenger en 1999 (Pittenger *et al.*, 1999). Entre la década de los 90 y el 2000 no hubo una terminología fija para definir estas células, lo que ocasionó que la comparación entre los estudios realizados fuera complicada (Keating, 2012; Caplan, 2017). Finalmente, en 2005, se

propuso denominarlas células mesenquimales “estromales”, dado que no todas presentaban las características de las células madre (Horwitz *et al.*, 2005).

5.1 Características

Los criterios mínimos para definir una *MSC* incluyen la capacidad de diferenciarse *in vitro* a los linajes condrogénico, adipogénico y osteogénico; la capacidad de adherirse a la superficie de cultivo (plástico); la expresión de CD73, CD90 y CD105; y la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos, CD14 o CD11b, CD19 o CD79, CD45 y HLA-DR (Dominici *et al.*, 2006; Keating, 2012).

Otra de las características de las *MSCs* es su efecto inmunomodulador tanto sobre el sistema inmune adaptativo como el innato, mediante la supresión de las células T (Laing *et al.*, 2019) y la maduración de las células dendríticas (Reis *et al.*, 2018), la reducción de la activación y proliferación de las células B (Fan *et al.*, 2016), la inhibición de la proliferación y citotoxicidad de las células NK (Reinders y Hoogduijn, 2014), y la promoción de la generación de células T reguladores a través del mecanismo de la interleuquina 10 (IL-10) (Lim *et al.*, 2016). Además de ser muy poco inmunogénicas, presentando niveles muy bajos del complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex, MHC*) de clase I y no presentando *MHC* de clase II. Tampoco expresan moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 o CD86, implicadas en la activación de las células T en el rechazo de trasplantes (Ryan *et al.*, 2005; Jacobs *et al.*, 2013). Estas características las vuelven células muy interesantes a la hora de emplearlas en ingeniería de tejidos y terapia celular para implantarlas en los pacientes (Chen *et al.*, 2011).

5.2 Capacidad de diferenciación

Las *MSCs* pueden diferenciarse hacia los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico, esto es, células de cartílago o condrocitos (Goldring *et al.*, 2006), células del hueso u osteoblastos (Valenti *et al.*, 2017) y células del tejido adiposo o adipocitos (Scott *et al.*, 2011).

5.2.1 Condrogénesis

La condrogénesis es el proceso que durante el desarrollo del sistema esquelético acaba con la formación del cartílago intermediario y que lleva a la osificación endocondral. Este proceso comienza por un reclutamiento y migración de las *MSCs*, posterior condensación y, por último, diferenciación hacia condrocitos para la maduración y formación del cartílago (Boyce *et al.*, 2018). Todo este proceso está altamente regulado a través de las interacciones de las células con la *ECM* circundante, además de factores de crecimiento y diferenciación, y otros factores del ambiente (Figura 10) (Goldring *et al.*, 2006).

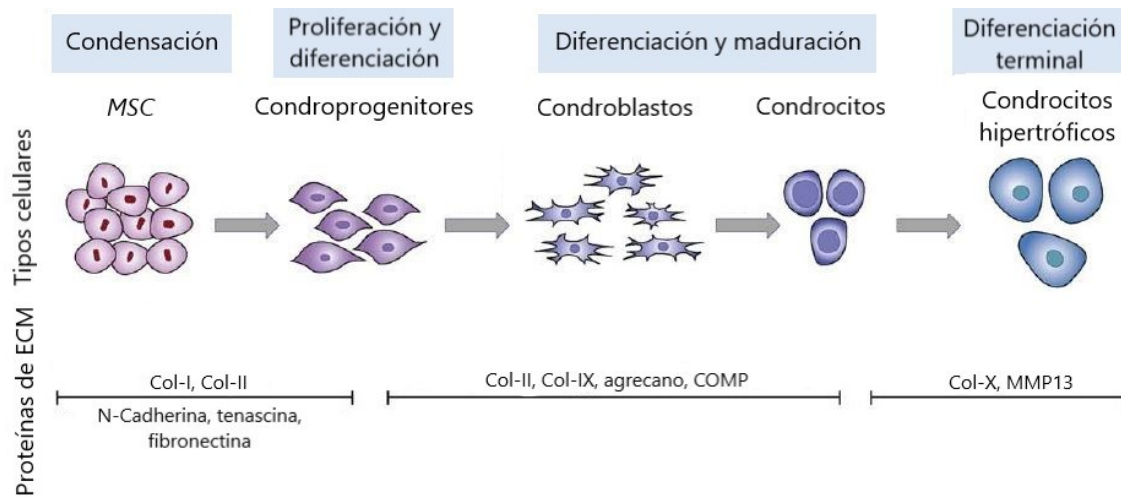


Figura 10. Diferenciación de las MSCs al linaje condrogénico. Figura tomada y modificada de Vinatier *et al.*, 2009.

Antes de la condensación, las MSCs precondrogénicas producen ECM rica en hialuronano y COL1, además de COL2. La iniciación de la condensación está asociada con un aumento de la actividad de la hialuronidasa y la aparición de moléculas de adhesión celular. Miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes β , principalmente factores de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β* , *TFG- β*) y proteínas morfogénicas óseas (*bone morphogenic protein*, *BMP*), son de las primeras señales en la condensación condrogénica y son esenciales para la diferenciación hacia condrocitos (Green *et al.*, 2015). Entre otras vías, *TFG- β* estimula la síntesis de Fn, molécula de la ECM, que interacciona con las moléculas de adhesión celular para activar las vías de las quinasas a través de adhesiones focales, iniciando así la transición de células condroprogenitoras hacia condrocitos (Goldring *et al.*, 2006).

La condensación de las MSCs depende de interacciones célula-célula y célula-matriz y está asociada con un aumento de la adhesión celular, formación de uniones comunicantes y cambios en la arquitectura del citoesqueleto (DeLise *et al.*, 2000; Collins y Nelson, 2015). Las uniones comunicantes y hemicanales tienen un papel crítico en la diferenciación de los condrocitos y desarrollo del esqueleto tanto en humanos como en otras especies vertebradas (Iwamoto *et al.*, 2013; Plotkin y Stains, 2015). Se ha descrito que las MSCs humanas expresan conexina 40 (*gap junction Alpha 5*, *GJA5*), *GJA1* y *GJC1* (Batra *et al.*, 2012). El bloqueo de las uniones comunicantes empleando ácido 18 α -glicirretínico inhibe la condensación de las MSCs y la diferenciación condrogénica mediada por la *BMP2* en cultivos *in vitro* de condrocitos de embriones de pollo (Zhang *et al.*, 2002). Además, se ha observado que, mediante la vía de señalización de *BMP2*, *GJA1* y *Smad1* promueven la diferenciación de las MSCs hacia cartílago e inhiben la diferenciación hacia osteoblastos (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, mutaciones en el gen de

GJA1 están asociadas a sindactilia en manos y pies, hipoplasia o aplasia de las falanges medias y anomalías craneofaciales y en la dentición de pacientes con displasia óculo-dento-digital (Richardson *et al.*, 2004).

La diferenciación hacia condrocitos se caracteriza por la deposición de *ECM* de cartílago, la cual contiene COL2, COL9, COL11, y agregano (Goldring *et al.*, 2006). El factor de transcripción nuclear región Y de determinación del sexo-caja 9 (*SRY*(sex determining region Y)-box 9, *SOX9*) es uno de los primeros marcadores expresados durante la condensación celular y estimula la expresión de COL2, COL9 y agregano, además de otros genes específicos de la diferenciación condrogénica. De este modo, *SOX9* regula la proliferación condrogénica y diferenciación mediante el control directo de la expresión de diversos genes específicos de condrocitos. Al mismo tiempo, inhibe la diferenciación osteogénica disminuyendo la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (*Runt-related transcription factor 2*, *RUNX2*), principal regulador de la osteogénesis (Green *et al.*, 2015).

El problema actual es detener la diferenciación condrogénica en el punto de condrocitos maduros no hipertróficos. La condrogénesis *in vitro* de las MSC promueve la formación de un fibrocartílago con elevada expresión de COL1 y células hipertróficas, como demuestra la elevada expresión de COL10, metaloproteasa de matriz 13 (*matrix metalloproteinase 13*, *MMP13*) y actividad fosfatasa alcalina (Pelttari *et al.*, 2008; Somoza *et al.*, 2014).

5.2.1.1 Hipertrofia y desdiferenciación

Se denomina hipertrofia al aumento del tamaño de un órgano debido a un engrosamiento en el tamaño de sus células. En el desarrollo de los vertebrados se da de forma no patológica durante el crecimiento en la placa epifisaria donde los condrocitos se diferencian y proliferan para posteriormente parar sus divisiones e hipertrofiarse (Tsang, Chan y Cheah, 2015). Durante el desarrollo de la *OA* este proceso ocurre de modo patológico derivando en alteraciones de la *ECM* del cartílago articular que afectan a la progresión de la enfermedad (Dreier, 2010). Asimismo, durante la diferenciación condrogénica de *MSCs in vitro* el tejido obtenido tiende a la hipertrofia y, pese a que diversos autores han trabajado en intentar detener esta vía celular, aún no se ha conseguido (Chen, Fu, Cong, H. S. Wu, *et al.*, 2015).

Por otro lado, la desdiferenciación es un proceso por el cual las células se revierten a un estado de menor diferenciación, tanto a niveles génicos, proteicos, morfológicos como funcionales. Este proceso se ha descrito ampliamente en condrocitos cuando son sembrados en monocapa y en enfermedades como la *OA* (Charlier *et al.*, 2019).

5.2.2 Osteogénesis y adipogénesis

Entre los linajes osteogénico y adipogénico existe una relación teóricamente inversa, de manera que la diferenciación hacia uno de los dos fenotipos ocurre a expensas del otro. El balance entre estos dos linajes está regulado por numerosas vías de señalización que convergen en dos factores de transcripción principales: *RUNX2* y receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ* , *PPAR γ*) (James, 2013).

5.3 Fuentes de MSCs

Las MSCs se pueden aislar de diversos tejidos (Keating, 2012): membrana sinovial (Fernandes *et al.*, 2018), tejido adiposo (Wu *et al.*, 2017), médula ósea (Charbord, 2010); pero también de la sangre (Pouryazdanpanah *et al.*, 2018), la placenta (Pelekanos *et al.*, 2016), de la sangre del cordón umbilical (Bieback y Netsch, 2016), perivasculares del cordón umbilical (Ennis *et al.*, 2008) y de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (Varaa *et al.*, 2019), de la pulpa dental (Yasui *et al.*, 2017), del fluido amniótico (Spitzhorn *et al.*, 2017) y de la leche materna (Sani *et al.*, 2017).

Con respecto a la capacidad de adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis de las MSCs dependiendo de su fuente de obtención, hay diversas opiniones y resultados, no estando clara una ventaja o desventaja hacia ninguna (Strioga *et al.*, 2012). Hay varios grupos que describen una mejor capacidad condrogénica *in vitro* por parte de las MSCs de la médula ósea (Danisovic *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2008); sin embargo, también hay grupos que no observan diferencias entre las MSCs de médula ósea y tejido adiposo (Kern *et al.*, 2006). Puede que estas diferencias vengan dadas por una diferente respuesta de las células a los estímulos empleados cuando se induce la condrogénesis *in vitro*, y a una falta de acuerdo en cuál es el mejor método de inducción en cada caso (Diekman *et al.*, 2010; Puetzer *et al.*, 2010).

5.3.1 Médula ósea

El primer tejido del que se aislaron MSCs fue la médula ósea (Friedenstein *et al.*, 1968) y se ha considerado este tejido como su principal fuente de obtención hasta la fecha. Esto hace que sean las MSCs más estudiadas y caracterizadas (Charbord, 2010). En general, se ha observado que las células de este origen presentan una tasa de crecimiento menor a otras, por ejemplo, las procedentes del tejido adiposo o cordón umbilical, y un mayor potencial osteogénico (Strioga *et al.*, 2012).

En la médula ósea existen relativamente bajas cantidades de MSCs, alrededor del 0,001%-0,01% de todas las células nucleadas que la constituyen. Este porcentaje, además, disminuye con el

envejecimiento, de tal modo que en pacientes de mayor edad el número de *MSCs* será menor (Strioga *et al.*, 2012).

5.3.2 Tejido adiposo

Las *MSCs* se pueden aislar del tejido adiposo, y esto otorga la posibilidad de obtenerlas mediante un procedimiento relativamente sencillo y de un tejido que es de acceso más fácil. Algunos autores describen que las *MSCs* provenientes de tejido adiposo ejercen una función regulatoria del sistema inmune mayor que las *MSCs* de otras fuentes, convirtiéndolas en unas candidatas muy interesantes para la terapia celular. Sin embargo, presentan un perfil muy heterogéneo a la hora de producir citoquinas y en sus receptores de expresión, lo que hace necesario escoger adecuadamente la población a usar en cada caso (Wu *et al.*, 2017).

5.3.3 Membrana sinovial

Las *MSCs* se pueden aislar de fragmentos descartados durante la artroscopia de la membrana sinovial. Las *MSCs* sinoviales presentan una buena tasa de proliferación y un fuerte potencial condrogénico, y menor hipertrofia que las provenientes del hueso. Estas características las convierten en una fuente de *MSCs* interesante para la ingeniería de tejidos en el ámbito de la regeneración de cartílago, sobre todo teniendo en cuenta que las artroscopias son procedimientos realizados de modo relativamente rutinario en casos de lesiones articulares (Fernandes *et al.*, 2018).

5.4 Líneas celulares

Dadas las dificultades que se presentan a veces para obtener cantidades suficientes de células primarias de pacientes y la heterogeneidad de las células obtenidas, y por tanto diversidad en la respuesta, surge la necesidad de realizar los estudios *in vitro* preliminares con líneas celulares (Obinata, 2007).

Las líneas celulares son cultivos celulares establecidos que proliferarán indefinidamente mientras se le aporte medio adecuado y espacio. Son células inmortalizadas. Las líneas celulares han ido asumiendo un papel muy importante a la hora de estudiar la fisiología, patofisiología y procesos de diferenciación de células específicas, dado que permiten estudiar alteraciones de la estructura, biología y genética de las células en un ambiente controlado (Ulrich y Pour, 2001; Obinata, 2007; Dove, 2014).

La inmortalización de las líneas celulares se consigue cuando éstas evitan la senescencia al cabo de múltiples divisiones celulares. Esto se puede conseguir a través de la inactivación de ciertos

genes: *p53* encargado del control del crecimiento celular, *p16* encargado de regular el ciclo celular y conocido por su potencial supresor de tumores y *pRb* inhibidor del ciclo celular; pero también mediante la inducción de la expresión ectópica de la telomerasa o la transcriptasa reversa de la telomerasa (*telomerase reverse transcriptase*, *TERT*). *TERT* permite la elongación de los telómeros, regiones finales de los cromosomas que contienen ácido desoxirribonucleico (ADN) altamente repetitivo, lo que aumenta la estabilidad de los cromosomas haciendo las células inmortales. Otro método de establecer la immortalización de las células es mediante el uso de oncogenes y oncoproteínas que silencien los puntos de control y reguladores del ciclo celular. Estas modificaciones genéticas se pueden llevar a cabo gracias al uso de vectores virales que se introducirán en las células modificando su material genético (Maqsood *et al.*, 2013).

Sin embargo, la manipulación genética limita su uso en los estudios de biología molecular, dado que los cambios genéticos sufridos pueden dar lugar a cambios en su respuesta a la diferenciación y transformación (Pan *et al.*, 2009; Kaur y Dufour, 2012).

En esta tesis doctoral se han usado dos líneas celulares humanas de *MSCs* de médula ósea: la 3a6-*hMSCs* y la 127TT-*hMSCs*.

5.4.1 3a6-*hMSCs*

La línea celular 3a6-*hMSCs* fue generada por el grupo del Dr. Hung a partir de aspirado de médula ósea de una paciente de 61 años del Hospital General de Taipei. Las 3a6 se obtuvieron a partir de la línea celular KP, generada mediante la immortalización con un vector retroviral de transducción que expresaba las proteínas E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16. Posteriormente, las KP se transfectaron con el gen de la *TERT* humana (*hTERT*) para obtener la línea celular 3a6 (Hou *et al.*, 2010).

La caracterización de esta línea permitió observar que las células 3a6 presentaban características propias de las células madre embrionarias, pudiendo derivar en células de los linajes neurogénicos y mesenquimales. La inducción de la adipogénesis, la osteogénesis y la condrogénesis fue viable. Mediante tinciones de cultivos 3a6 con medios de inducción osteogénica, condrogénica y adipogénica se observó: a los 14 días, una tinción de aceite rojo O que evidenciaba diferenciación adipogénica; y a los 21 días, una tinción con Von-Kossa que evidenciaba diferenciación osteogénica, y una tinción con azul alcian que evidenciaban una diferenciación condrogénica (Hou *et al.*, 2010). Por otro lado, la inducción de esta línea hacia el linaje neuronal dio lugar al día 1 a la extensión de neuritas, las cuales crecieron de los 3 a los 5 días según continuaba la estimulación de la diferenciación neuronal. Durante este periodo de tiempo también se pudo observar un incremento en la expresión proteica de marcadores

neuronales como la β -tubulina III, *neuronal nuclei (Neu-N)* y proteína asociada a microtúbulo 2 (*Microtubule associated protein 2, MAP2*); y la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de enolasa específica de neuronas (*neuron-specific enolase, NSE*), *homeobox 3* pituitaria (*pituitary homeobox 3, PITX3*) y receptor nuclear asociado 1 (*nuclear receptor related 1, NURR1*). Al mismo tiempo, los marcadores de *MSCs* fueron disminuyendo (Yu *et al.*, 2011). Otros estudios posteriores indicaron que el cultivo con medio de inducción condrogénica incrementaba la expresión de COL2 en las células 3a6, aunque también incrementaba la expresión de COL1 (Fernández-Moreno *et al.*, 2016).

5.4.2 127TT-hMSCs

La línea celular 127TT-hMSCs se obtuvo y caracterizó en el grupo de investigación de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Dra. Silvia Díaz Prado, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña. Esta línea celular se obtuvo a partir de *MSCs* procedentes de la médula ósea de la cabeza femoral de un paciente de 67 años con patología OA al que se le llevó a cabo una intervención de reemplazo de cadera.

6 Biomateriales y andamios para la ingeniería de tejidos del cartílago

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos actuales en el ámbito de la regeneración de cartílago en muchos casos no son suficientes para reparar las lesiones lo que deja espacio para nuevas terapias y métodos alternativos (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016). Los biomateriales se definen como cualquier material, no fármaco, que interacciona con el tejido vivo y realiza una función específica sin causar efectos adversos (Masaeli *et al.*, 2019). Los andamios se definen como estructuras fabricadas a partir de biomateriales sintéticos o naturales en las que el tejido crece para imitar un proceso biológico fuera del cuerpo o para reemplazar un tejido enfermo o dañado dentro del cuerpo (NIBIB, 2020). Dependiendo de las características del biomaterial con el que se construya el andamio, este tendrá propiedades específicas y podrá tener diversas funciones: medir biomarcadores y ayudar en el diagnóstico de enfermedades; mejorar la función de un tejido; o sustituir parcial o totalmente un tejido u órgano dañado. Se están desarrollando y estudiando nuevos andamios que no solo pretenden restaurar la estructura y la función del tejido dañado, sino también regenerarlo a través de vías activas e interacciones dirigidas (Masaeli *et al.*, 2019).

Se están intentado desarrollar andamios que imiten la *ECM* del cartílago y permitan restaurar la función en la zona del defecto, pero aún no existe un modo fiable y con las características funcionales adecuadas para reestablecer superficies de cartílago de un modo duradero. Para intentar aproximarse más a este objetivo está la ingeniería de tejidos, intentando emular los

pasos que se dan durante el desarrollo embrionario para obtener cartílago. De este modo, se combinan células, andamios y estímulos biológicos para generar constructos tisulares. Para conseguir producir implantes viables para la regeneración de cartílago, lo que se busca es controlar el ambiente para conseguir replicar el que hay en el cartílago nativo. Sin embargo, pese a los avances en la capacidad para emular el ambiente nativo y mejorar la producción de *ECM* de cartílago, los constructos obtenidos actualmente no conservan la estructura estratificada propia del cartílago ni son mecánicamente funcionales, lo que hace que no sean adecuados para el uso clínico (Vinatier *et al.*, 2009; Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016).

6.1 Características de los andamios

Independientemente del tejido biológico que se quiera regenerar, los requerimientos mínimos para cualquier andamio con el fin de que sea adecuado para aplicaciones en ingeniería de tejidos son: biocompatibilidad con el huésped; biodegradabilidad que permita su reemplazo con tejido nativo; permeabilidad o porosidad para la difusión e intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos; y propiedades mecánicas adecuadas para el tejido diana. Además, en el caso del cartílago, debería permitir la recreación de las dos fases del cartílago, tanto líquida como sólida; reproducir su organización zonal; y facilitar la integración del nuevo tejido formado con el adyacente nativo (Armiento *et al.*, 2018). Para que un andamio cumpla con estos requisitos se deben tener en cuenta sus propiedades biológicas, estructurales y su composición química a la hora de diseñarlo (Rai *et al.*, 2017; Eltom *et al.*, 2019).

Asimismo, entre los problemas que pueden tener los andamios para la regeneración del cartílago están la desdiferenciación de los condrocitos, una supervivencia escasa de las células, la muerte celular, la pérdida de células, una distribución incorrecta de las células dentro del andamio, una diferenciación celular pobre y una integración en el tejido inadecuada (Rai *et al.*, 2017).

6.1.1 Características estructurales

Los tejidos biológicos son estructuras altamente complejas con una estructura tridimensional que presenta a su vez funciones mecánicas diversas. Los andamios generados mediante ingeniería de tejidos deben tener propiedades mecánicas similares a las del tejido diana original. En el caso del cartílago deberían tanto aguantar las fuerzas de compresión como evitar la fricción, además de poder integrarse con el tejido cartilaginoso circundante y presentar una durabilidad equivalente a la esperanza de vida del paciente (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016). Para tener unas propiedades mecánicas adecuadas es fundamental diseñar las características estructurales del andamio correctamente (Eltom *et al.*, 2019).

Por lo tanto, algunos aspectos clave a tener en cuenta son la arquitectura del poro y porosidad del biomaterial, la elasticidad, los parámetros de energía superficial, la movilidad de las moléculas dentro del andamio y la micro- y nanotopografía, siendo también fundamental la forma del andamio. En general, se está derivando al diseño de andamios tridimensionales (3D) preferentemente a los bidimensionales (2D) dado que permiten un mejor mantenimiento de la estructura y diferenciación celular, otorgando un ambiente más parecido al del tejido vivo (Puppi *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2017).

6.1.2 Características biológicas

Las características biológicas de los andamios vendrán dadas en parte por los biomateriales empleados en su fabricación. Los aspectos biológicos de los biomateriales incluyen sus propiedades de biocompatibilidad y no toxicidad. Biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para existir en armonía con el tejido circundante dentro de un huésped. Esto es, que ni su presencia en el cuerpo ni los productos de su degradación generen una respuesta no deseada del sistema inmune y que permita la regeneración del tejido (Ratner, 2016).

Los biomateriales tienen una capacidad limitada de generar un intercambio de señales con el tejido o medio que los rodee, lo que limita sus capacidades biológicas. Para mejorar su capacidad biológica pueden incorporarse los biomateriales bioactivos que promueven la interacción con las células, la migración o la diferenciación (Dormer *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2019). También, pueden ayudar a evitar una respuesta inmune, por ejemplo, disminuyendo la actividad de las células *natural killer* (NK) o la inmunidad mediada por las células T y B (Boehler *et al.*, 2011; Andorko y Jewell, 2017); o mejorar la integración del andamio con el tejido circundante (Khan *et al.*, 2008).

6.1.3 Composición química

Dependiendo de la composición química del biomaterial empleado se obtendrán diferentes respuestas a los pH y temperatura ambiente, velocidades de degradación del biomaterial y productos generados a partir de dicha degradación (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016). Por otro lado, las propiedades superficiales del biomaterial como la topografía, la hidrofobicidad y la carga superficial son factores que controlan la adhesión, migración, mantenimiento del fenotipo y señalización intracelular de las células *in vitro*, así como el reclutamiento celular y el proceso de curación en la zona de interacción entre el tejido y el andamio (Puppi *et al.*, 2010).

Actualmente, la mayoría de los biomateriales empleados en la regeneración de cartílago son polímeros, definidos como biomateriales sintetizados a partir de macromoléculas formadas por monómeros unidos mediante enlaces covalentes; y son biodegradables, es decir, que se van eliminando poco a poco. La clave de estos biomateriales es encontrar el punto en el que el biomaterial se vaya eliminando al mismo ritmo que la *ECM* del cartílago se va generando y sustituyéndolo (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016).

El estudio de la superficie de los polímeros permite mejorar la función de los andamios y diseñar materiales capaces de interactuar con el ambiente mediante reconocimiento biomolecular. El futuro de los andamios está focalizado en obtener superficies bioactivas que ayuden no solo dando un patrón para que el tejido se pueda ir formando, sino también estímulos que ayuden durante este proceso (Puppi *et al.*, 2010).

6.2 Clasificación de los biomateriales

Tradicionalmente los biomateriales se clasificaban en base a su composición química en metálicos, poliméricos, cerámicos y composites. Esta clasificación es simple y limitada, no teniendo en cuenta las muchas características y cualidades diferentes que pueden tener entre sí los materiales (Parida *et al.*, 2012).

Actualmente se propone un nuevo método de clasificación más inclusivo que permite tener en cuenta los aspectos clave de los biomateriales aportando una descripción de los diferentes tipos e interacciones de los biomateriales con el tejido que los rodea. Esta clasificación propone incluir la composición química (metálicos, poliméricos, cerámicos y composites), el origen (naturales, sintéticos y semisintéticos), las dimensiones (macrométrico, micrométrico y nanométrico), la interacción con el tejido vivo (bioactivo y bioinerte), la biodegradabilidad (bioestable y biodegradable), la integridad estructural (poroso y no poroso), la aplicación objetivo (diagnóstico, terapia, prevención, restauración y regeneración), el lugar de aplicación (extracorpóreo e intracorpóreo) y la duración del contacto con el cuerpo (limitada, si es menor a un día; prolongada, si es entre un día y treinta días; y permanente, mayor de treinta días) (Tabla 1) (Masaeli *et al.*, 2019).

Tabla 1. Clasificación de los biomateriales. Tabla tomada y modificada de Masaeli *et al.*, 2019.

Bases de clasificación	Clases de biomateriales
Composición química	Metálicos, poliméricos, cerámicos y composites
Origen	Naturales, sintéticos y semisintéticos
Dimensiones	Macrométrico, micrométrico y nanométrico

Interacción con los tejidos vivos	Bioactivo y bioinerte
Biodegradabilidad	Bioestable y biodegradable
Integridad estructural	Poroso y no poroso
Objetivo de la aplicación	Diagnóstico, terapia, prevención, restauración y regeneración
Lugar de aplicación	Extracorpóreo e intracorpóreo
Duración del contacto con el cuerpo	Limitada, prolongada y permanente

Los biomateriales poliméricos biodegradables, naturales o sintéticos, son los más estudiados en el ámbito de la regeneración de cartílago (Rai *et al.*, 2017):

- Los biomateriales naturales más comunes son los polisacáridos, los polinucleótidos y las proteínas.
- Los biomateriales sintéticos más usados son el ácido poliláctico (*polylactic acid, PLA*), el ácido poliglicólico (*polyglycolic acid PGA*), el poli (ácido láctico-co- ácido glicólico) (*poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA*) y la policaprolactona (PCL).

6.2.1 Ácido poli L-láctico

El ácido poli L-láctico (*poly L-lactic acid, PLLA*) es una de las formas del *PLA*. Se ha usado para aplicaciones clínicas de un modo seguro desde hace 30 años, en suturas, implantes óseos e implantes de tejido blando. El *PLLA* es un polímero sintético biodegradable y biocompatible que se elimina por la misma vía metabólica que el ácido láctico, secretándose *in vivo* a través de la vía respiratoria y por filtración renal (Fitzgerald *et al.*, 2018). Su velocidad de degradación y propiedades mecánicas y físicas son ajustables cambiando el peso molecular o la proporción de copolímero, lo que los vuelve materiales fácilmente adaptables a las necesidades de cada tejido (Puppi *et al.*, 2010). El *PLLA* es un polímero semicristalino, con una cristalinidad de entre el 40-50%, temperatura de fundición entre 170-180°C y temperatura de transición a cristal de entre 55-80°C. Estudios *in vivo* han mostrado que el *PLLA* es altamente cristalino y puede degradarse completamente a los 2-5 años (Nair y Laurencin, 2007). Por otro lado, presenta una tensión de rotura de alrededor de 40-70 MPa y un alargamiento de rotura del 1-8 %. En base a estas características el *PLLA* puede llegar a soportar tensiones de hasta 40-70 MPa, dependiendo de su composición y cristalinidad, antes de que su sección transversal se contraiga de manera significativa, y al ser sometido a dichas tensiones puede estirarse hasta un 1-8% (Middleton y Tipton, 2000; Narayanan *et al.*, 2016).

Numerosos estudios han demostrado la utilidad del *PLLA* como biomaterial para la regeneración de cartílago. De este modo, se ha observado que las *MSCs* sembradas en membranas de *PLLA* tratadas con quimioquina ligando 2 y 3; moléculas de adhesión como la molécula de adhesión vascular 1 o la P-selectina; y moléculas de la *ECM* como Fn y colágeno tipo IV (COL4), presentaban una mejor adhesión al biomaterial (Weeks *et al.*, 2012). Por otro lado, el sembrado de condrocitos de articulación y nasoseptales en andamios de *PLLA* mostró un aumento de la expresión de los marcadores de cartílago COL2, *SOX9* y ACAN a los 14 días (Conoscenti *et al.*, 2017). Asimismo, la combinación de andamios de *PLLA* con otras moléculas puede mejorar sus características haciéndolos más adecuados para la ingeniería de tejidos. De tal modo que, el uso de andamios de *PLLA* con la matrilina 3, una molécula no colágena de la *ECM* del cartílago, mejoró el microambiente del andamio permitiendo que las *MSCs* sembradas se diferenciaron condrogénicamente a los 21 días sin llegar a hipertrofiarse. La implantación subcutánea en ratones de estos andamios permitió observar que *in vivo* también mantenían las propiedades condrogénicas evitando la hipertrofia y la osificación endocondral (Liu *et al.*, 2018).

Por tanto, el *PLLA* es un biomaterial biodegradable y no tóxico que ha dado resultados prometedores en pruebas previas con *MSCs* y condrocitos, lo que lo hace un material interesante en la fabricación de andamios para la regeneración de cartílago.

6.2.2 Policaprolactona

La PCL es un poliéster alifático lineal, susceptible a sufrir hidrólisis auto-catalizada. A causa de su naturaleza semicristalina e hidrofobicidad, su velocidad de degradación es lenta, dado que su ordenación y empaquetación macromolecular retrasan que los fluidos la penetren. Estas características hacen que el PCL sea un buen material para el desarrollo de implantes que deban durar periodos de tiempo largos (Funabashi *et al.*, 2009; Puppi *et al.*, 2010). La PCL presenta una temperatura de fundición de entre 59-64°C y una temperatura de transición a cristal de -60°C (Middleton y Tipton, 2000). Por otro lado, presenta una tensión de rotura de alrededor de 23 MPa y un alargamiento de rotura muy elevado siendo superior a 700% (Nair y Laurencin, 2007). Estas propiedades, junto con su baja viscosidad fundido, lo vuelven un material fácil de procesar y muy útil en técnicas de impresión 3D (Funabashi *et al.*, 2009; Malikmammadov *et al.*, 2018).

Los andamios de PCL se han estudiado ampliamente en ingeniería de tejidos de cartílago. El uso de andamios híbridos de PCL con *ECM* formada gracias al co-cultivo, dentro de dichos andamios, de *MSCs* y condrocitos durante 7, 14 y 21 días y posterior descelularización, mostró un aumento de la expresión de ACAN, COL2 y una disminución de la proporción de COL2/1 con respecto al

cultivo solo en andamios de PCL de MSCs (Levorson *et al.*, 2014). El uso de andamios híbridos de PCL con politetrahidrofurano también mostraron resultados prometedores, observándose tanto *in vitro* como *in vivo* la inducción de la condrogénesis de las MSCs y un aumento de la regeneración de la superficie del cartílago dañada (Jiang *et al.*, 2019).

Dadas las características descritas y los prometedores resultados con MSCs y condrocitos durante el estímulo de la condrogénesis, el PCL es un material interesante para el diseño de andamios 3D para su aplicación en regeneración de cartílago.

6.3 Diseño de andamios

Durante el diseño de un andamio para ingeniería de tejidos deben tenerse en cuenta varios factores fundamentales y uno de ellos es la posibilidad de fabricarlo en 2D o 3D. Los cultivos en 2D han predominado desde hace años, sin embargo, con el paso del tiempo se ha ido derivando hacia los cultivos en 3D, con ambientes más realistas bioquímica y biomecánicamente. No obstante, los cultivos 3D presentan muchos retos, como la interacción tejido-tejido, el microambiente mecánico y la distribución espaciotemporal del oxígeno, los nutrientes y los desechos metabólicos, entre otros (Duval *et al.*, 2017).

En los cultivos en monocapa 2D, las células tienen acceso a una cantidad similar de nutrientes y factores de crecimiento presentes en el medio, lo que lleva a una proliferación y crecimiento homogéneo, y esto aporta simplicidad y eficiencia al cultivo. Para estimular diferentes vías metabólicas celulares se han empleado nanopatrones y micropatrones que cambian la bioactividad de las células; sin embargo, también obligan a las células a presentar una polaridad apical-basal que no es natural en muchas de ellas, por ejemplo, en las MSCs. Esta polaridad altera la migración, la expansión y la capacidad de detectar factores solubles y otras señales del microambiente. Aparte de los posibles patrones o modificaciones superficiales en estos cultivos, también es importante la rigidez de la superficie, viéndose afectada la capacidad de adhesión, la migración y la diferenciación (Akhmanova *et al.*, 2015; Duval *et al.*, 2017).

Las células en el cuerpo humano se organizan en estructuras 3D, y esto hace que los cultivos de este tipo puedan emular más efectivamente la situación *in vivo*. Los cultivos 3D van desde el cultivo en esferoides o agregados celulares hasta en andamios de biomateriales, y permiten comunicaciones célula-matriz y célula-célula similares a las encontradas en los seres vivos. Sin embargo, mientras la parte más externa de estos cultivos 3D presenta un mayor crecimiento celular, el interior presenta un alto número de células quiescentes o necróticas, por la diferente distribución de los nutrientes, oxígeno y acumulación de productos de deshecho. Un buen diseño de un andamio deberá promover la proliferación, la migración, la producción de ECM y

la diferenciación, pero también una correcta distribución de los factores solubles, los nutrientes y el oxígeno para solventar estos problemas (Duval *et al.*, 2017). En el caso de la condrogénesis, por ejemplo, es crucial la agregación celular de las MSCs para que se inicie, por lo que un cultivo en 3D es fundamental para una correcta diferenciación (Kim *et al.*, 2016).

Otro factor fundamental a tener en cuenta en el diseño del andamio es la porosidad, tanto por su tamaño y su forma como por su interconectividad. La porosidad influirá en la capacidad de las células para migrar dentro del andamio e interactuar entre ellas, en la difusión de los nutrientes y oxígeno y en la eliminación de productos de desecho, pero también en la capacidad del andamio de soportar fuerzas (Loh y Choong, 2013). Hay un gran número de estudios que buscan encontrar el tamaño de poro óptimo para la diferenciación condrogénica (Im *et al.*, 2012; Di Luca *et al.*, 2016; Ferlin *et al.*, 2016; Nava *et al.*, 2016; Gupte *et al.*, 2018). El grupo de Gun-Il Im en 2012 estudió tres tamaños de poros diferentes: 100 μ m, 200 μ m y 400 μ m, en andamios de PCL para la diferenciación condrogénica de MSCs de tejido adiposo, observando que, pese a que los andamios con los poros de tamaño más pequeño eran los que presentaban mayor crecimiento celular a 21 días, los andamios con el poro de 400 μ m eran los que presentaban mayor producción de proteoglicanos y expresión de *SOX9* y *COL2A1*, seguido de los andamios con el poro de 200 μ m (Im *et al.*, 2012). Sin embargo, el grupo de Michele M. Nava en 2016 publicó resultados en los que comparaban andamios de poli-L-láctico-co-trimetileno carbonatado con tres tamaños de poro diferente: de 50 a 100 μ m, de 100 a 150 μ m y de 150 a 200 μ m. Observaron que, a medida que aumentaba el tamaño de poro y la porosidad del andamio, aumentaba la densidad celular, llegando a aumentar hasta un 50%, pero a su vez disminuía la síntesis de proteínas de *ECM* de cartílago hasta un 40%. Este efecto lo asociaron a que un poro de diámetro más pequeño obligaba a las células a agregarse y creaba un ambiente con un cierto nivel de hipoxia, lo que estimulaba que las células produjeran dicha *ECM* (Nava *et al.*, 2016). Posteriormente, el grupo de Melanie J. Gupte en 2018 implantaron subcutáneamente andamios de PLLA con cuatro tamaños de poro diferentes, con un mínimo de 60 μ m y máximo de 600 μ m, en ratones y observaron que, mientras los andamios de poro de mayor tamaño eran infiltrados por los vasos circundantes, los de menor tamaño no. Llegando así a la conclusión de que los andamios de poro más pequeño fomentaban la diferenciación condrogénica *in vitro* y la formación de cartílago *in vivo*, evitando la osificación endocondral del tejido neoformado al no permitir el crecimiento capilar (Gupte *et al.*, 2018).

Asimismo, los biomateriales empleados en la fabricación de los andamios también pueden ser modificados física y bioquímicamente para mantener ventajas o para superar desventajas propias de las características fisicoquímicas del biomaterial. Las modificaciones físicas se

refieren a cambios mediante métodos como la compresión, filtración e irradiación con luz ultravioleta (UV), que pueden cambiar la porosidad y las propiedades biomecánicas del material y, por tanto, modificar la respuesta de las células y su capacidad para ayudar en la regeneración del cartílago. Las modificaciones bioquímicas pueden ser la unión a la superficie de péptidos, la fabricación de biocristales, la adición de AH o quitosano, entre otros. Estas modificaciones permiten que los andamios tengan mejor biocompatibilidad, por ejemplo, disminuyendo la hidrofobicidad y mejorando la capacidad de adhesión celular; y que puedan aportar un microambiente adecuado donde las células puedan crecer y proliferar (Cao *et al.*, 2014).

Finalmente, el método de fabricación que se escoja permitirá obtener unas características u otras del andamio. *Spin coating* es una técnica de fabricación de andamios 2D comúnmente empleada. Esta técnica permite obtener láminas de biomaterial al centrifugar a altas velocidades una solución de un biomaterial y un solvente, que gracias a la fuerza centrípeta y la tensión superficial generada se repartirá uniformemente sobre la superficie que se escoja. Después de que el solvente se evapore, el resultado será una lámina que irá de unos pocos nanómetros a unos micrómetros de grosor, dependiendo de la velocidad y la aceleración empleadas durante la fabricación (Ossila, 2020).

Otro método de fabricación es la técnica de fabricación aditiva de andamios mediante deposición de material fundido (*Fused Deposition Modeling, FDM*). Esta técnica se basa en la extrusión de un material fundido a través de un cabezal con un diámetro determinado siguiendo un patrón, de manera que el andamio se irá construyendo capa a capa (Yilmaz *et al.*, 2019). La velocidad de extrusión (Geng *et al.*, 2019), la temperatura de extrusión y la temperatura de la cama de deposición dependerán del material empleado y del resultado final que se desee (Gajdos y Slota, 2013). La forma más empleada de *FDM* es la extrusión de un filamento de material (*Fused Filament Fabrication, FFF*), pero también se está evolucionando hacia el uso de la inyección de material (*Inkjet*), que permite tener un hidrogel con células con el que hacer la bioimpresión. Ambos sistemas tienen ventajas y desventajas: el *FFF* es fácil de usar, tiene buenas propiedades mecánicas y no necesita ningún tipo de solvente, sin embargo, necesita de un filamento, no es fácilmente usable con células y los materiales usados deben ser termoplásticos. En el caso de *Inkjet* que se puedan imprimir las células y el hidrogel a la vez es una gran ventaja, además de que permite incorporar fácilmente fármacos y biomoléculas, sin embargo, la cantidad de biomateriales que se pueden emplear es limitada y la resolución y las propiedades mecánicas del constructo obtenido son bajas (Gu *et al.*, 2016).

6.3.1 Diseño de andamios para la regeneración de cartílago

En base a lo mencionado en apartados anteriores, se puede concluir que para la regeneración de cartílago se necesita diseñar andamios a partir de biomateriales que aporten un ambiente 3D que apoye el crecimiento celular, la deposición de *ECM* y que permita la regeneración tisular en una estructura zonal como la del cartílago nativo. Por lo tanto, un andamio ideal para la regeneración de cartílago debería satisfacer los siguientes criterios (Zhang *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2019) (Tabla 2):

- Biocompatible minimizando la respuesta del huésped y maximizando el crecimiento celular y la integración con el cartílago.
- Porosidad e interconectividad adecuadas que permita la migración de las células y el intercambio eficiente de nutrientes y productos de desecho.
- Biodegradable con una velocidad de reabsorción adecuada de tal modo que, inicialmente sea una estructura de soporte para las células y que gradualmente se degrade a medida que se va formando el nuevo cartílago.
- Condroconductividad permitiendo el desarrollo del cartílago y estimulando la reparación del tejido circundante.
- Condroinductividad induciendo la correcta diferenciación condrogénica de las *MSCs*.
- Propiedades mecánicas adecuadas que permitan el crecimiento tisular mientras es sometido a cargas mecánicas.

Tabla 2. Propiedades deseadas de los andamios diseñados mediante ingeniería de tejidos para la correcta regeneración del cartílago. Tabla tomada y modificada de Bassi *et al.*, 2011.

Propiedades deseadas	Ventajas
Biocompatible	No inmunogénico
	No tóxico
Porosidad	Permite la infiltración de células y nutrientes
	Permite la eliminación de desechos
	Aumenta la superficie de adherencia de las células y proliferación
Biodegradable	Estructura temporal para la adhesión y proliferación de células
	Degradación a medida que se forma nuevo cartílago
	Elimina la necesidad de nuevas cirugías invasivas
	Productos de degradación no tóxicos y fácilmente secretados a través de vías metabólicas
Condroconductividad	Permite el crecimiento del cartílago y estimula la reparación del cartílago circundante

Condroinductividad	Induce la diferenciación de <i>MSCs</i> hacia condrocitos maduros
Propiedades mecánicas	Estable durante su manejo en la cirugía
	Capaz de soportar las cargas a las que es sometido el cartílago

Teniendo en cuenta que cada zona del cartílago tiene unas propiedades bioquímicas y mecánicas diferentes, aún no se ha conseguido desarrollar un andamio adecuado que cumpla con todos los requisitos necesarios (Koh *et al.*, 2019).

6.3.2 Funcionalización de andamios

Los andamios pueden funcionalizarse con proteínas o péptidos superficiales con el fin de mejorar la adhesión, la proliferación o la diferenciación celular en los materiales porosos (Cao *et al.*, 2014). Asimismo, podrían emplearse para conseguir propiedades que de otro modo el andamio no tendría como, por ejemplo, capacidad antibacteriana (Zaccaria *et al.*, 2018).

Los péptidos superficiales son moléculas bioactivas que permiten la modificación bioquímica de la superficie de los andamios (Cao *et al.*, 2014). Los péptidos presentan ventajas con respecto a las proteínas en su empleo para funcionalizar superficies. Las proteínas pueden causar reacciones del sistema inmune al haber sido obtenidas de otro organismo y purificadas, y son propensas a sufrir degradación enzimática y por lo tanto se precisa de su renovación constante si se desea un estímulo continuado. Además, su orientación variará dependiendo de la superficie en función de la carga, hidrofobicidad y topografía, resultando en diferencias en la capacidad de reconocerlas. Los péptidos, en comparación, presentan una mejor estabilidad, pueden ser empaquetados de un modo más condensado lo que compensaría una posible disminución de la actividad de adhesión celular. Además, al ser el péptido solo la secuencia de interés se evita tener respuestas no selectivas (Hersel *et al.*, 2003).

Mediante la funcionalización de los andamios con péptidos se puede aumentar el reclutamiento celular en el lugar de implantación. Por ejemplo, la conjugación covalente del péptido EPLQLKM (E7) a un andamio de PCL y su posterior implantación en una rodilla de rata con *MSCs* endógenas permitió observar a los 7 días un aumento del reclutamiento de *MSCs* por parte del andamio *in vivo* (Shao *et al.*, 2012).

Este tipo de funcionalización puede ayudar en la mejora de la adhesión y proliferación, mientras ayuda a mantener las características propias del condrocito sin que sufra hipertrofia. La conjugación del péptido TATVHL a andamios de quitosano, óxido de polietileno y quitina mejoró la proliferación de condrocitos bovinos de rodilla y la producción de glucosaminoglicanos y

colágeno (Kuo y Wang, 2012). Mientras que los andamios híbridos de polietileno óxido y quitosano funcionalizados con CDPGYIGSR mejoraban la adhesión y el mantenimiento del fenotípico de los condrocitos bovinos de rodilla sembrados (Kuo y Wang, 2011).

Por otro lado, la secuencia peptídica RGD es una de las más usadas en este tipo de modificación de la superficie de los andamios. Su unión a las fibras de fibroína mejora su adhesión a los condrocitos además de permitir mantener el fenotipo condrogénico de los mismos (Kambe *et al.*, 2010). La funcionalización de andamios de poli (3- hidroxibutarato-co-3-hidroxihexonato) con la proteína de unión polihidroxialcanato fusionada con RGD (PhaP-RGD) promueve la proliferación y diferenciación condrogénica de las células MSCs de sangre de cordón umbilical después de 7 y 14 días de cultivo (Li *et al.*, 2015).

6.3.2.1 Fibronectina

La Fn es una molécula que existe normalmente en forma de dímero de dos subunidades idénticas de 250 kDa unidas covalentemente cerca de su extremo C-terminal por un par de uniones disulfuro. Es una molécula expresada por múltiples tipos celulares y se encarga de mediar una amplia variedad de interacciones celulares con la ECM, jugando un papel importante en la adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celular (Figura 11) (Pankov, 2002).

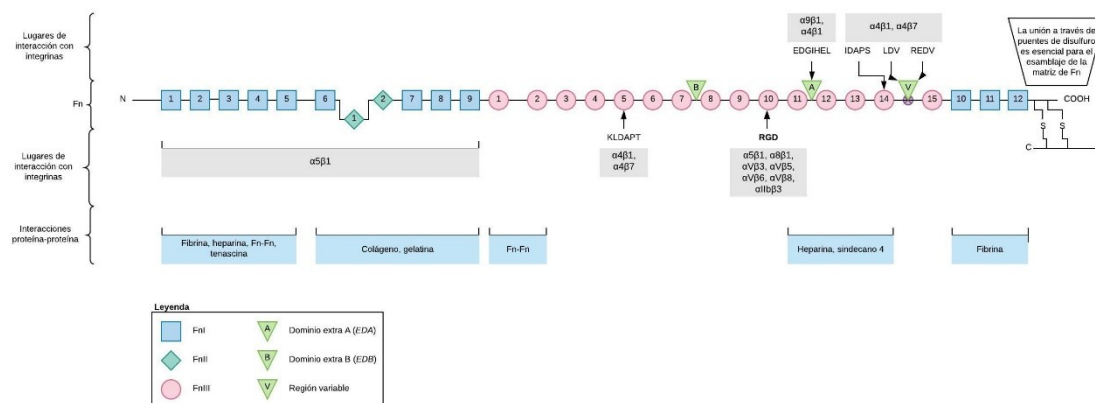


Figura 11. Estructura de la Fn con lugares de interacción con integrinas e interacciones proteína-proteína (Rodríguez-Pereira, 2020).

Pese a que la Fn no es considerada una proteína principal del cartílago, está presente durante la diferenciación condrogénica y en el cartílago maduro. Su expresión es abundante en el tejido mesenquimal en desarrollo y aumenta durante la condensación celular tanto *in vivo* como *in vitro*. La Fn presenta un pico de expresión durante la diferenciación temprana y posteriormente disminuye, aunque permanece detectable mientras los proteoglicanos y el COL2 se acumulan. Durante la diferenciación condrogénica la Fn interacciona con numerosas proteínas y se le atribuyen principalmente tres posibles funciones (Singh y Schwarzbauer, 2012):

- Promover la proliferación celular durante la condrogénesis.
- Actuar como un andamio estructural para la adhesión celular y la diferenciación.
- Modificar la expresión génica de las células durante la condrogénesis a través de la interacción de la Fn con las integrinas. Las vías de señalización quinasas reguladas por la señal extracelular (*extracellular signal regulated kinase, ERK*) y Rho GTPasa pueden ser activadas por la Fn y han sido relacionadas con la condrogénesis. De este modo, se ha observado que la inhibición o bloqueo de la formación de la matriz de Fn bloqueaba a su vez la condensación celular de las *MSCs* y de la línea celular condrogénica ATDC5 (Singh y Schwarzbauer, 2014).

Asimismo, la Fn podría tener también un papel en la organización de la *ECM* del cartílago. Se ha observado que la matriz de Fn promueve la deposición de colágenos y otras proteínas. La inhibición del ensamblaje de la matriz de Fn o la interferencia con las proteínas que se unen a la Fn causa un descenso en la incorporación de proteínas a la *ECM*. Esta dependencia de la Fn sugiere que la organización de sus fibras dirige la orientación de la deposición de la *ECM* del cartílago y, de algún modo, proporcionan una organización espacial durante el desarrollo de éste (Singh y Schwarzbauer, 2012).

Estudios con cultivos de células madre subcondrales humanas en agregados de alta densidad celular en presencia de Fn, *TFG-β3* o una combinación de ambos demostraron que la Fn aumentaba significativamente la migración y proliferación celular, además de aumentar la expresión de COL2. Sin embargo, no se encontraron evidencias de que mediara la diferenciación condrogénica (Kalkreuth *et al.*, 2014).

La Fn puede ser ligando para numerosas proteínas receptoras de la familia de las integrinas. Las integrinas son receptores heterodiméricos de la superficie celular que unen la *ECM* con el citoesqueleto intracelular (Pankov, 2002). No presentan ninguna actividad enzimática intrínseca, pero, después de unirse a ligandos extracelulares y sufrir cambios conformacionales, activan vías de señalización de quinasas citoplasmáticas y generan cambios en el citoesqueleto celular (Tian *et al.*, 2015).

Las integrinas reconocedoras de Fn, más concretamente la secuencia RGD de la Fn son $\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha11\beta3$, $\alphaV\beta3$, $\alphaV\beta5$, $\alphaV\beta6$ y $\alphaV\beta8$ (Barczyk *et al.*, 2010). Entre ellas, $\alpha5\beta1$ ha sido muy estudiada durante el desarrollo condrogénico por su papel en la migración celular (Veevers-Lowe *et al.*, 2011) y para la supervivencia de las células (Pulai *et al.*, 2002).

La Fn es, por tanto, una proteína de la *ECM* de gran importancia al estar implicada en la adhesión celular y, en cierta medida, en la diferenciación condrogénica a través de su reconocimiento a

través de las integrinas por las células. Su empleo en la funcionalización de andamios permitirá mejorar la adhesión celular a dichos andamios y ayudar en la diferenciación de las *MSCs* hacia condrocitos y formación de una *ECM* cartilaginosa.

6.3.2.2 Secuencia RGD

La secuencia más estudiada de la Fn es el tripéptido RGD (Figura 12). El reconocimiento de este tripéptido por las integrinas es complejo y depende de los residuos que lo flanqueen, su presentación 3D y las características propias del bolsillo de unión a las integrinas (Pankov, 2002). Sin embargo, se ha observado que las células son capaces de reconocerlo y generar una respuesta pese a que se presente sin el resto de la molécula de Fn (Hersel *et al.*, 2003; Connelly *et al.*, 2011). De tal modo que, el uso de andamios de alginato con el péptido RGD inmovilizado en su superficie durante la inducción

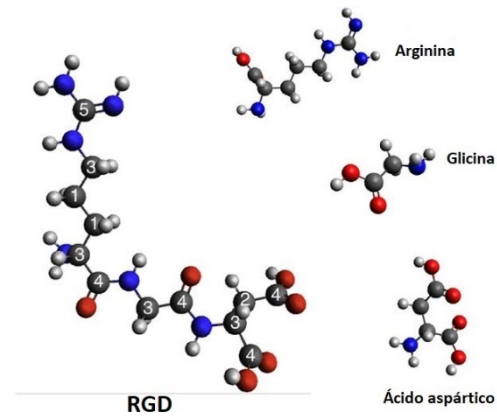


Figura 12. Modelo de RGD, arginina (R), glicina (G) y ácido aspártico (D). Las esferas negras representan el carbono, las rojas el oxígeno, las azules el nitrógeno y las blancas el hidrógeno. Figura tomada y modificada de Wagstaffe *et al.*, 2019.

de la condrogénesis de *MSCs* con TFG- β 1 generó una respuesta más prolongada en el tiempo a dicho estímulo y permitió una progresión de la diferenciación de las *MSCs* hacia cartílago más estable (Re'em *et al.*, 2010).

Por otro lado, también se ha observado que la disposición sobre la superficie del tripéptido RGD puede generar respuestas diferentes de las células. La siembra de *MSCs* en hidrogeles de polietilenglicol con diferentes nanopatrones de superficie que iban desde 37 a 124 nm de distancia entre los péptidos de RGD, dieron lugar a diferencias en la adhesión celular, la proliferación y la inducción osteogénica y adipogénica en las células (Wang, Yan, *et al.*, 2013). Asimismo, el cultivo de *MSCs* sobre láminas de poliacrilato con diferentes distribuciones del RGD y diferentes grupos funcionales mostró que, dependiendo de la disposición, se generaban respuestas muy diferentes en las células. Con la correcta disposición y grupos funcionales, se pudo estimular la diferenciación condrogénica con aumento de la expresión de *SOX9*, *ACAN* y *COL2* (Glennon-Alty *et al.*, 2013).

Se podría por tanto concluir que, el RGD es un péptido de interés en el ámbito de la regeneración del cartílago con el fin de estimular la diferenciación condrogénica, y que su disposición sobre la superficie puede causar diferentes respuestas al generar diferentes nanopatrones a reconocer por las células. La funcionalización de la superficie del andamio con RGD debería, al igual que en

el caso de la Fn, estimular la adhesión celular y favorecer la diferenciación de las MSCs hacia condrocitos mediante su reconocimiento a través de las integrinas.

6.3.2.3 Dendrímeros

Los dendrímeros son polímeros de tamaño nanométrico altamente ramificados (Figura 13). Son macromoléculas 3D, globulares y monodispersos, que se sintetizan a través de una serie de pasos repetitivos. Dichos pasos pueden consistir en primero crear las ramas y posteriormente unirlos a un núcleo, es decir, síntesis divergente; o, a partir de un núcleo principal ir añadiendo ramas, síntesis convergente. La elevada cantidad de ramificaciones permite tener en cada extremo un grupo funcional diferente, presentando una alta densidad y una menor viscosidad (Gupta y Nayak, 2015).

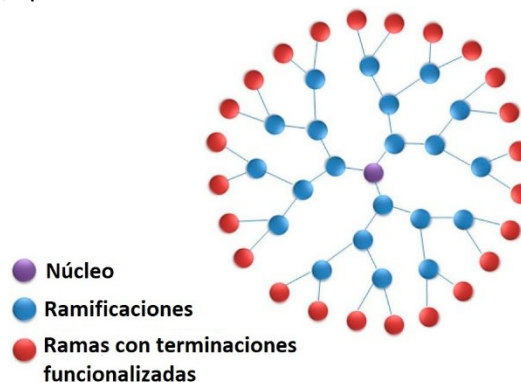


Figura 13. Esquema de la estructura de los dendrímeros. Figura tomada y modificada de de Araújo *et al.*, 2018.

Entre los dendrímeros comerciales disponibles más usados se encuentran los de poliamidoamina (PAMAM). Éste fue el primer dendrímero sintetizado y comercializado, lo que conlleva que sea el mejor estudiado y caracterizado. El núcleo del PAMAM está compuesto por moléculas de cadena lineal que contienen principalmente grupos aminos. Los compuestos más comunes son etilendiamina, amoníaco o cisteamina. Para aumentar la generación de este núcleo dendrítico, es decir, ramificar más la molécula, es necesario un proceso repetitivo de dos pasos: un primer paso que genera grupos éster terminales y un segundo paso que consiste en la amidación de los grupos éster mediante la aplicación de etilendiamina (de Araújo *et al.*, 2018).

Estos dendrímeros tienen múltiples posibles aplicaciones, desde el transporte de fármacos hasta su aplicación para funcionalizar superficies poliméricas dando como resultado diferentes respuestas celulares. De este modo, por ejemplo, se ha demostrado que conjugados de PAMAM pegilada con péptido de afinidad de condrocitos son capaces de internalizarse en los condrocitos y permanecer durante más tiempo en la cavidad articular en ratas *in vivo*, en comparación con el mismo dendrímero, pero sin el péptido de afinidad de condrocitos. Esto demuestra que estas moléculas podrían ser útiles como agentes nanotransportadores intraarticulares (Hu *et al.*, 2018). El uso de superficies de poliestireno funcionalizadas con dendrímeros de PAMAM de quinta generación sembradas con MSCs permitió observar a los 7 días de cultivo, tanto con medio basal como de diferenciación condrogénica, la agregación de dichas células y la

producción de COL2 mientras la producción de COL10 permanecía en niveles no detectables. A los 21 días la producción de COL2 era aún más patente pero la de COL10 se volvía detectable. Por el contrario, en la superficie sin funcionalizar de poliestireno las células permanecieron sin mostrar agregación (Wongin *et al.*, 2017). Además, dendrímeros de quinta generación funcionalizando superficies de poliestireno demostraron tener la capacidad de evitar en cierta medida la hipertrofia de los condrocitos humanos sembrados, obteniendo finalmente una lámina de condrocitos con una elevada actividad condrogénica. Esto podría emplearse como una técnica de cultivo alternativa para condrocitos humanos que tendría un gran potencial para la implantación de condrocitos autólogos (Wongin *et al.*, 2018).

El empleo de dendrímeros con RGD unido a cada extremo funcional para funcionalizar andamios permitirá exponer un mayor número de sitios de unión a la vez, lo que podría traducirse en una respuesta de las MSCs incrementada y una mejora en la inducción de la condrogénesis.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

El cartílago articular hialino es un tipo de tejido conjuntivo avascular y aneural, compuesto por condrocitos y una abundante *ECM* muy especializada. Este tejido presenta una limitada capacidad de regeneración, lo que conlleva que las lesiones en el cartílago, envejecimiento, inflamación o causas genéticas puedan derivar en una serie de cambios fisiológicos que lleven al desarrollo de la *OA*, siendo esta una de las principales causas de incapacidad laboral y una de las razones más comunes para visitar al médico de cabecera (Li *et al.*, 2017). Los tratamientos actuales de las lesiones de cartílago articular no son suficientemente eficaces para restaurar su función o aliviar el dolor en la articulación a largo plazo. Esto genera nuevas oportunidades para el diseño de tratamientos innovadores, basados en productos de ingeniería de tejidos o en terapia celular, que pueden inducir de un modo más eficaz la formación de un cartílago funcional (Medvedeva *et al.*, 2018). Las *MSCs* son células candidatas para este propósito gracias a su potencial condrogénico y antiinflamatorio. Numerosos estudios han reportado la generación de tejido similar al cartílago a partir de estas células. Sin embargo, ninguno ha logrado la formación de una *ECM* de naturaleza hialina y con arquitectura zonal como la que se forma durante el desarrollo del cartílago nativo (Carballo *et al.*, 2017).

Diversos estudios han descrito que durante las fases iniciales de la condrogénesis la condensación de las *MSCs* tiene lugar, originando una disminución marcada del espacio intercelular, y la formación de un gran número de contactos célula-célula del tipo uniones comunicantes y uniones célula-matriz mediante la formación de adhesiones focales (Collins y Nelson, 2015); manteniéndose esta interconectividad celular en el cartílago adulto (Plotkin y Stains, 2015). Por otro lado, se han descrito diversos sistemas biodegradables (2D y 3D) para el implante de células, aportando un soporte estructural y mecánico. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el impacto de la formación de redes intercelulares durante el proceso condrogénico en la calidad del tejido formado. En este sentido es de crucial importancia aportar un ambiente apropiado que, además de favorecer un anclaje celular, permita el establecimiento y mantenimiento de las interacciones célula-célula y célula-matriz, para su subsecuente trasplante en las áreas dañadas. Se han desarrollado diferentes tipos de transportadores celulares con arquitecturas variadas dependiendo de la necesidad, desde nanoesferas hasta membranas y andamios 3D, para su uso en ingeniería de tejidos (Bernhard y Vunjak-Novakovic, 2016; Masaeli, Zandsalimi y Tayebi, 2019). Las membranas transportadoras son un tipo de andamio 2D que permite el transporte de células desde su expansión *in vitro* hasta su lugar de implantación. En trabajos anteriores se han empleado membranas transportadoras de Au(111) funcionalizadas con diferentes nanopatrones de RGD anclado covalentemente a dendrímeros, observándose que en membranas con concentraciones

mayores, y por tanto un nanopatrón caracterizado por una menor distancia entre moléculas, se fomentaba una mayor maduración y formación de adhesiones focales en fibroblastos murinos (Lagunas *et al.*, 2014). Estos estudios han sido fundamentales para comprobar la versatilidad del nanopatrón con dendrímeros y sus efectos en la agregación celular, lo que podría ser útil en etapas tempranas de la condrogénesis, favoreciendo la condensación celular. Es necesario entender el papel de las uniones comunicantes y adhesiones focales durante la condrogénesis de las MSCs, y de este modo buscar un método que nos acerque a la posibilidad de guiar a las células mediante nanopatrones superficiales hacia la formación de un cartílago hialino implantable en el lugar de la lesión con el fin de ayudar en la regeneración del tejido.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, para realizar este trabajo se ha planteado la hipótesis de que las uniones comunicantes y adhesiones focales ejercen un papel fundamental durante la condrogénesis y, por tanto, es posible dirigir las MSCs hacia la condrogénesis y la formación de cartílago hialino a través de un nanopatrón superficial de RGD tanto en andamios 2D como 3D.

OBJETIVOS

En base a estas premisas, el objetivo principal de este proyecto ha sido el estudio y caracterización de andamios 2D y 3D funcionalizados con RGD-cys-D1 para su aplicación en ingeniería de tejidos para tratar lesiones de cartílago articular humano.

Para la consecución del objetivo planteado en este estudio, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Evaluar el potencial condrogénico de membranas transportadoras de *PLLA* con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1.

Objetivo 2. Evaluar la función de las uniones comunicantes y focales en la diferenciación condrogénica de las *MSCs* humanas.

Objetivo 3. Evaluar el potencial condrogénico de andamios 3D de *PCL* funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité Autnómico de Ética da Investigación de Galicia (CAEIG). Las biopsias de tejido humano a partir de las que se aislaron las células procedieron de muestras depositadas en la Colección de muestras para la investigación de enfermedades reumatológicas, registrada en el Registro Nacional de Biobancos, Sección de Colecciones, con el Código de Registro: C.0000424. Dichas muestras procedieron de donaciones de pacientes del Sistema Gallego de Salud (SERGAS), previa obtención del consentimiento informado según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. Se garantiza la confidencialidad de los datos identificativos de dichos pacientes, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

1 Aislamiento y cultivo de células mesenquimales estromales

Las MSCs primarias humanas se obtuvieron de la médula ósea de cabezas femorales procedentes de operaciones de artroplastia y amablemente donadas por los pacientes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), previamente aceptado el consentimiento informado. Se emplearon células de tres pacientes artrósicos (*osteoarthritis*, OA) y tres pacientes no artrósicos (no OA).

Para obtenerlas, la médula ósea se lavó con suero ringer lactato (Grifols, España) usando una aguja estéril 19G 1'' (BD Microlance, España) y una jeringa de 20 ml estéril (BD Discardit, España). A continuación, se filtró con un filtro *Nylon Net Filters* de 60 μm (Merck, Alemania) acoplado a otra jeringa estéril de 60 ml (Sol-Millennium Medical, Inc., Alemania) y se centrifugó a 300 $\times g$ 10 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en su medio de mantenimiento, constituido por *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Lonza, EEUU) suplementado con suero bovino fetal (SBF; Gibco, EEUU) al 20%, penicilina (100 unidades/ml) y estreptomina (100 mg/ml) (PE; Gibco, EEUU) al 1%. Se mantuvieron en cultivo en estufa (Thermo electron corporation, EEUU) a 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa. A las 48 h se realizó un cambio del medio de mantenimiento para eliminar de este modo las células no adherentes. Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días.

Para eliminar los macrófagos y fibroblastos de estos cultivos se empleó la técnica de *preplating* (Richler C. and Yaffe D. 1970). Para ello, se levantaron las células de la superficie de cultivo con 0,5% tripsina-EDTA (Gibco, EEUU) 2X durante 2-3 min, se inactivó con el suero ringer y se mantuvo en la estufa durante 15 min, permitiendo así la adhesión de los fibroblastos y macrófagos, pero no las MSCs. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 300 $\times g$ durante 10 min. A continuación, se resuspendió el *pellet* celular obtenido en el medio

de mantenimiento previamente descrito y se volvieron a mantener en la estufa. La técnica de *preplating* sólo se realizó en el primer y segundo pase.

2 Aislamiento y cultivo de condrocitos

Los condrocitos primarios humanos se obtuvieron del cartílago de la cabeza femoral de operaciones de reemplazo de cadera e igualmente donadas por los pacientes del CHUAC tras la aceptación del consentimiento informado. Se usaron células de tres pacientes OA y tres no-OA.

Para obtenerlos, se aisló el cartílago de la cabeza femoral con un bisturí (Swann-Morton, Inglaterra) y se procedió a una primera digestión mecánica que consistió en el troceado del tejido. Posteriormente, los trozos se trasvasaron a un tubo cónico de polipropileno de 50 ml (Falcon, EEUU) y se añadió tripsina 1x, dejándola actuar durante 10 min a 37°C en agitación. Tras este tiempo, se eliminó la tripsina y se añadió colagenasa IV (Sigma-Aldrich, Alemania) a 37°C y se dejó actuar de 12 a 16 h en agitación. Al día siguiente, la suspensión se filtró con un filtro de 100 µm (Falcon, EEUU) y se centrifugó a 300 xg 10 min. El número de células del *pellet* obtenido se contó en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania) y se sembró en medio de mantenimiento constituido por *DMEM* suplementado con SBF al 10% y PE al 1%. Se mantuvieron en la estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa. Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días.

3 Cultivo de 3a6-hMSCs

La línea celular 3a6-hMSCs fue generada por el laboratorio del grupo Dr. Hung a partir de MSCs aisladas de aspirado de médula ósea de una mujer de 61 años donante del Hospital de Veteranos de Taipei (Tsai C.C., *et al*; 2010).

El mantenimiento del cultivo se realizó en *DMEM* bajo en glucosa (1g/ml), con piruvato sódico, sin glutamina ni rojo fenol (Gibco, EEUU), suplementado con GlutaMAX -I CTS 100x (Gibco, EEUU) al 1%, SBF al 10% y PE al 1%. Manteniéndose en la estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa y realizando cambios de medio cada 2-3 días.

4 Cultivo de 127TT-hMSCs

La línea celular 127TT-hMSCs fue generada en grupo de investigación de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Dra. Silvia Díaz Prado del Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña a partir de MSCs de médula ósea de cabeza femoral de un varón con patología artrósica de 67 años donante del CHUAC.

El medio de cultivo de esta línea celular es *DMEM*, suplementado con PE al 1% y SBF al 20%. Se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa, realizando cambios de medio cada 2-3 días.

5 Subcultivo celular

Las MSCs, tanto primarias como de las líneas celulares, y los condrocitos primarios se cultivaron en los medios anteriormente descritos en condiciones estándar y su crecimiento fue observado con un microscopio invertido Leica DMIL LED (Leica, Alemania). Una vez alcanzadas confluencias del 80-90% se procedió a realizar el subcultivo celular. Para ello, se retiró el medio de los cultivos y se lavaron con suero salino (Fresenius Kabi, España). Posteriormente, se les añadió tripsina 2x y se incubaron 3 min en la estufa. Tras este tiempo se observó al microscopio que las células ya no estaban adherentes y se inactivó con suero ringer. Se transfirieron las células a un tubo cónico de polipropileno de 50 ml y se centrifugaron a 300 *xg* 10 min. Se resuspendieron en suero ringer y se contaron el número de células en una cámara de Neubauer. Para finalizar, se sembraron las células en sus correspondientes medios y se mantuvieron en las condiciones estándar de cultivo.

6 Criopreservación celular

Para la criopreservación de las células, tras centrifugarlas se descartó el sobrenadante, se resuspendieron en medio de congelación, constituido por *DMEM*, SBF al 40% y dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, Alemania) al 10% y se conservaron en crioviales estériles (Simport, Canadá) en un ultracongelador a -80°C durante al menos 24h para, posteriormente, conservarlas hasta su uso en un tanque de nitrógeno líquido.

7 Diferenciación condrogénica

El estudio de la diferenciación condrogénica se realizó en cuatro tipos de cultivos diferentes, micromasa, gota colgante, membranas de *PLLA* (Corbion, España) y andamios de *PCL* (Esun, China) (Tabla 3).

El medio empleado para la diferenciación condrogénica fue el medio condrogénico comercial *differentiation basal medium-chondrogenic* junto con *hMSC chondrogenic SingleQuots* (Lonza, EEUU) suplementado con 33 ng/ml de factor de crecimiento transformante beta 3 (*Transforming growth factor beta 3, TGFβ3*; Prospec Protein Specialists, Israel).

Los controles negativos de diferenciación se realizaron con células cultivadas en los medios de mantenimiento anteriormente descritos.

Tabla 3. Cultivos realizados para el estudio de la diferenciación condrogénica.

CULTIVO	TIPO CELULAR	MEDIOS DE CULTIVO	TIEMPOS (DÍAS)	TÉCNICAS DE ANÁLISIS
Micromasa	3a6- <i>hMSCs</i>	No estimulado vs estimulado	3, 9 y 21	Histología, Inmunofluorescencia y <i>RT-qPCR</i>
	<i>MSCs</i> primarias de pacientes <i>OA</i> y no <i>OA</i>	Estimulado	3	
Gota Colgante	127TT- <i>hMSCs</i>	No estimulado vs estimulado	3, 9, 14 y 21	Histología y <i>RT-qPCR</i>
Membrana de PLLA (2D)	<i>MSCs</i> primarias de pacientes <i>OA</i> y no <i>OA</i>	Estimulado	3	Inmunofluorescencia y <i>RT-qPCR</i>
Andamios de PCL (3D)	127TT- <i>hMSCs</i>	No estimulado vs estimulado	21	<i>FESEM</i> , Histología y <i>RT-qPCR</i>

7.1 Micromasa

La técnica estándar empleada para la diferenciación condrogénica en micromasa de las células *MSCs* primarias y de la línea celular 3a6-*hMSCs* fue la descrita por Johnstone *et al.* en 1998 con mínimos cambios. 250.000 células fueron sembradas con medio condrogénico o medio de mantenimiento en tubos de poliestireno de fondo cónico (JC Catalán S.L., España) y se centrifugaron a 300 $\times g$ 10 min. Las células se mantuvieron en cultivo en condiciones estándar durante 24 h, pasado dicho tiempo se pudo observar las células agregadas en el fondo del tubo formando la micromasa. A continuación, se agitó suavemente para desprenderla de las paredes del tubo y se continuó el cultivo realizando cambios de medio cada 2-3 días.

Este experimento se realizó usando las 3a6-*hMSCs* por triplicado. Los tiempos empleados fueron 3, 9 y 21 días. Por cada tiempo se realizaron cuatro réplicas con medio condrogénico y otras cuatro con medio de mantenimiento. Tres de estas réplicas se emplearon para extracción de ARN y una para realizar técnicas histológicas e inmunofluorescencia.

A los 3, 9 y 21 días, tres micromasas por condición se transfirieron a un eppendorf de fondo redondo de 2ml y se lavaron con suero salino. Se centrifugaron a 300 $\times g$ 10 min, se descartó el sobrenadante y fueron congeladas en nitrógeno líquido, conservándose posteriormente a -80°C para realizar la extracción del ARN. La cuarta micromasa se colocó en un molde de congelación

Tissue-Tek Cryomold (Sakura, EEUU), se embebió en el compuesto *Optimal Cutting Temperature* (OCT; Sakura, EEUU) y se congeló en isopentano (VWR chemicals, Francia) enfriado previamente en nitrógeno líquido. A continuación, se conservó el bloque formado a -80°C para realizar posteriormente técnicas histológicas e inmunofluorescencia.

7.2 Gota colgante

Dado que la línea celular 127TT presentaba dificultades a la hora de formar micromasas mediante la técnica estándar, se decidió emplear la inducción de la agregación celular mediante gota colgante, sistema mediante el cual la fuerza de la gravedad permite obtener agregados celulares.

Para realizar esta técnica, se colocaron gotas de medio condrogénico o medio de mantenimiento de un volumen de $20\ \mu\text{l}$ con 50.000 células/gota en la tapa de una placa Petri no adherente (Francisco Soria Melguizo, España) de tal modo que, una vez cerrada la placa, las gotas de medio con las células quedarán colgando. En la base de

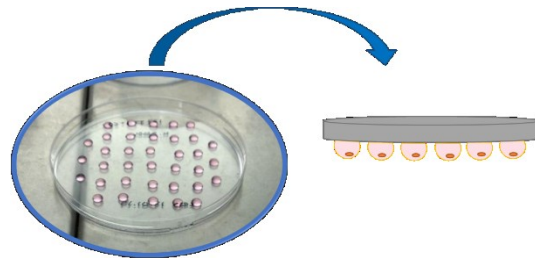


Figura 14. Formación de agregados celulares mediante el cultivo en gota colgante.

la placa se añadió suero salino para evitar que el medio se evaporara. A las 48 h ya se pudieron observar los agregados celulares formados dentro de las gotas (Figura 14). Se mantuvieron en cultivo en condiciones estándar realizando cambios de medio cada 1-2 días.

Este experimento se realizó con las 127TT-*hMSCs* por triplicado. Los tiempos empleados fueron 3, 9, 14 y 21 días. Para cada tiempo se formaron doce réplicas en medio condrogénico y otras doce en medio de mantenimiento. Diez se emplearon para extracción de ARN y dos para realizar técnicas histológicas e inmunofluorescencia.

A los 3, 9, 14 y 21 días, diez agregados por condición se transfirieron a un *ependorf* de fondo redondo de 2 ml y se procesaron tal y como se describió previamente en el caso de las micromasas para la extracción de ARN. Otros dos agregados se congelaron en sendos bloques de OCT, proceso también descrito en el anterior apartado, y se conservaron a -80°C para realizar técnicas histológicas e inmunofluorescencia.

7.3 Membranas de PLLA 2D

Para la diferenciación condrogénica en las membranas de PLLA, se realizaron tres experimentos sembrando *MSCs* primarias de pacientes no OA y cuatro experimentos sembrando *MSCs* primarias de pacientes OA. Además, se emplearon seis condiciones diferentes para los cultivos

celulares en las membranas de PLLA: membrana de PLLA sin tratamiento, PLLA con Fn y PLLA con RGD-Cys-D1 a las concentraciones 10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} % p/p. El tiempo de estudio fue de 3 días. Por condición se usaron dos membranas para inmunofluorescencia y una membrana para extracción de ARN, sembrándose 5.000 células/membrana y 250.000 células/membrana respectivamente en medio de diferenciación condrogénica y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo.

Pasado dicho tiempo, se fijaron las membranas con paraformaldéhidro (Sigma-Aldrich, Alemania) al 4% para inmunofluorescencia, y se levantaron las células de las membranas con *Tri Reagent* (Molecular Research Center, EEUU) para la extracción de ARN.

7.4 Andamios de PCL 3D

La diferenciación condrogénica en los andamios de PCL se realizó por triplicado, sembrando células de la línea celular 127TT-*hMSCs*, empleando seis condiciones de andamios de PCL: el andamio de PCL sin tratamiento, PCL con Fn y PCL con RGD-Cys-D1 a las concentraciones 10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} % p/p; tal y como se realizó en el caso de las membranas de PLLA. Se usaron dos medios de cultivo diferentes, medio de mantenimiento como control negativo y medio de diferenciación condrogénica; y el tiempo de estudio fue de 21 días. Por cada condición se realizaron dos réplicas.

Los diferentes andamios de PCL se colocaron en una placa de doce pocillos no adherente (Falcon, EEUU) y a continuación se inyectaron 2×10^6 células en medio de mantenimiento en cada uno dejándose posteriormente durante 3 h en condiciones estándar de cultivo. Pasado dicho tiempo, se añadió más medio de mantenimiento en cada pocillo y se conservaron en condiciones de incubación estándar durante 48 h. Pasadas las horas de acondicionamiento de las células al material, se cambió el medio de cultivo añadiendo el medio condrogénico descrito o medio de mantenimiento según correspondiera. Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días hasta pasados los 21 días.

Después de dicho tiempo, para cada condición, un andamio se preparó para su observación en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (*Field Emission Scanning Electron Microscopy, FESEM*; Jeol, Japón) y el otro andamio se lavó con suero salino y se fraccionó en dos. Medio andamio se congeló en un *ependorf* de fondo redondo de 2 ml en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C para extracción de ARN. El otro medio andamio se colocó en un molde de congelación, se embebió en gelatina de cerdo (Sigma-Aldrich, Alemania), previamente calentada en una estufa a 65°C hasta que se volviera líquida, se dejó unos min enfriar y se conservó a -80°C para realizar posteriormente técnicas histológicas.

8 Procesado histológico

Se realizaron cortes de 4 μm de los bloques de *OCT* y gelatina de cerdo empleando un criostato 2800 Frigocut N (Reichert-Jung, EEUU), colocándolos sobre portaobjetos *superfrost plus* (Thermo Scientific, EEUU). Se conservaron a -20°C .

Previamente a realizar las tinciones, los cortes de los andamios incluidos en los bloques de gelatina se incubaron a 65°C durante una hora con el fin de que los materiales se pegaran al cristal y no se perdieran debido a su hidrofobicidad. Después, se lavaron brevemente en agua tibia para eliminar los restos de gelatina que pudieran quedar y poder realizar las tinciones correctamente.

8.1 Tinciones histoquímicas

8.1.1 Hematoxilina-Eosina

La realización de la tinción histoquímica de hematoxilina-eosina se inició sumergiendo los portaobjetos con los cortes de las muestras en hematoxilina de Harris (Bio Optica, Italia) durante 5 min. Después se realizó un lavado con agua y, por último, se sumergieron en eosina (Panreac, España) durante 5 min.

8.1.2 Safranina-O

Para la realización de la tinción histoquímica de safranina-O se sumergieron en safranina-O (Sigma-Aldrich, Alemania) los portaobjetos con los cortes de las muestras durante 30 min.

8.1.3 Azul Alcían-PAS

La tinción histoquímica azul alcían-PAS se llevó a cabo sumergiendo los portaobjetos con los cortes de las muestras en azul alcían (Kodak, EEUU) durante 30 min. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada (Grifols, España) y se sumergió en ácido peryódico (Sigma-Aldrich, Alemania) 10 min. Se prosiguió realizando un segundo lavado con agua destilada y sumergiendo las muestras en reactivo de Schiff (Merck, Alemania) 30 min en oscuridad y sin contacto con metales. Después, se sumergieron en bisulfito sódico (Merck, Alemania) 10 min en oscuridad y sin contacto con metales y se realizó un último lavado con agua destilada. Para finalizar, se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 2 min.

8.1.4 Tricrómico de Masson

Para realizar la tinción histoquímica tricrómico de Masson, las muestras se sumergieron en alumbre férrico (Merck, Alemania) 30 min y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, las muestras se sumergieron en una solución de hematoxilina férrica de Weigert, solución formada

a partir de *Natural Black I* (Sigma-Aldrich, Alemania), cloruro férrico (Merck, Alemania) al 20% y ácido clorhídrico (Merck, Alemania), 10 min y se volvieron a lavar con agua destilada. Después, se sumergieron en alcohol-ácido pícrico (Sigma-Aldrich, Alemania) 6 min y se lavaron con agua. Para continuar, se sumergieron en fucsina de Ponceau (Merck, Alemania) 8 min y se realizaron dos pases por ácido fosfolíbdico (Prolabo, Bélgica) de 5 min. Finalmente, las muestras se sumergieron en azul de anilina (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 12 min.

8.1.5 Rojo Alizarina

La tinción histoquímica rojo alizarina se realizó sumergiendo las muestras en rojo alizarina (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 3 min.

8.1.6 Tinción de von Kossa

La tinción de von Kossa se inició sumergiendo las muestras en nitrato de plata (Panreac, España) al 1% durante 1h en oscuridad. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se realizaron pases con tiosulfato sódico (Panreac, España) al 2,5%. Por último, se lavó con agua destilada y se realizó la coloración de contraste con rojo neutro (Fluka, EEUU) al 1%.

8.1.7 Deshidratación y montaje

La deshidratación final se realizó con dos pasos breves por alcohol de 96°, un paso en alcohol de 100° (Panreac, España) y, finalmente, un último paso en xilol (Panreac, España). A excepción de las muestras teñidas con safranina-O para las que se se realizó la deshidratación final con un paso en alcohol de 100° y, finalmente, un último paso en xilol. El montaje de las muestras se realizó con medio de montaje DPX (Leica, Alemania).

En el caso de los materiales de PCL no se hizo deshidratación, se lavó con agua y se pasó a realizar el montaje con medio acuoso de montaje Glicergel (Dako, EEUU).

8.1.8 Fotografías

Las fotografías de las muestras se tomaron con la cámara Leica ICC50 W (Leica, Alemania) acoplada al microscopio óptico Leica DM2000 LED (Leica, Alemania), usando el programa Leica LAS EZ versión 3.4 (Leica Microsystems, Alemania).

8.2 Tinciones inmunofluorescencia

Para realizar las tinciones de inmunofluorescencia se fijaron las muestras con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, Alemania) al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline, PBS*; Dako, EEUU) 1x. Las

muestras se bloquearon con albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA; Sigma-Aldrich, Alemania) al 1% para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos y se permeabilizó con el detergente polisorbato 20 (Tween 20; Sigma-Aldrich, Alemania) al 0,1%, durante 20 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios empleados fueron GJA1 (BD, España) y COL2 (abcam, Inglaterra) a una dilución de 1:200 en PBS 1x con BSA 1%, se incubaron 1h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados fueron Alexa Fluor 488 y 594 *goat anti-mouse* IgG (Invitrogen, EEUU) a una dilución de 1:2.000 en PBS 1x con BSA 1%, durante 1h a temperatura ambiente en oscuridad. Se empleó 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI; Sigma-Aldrich, Alemania) para contrateñir los núcleos celulares.

El montaje de las muestras se realizó con el medio de montaje Glicergel. Las muestras se mantuvieron a 4°C en oscuridad. Las fotografías de las muestras se tomaron con una cámara Olympus DP71 acoplada a un microscopio Olympus BX61 y la lámpara de mercurio Olympus U-RFL-T (Olympus, Japón), usando el programa *cellSens Dimension* versión 5.10 (Olympus, Japón).

8.3 Morfometría

Las mediciones realizadas sobre las imágenes se realizaron empleando el programa ImageJ versión 1.52a (programa libre basado en *NIH image*, EEUU).

Las mediciones del área y la circularidad de las micromasas y los agregados formados mediante gota colgante se realizaron usando la herramienta de analizar partículas (*Analyze particles*).

El área de fluorescencia se analizó convirtiendo la imagen de la fluorescencia a una imagen binaria y midiendo el área con la herramienta de medida (*Measure tool*) con el programa ImageJ.

9 Análisis expresión génica

9.1 Extracción de ARN

Para el análisis de la expresión génica, las micromasas y agregados formados mediante la técnica de gota colgante se disgregaron con el microdismembrador Millmix 20 (Tehtnica, Eslovenia). Utilizando un protocolo de tres ciclos de 90 s a una frecuencia de 1/25, entre cada ciclo tanto las muestras como los cubiletes del microdismembrador se enfriaron en nitrógeno líquido para facilitar la disgregación de las muestras. No fue necesario realizar este paso en el caso de las células sembradas en monocapa, en las membranas de PLLA o en los andamios de PCL, en los que se pasó directamente al paso siguiente.

Para realizar la extracción de ARN se empleó el *Tri Reagent* (*Molecular Research Center*, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, tras diluir las muestras en 1 ml de *Tri Reagent* y dejarlas 5 min a temperatura ambiente en agitación para su completa disolución, se añadieron 200 µl cloroformo (Merck, Alemania) seguido de una centrifugación a 10.000 *xg* durante 15 min a 4°C. Esta mezcla de reactivos es necesaria para separar la reacción en dos fases; una fase acuosa (superior) donde está el ARN y una fase orgánica (inferior) que contiene las proteínas.

Tras la centrifugación la fase acuosa se transfirió a un nuevo *eppendorf DNA loBind* de 1,5 ml (Eppendorf, Alemania) y se le añadió 500 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemania) y 1 µl de glicógeno de *Mytilus edulis* (Sigma-Aldrich, Alemania) para facilitar la precipitación del ARN. Tras lo cual se dejaron las muestras durante 48h a -20°C y posteriormente se centrifugaron a 11.000 *xg* durante 10 min a 4°C.

Por último, se realizaron dos lavados del precipitado de ARN. Un primer lavado con alcohol absoluto (Merck, Alemania) diluido a 70° y un segundo lavado con alcohol de absoluto para análisis sin diluir. Centrifugándose las muestras a 4.000 *xg* durante 5 min a 4°C después de cada paso. Finalmente, se resuspendió el precipitado de ARN en un volumen adecuado de agua *RNAse free* (BBL, EEUU).

Se cuantificó la concentración y grado de pureza del ARN obtenido con el mySPEC (VWR, Alemania). Los ratios utilizados para analizar la pureza fueron 260/230 y 260/280, los cuales se mantuvieron alrededor de 2±0,5 en ambos casos. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

9.2 Retrotranscripción

Para realizar la retrotranscripción de las muestras de ARN para la obtención del ácido desoxirribonucleico complementario (cADN), se utilizaron 0,5 µg de ARN de cada muestra. Como paso previo a la retrotranscripción, las muestras se trataron con *DNase* (Thermo Scientific, EEUU) durante 30 min a 37°C, para eliminar el ácido desoxirribonucleico (ADN) que pudiera estar contaminando nuestra muestra. Inactivándose con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Thermo Scientific, EEUU) durante 10 min a 65°C.

Una vez las muestras fueron tratadas, se procedió a realizar la retrotranscripción siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial para el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis kit* (nzytech, Portugal) usando un termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Singapur). Brevemente, se trataron las muestras con 10 µl de *NZYRT 2x Master Mix* y 2µl de *NZYRT Enzyme*

Mix con un programa de 10 min a 25°C, 30 min a 50°C, 5 min a 85°C y una bajada a 4°C. Posteriormente, se trataron con 1 µl de *NZY RNase H* con un programa de 20 min a 37°C y posterior bajada a 4°C. Finalmente, el cADN obtenido se conservó a -20°C.

9.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*rt-qPCR*)

Para la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*real time quantitative Polymerase Chain Reaction, rt-qPCR*) se usó la mezcla madre *LightCycler 480 Probes Master* (Roche, Alemania), con cebadores diseñados a través de la página web de Roche *Universal ProbeLibrary (UPL) System Assay Design* (Roche Molecular Systems, Inc.; 1999-2018), y utilizando sondas *Taqman UPL Probe* (Roche Diagnostics, Alemania) (Tabla 4). El principio de funcionamiento de la *rt-qPCR* es la detección directa a tiempo real de la amplificación de cADN. Resumidamente, la unión específica entre los cebadores a la secuencia de interés emite fluorescencia denominada *Fluorescence Resonance Energy (FRET)* en cada ciclo de amplificación, y a medida que el número de amplicones incrementa dicha fluorescencia irá aumentando a su vez, permitiendo el seguimiento a tiempo real.

La *rt-qPCR* se realizó de cada muestra por duplicado empleando placas para *PCR* de 96 pocillos *LightCycler 480 Multiwell Plate 96* (Roche, Alemania) selladas con *LightCycler 480 Sealing Foil* (Roche, EEUU). Se usaron 2 µl de cADN y 8 µl de la mezcla compuesta por la *LightCycler 480 Probes Master 2x*, las sondas *Taqman UPL* a 10 µM y los cebadores a 20 µM, rellenando con agua *RNase free* hasta el volumen final.

La lectura se realizó en el Termociclador *PCR* de tiempo real *LightCycler 480* (Roche Diagnostics S.L., Suiza) con el programa *LightCycler 480 Software* (versión 1.5.0 SP4), usando un proceso de tres pasos: primero una pre-incubación a 95 °C durante 10 min; segundo una serie de 45 ciclos de amplificación consistentes en un proceso de desnaturalización a 95 °C durante 10 s, anillamiento a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 s; y tercero un enfriamiento a 40 °C durante 30 s.

Posteriormente, las lecturas obtenidas se analizaron con el programa *Qbase plus* versión 3.2 (Biogazelle NV, Bélgica). A grandes rasgos, los datos brutos obtenidos en la lectura se procesan primero realizando una media entre las medidas de los dos pocillos réplica y posteriormente ese valor se normaliza en función del valor obtenido con el gen de referencia. Este procesado nos proporcionará una medida relativa de la expresión del gen de estudio en cada muestra.

Tabla 4. Sondas y cebadores para los genes de interés diseñados a través de la página web de Roche.

Nombre	Abreviatura	Sentido (3'-5')	Antisentido (5'-3')	Sonda	Nº Acceso Genbank
<i>collagen type I alpha 1 chain</i>	COL1A1	ctggccccattggta atgt	accagggaaacca gtagcac	1	NM_0000 88.3
<i>collagen type II alpha 1 chain</i>	COL2A1	tggtgctaatggcga gaag	cccagtctctccac gttcac	4	NM_0018 44.4
<i>collagen type X alpha 1 chain</i>	COL10A1	caccttctgcaactgct catc	ggcagcatattctc agatgga	6	NM_0004 93.3
<i>SRY-box 9</i>	SOX9	gtacccgcacttgca caac	tcgctctcgttcag aagtctc	61	NM_0003 46.3
<i>tenascin C</i>	TNC	ggtacagtgggacag caggt	cccctttgtaggac agagca	9	NM_0021 60.3
<i>aggrecan</i>	ACAN	cggtctacctctacc taacca	gagaaggaaccgc tgaaatg	38	NM_0132 27.3
<i>gap junction protein alpha 1</i>	GJA1	gcctgaacttgccctt tcat	ctccagtcacccat gttgc	88	NM_0001 65.4
<i>gap junction protein alpha 3</i>	GJA3	ccttctgccagcaac ctct	ttcaggcctcatga caagtg	34	NM_0219 54.3
<i>gap junction protein beta 1</i>	GJB1	gggagttgtcatttt aatctttca	ttgtcttttcattgt ctaataacagc	6	NM_0001 66.5
<i>gap junction protein alpha 5</i>	GJA5	gaatacagagacca ggccaatc	tgtctccctagtgc ccctaa	60	NM_0052 66.6
<i>gap junction protein gamma 1</i>	GJC1	caggtgaaggactaa gcactca	tgctccatcatgac acttgc	25	NM_0010 80383.1
<i>pannexin 3</i>	PANX3	ttctttccttgcaat gtcta	aaccaagacatgg aaataaatgtg	78	NM_0529 59.2
<i>integrin subunit alpha 2b</i>	ITGA2B	cagagtgaggggctg aggt	gagaagccaaagg cagagc	60	NM_0004 19.4
<i>integrin subunit alpha 5</i>	ITGA5	aatttcccaggaccct gaa	aacagggagggcc tgtgt	30	NM_0022 05.4
<i>integrin subunit alpha 8</i>	ITGA8	tgagccaagctcaca gacac	cgccatgtgcctt cattt	78	NM_0012 91494.1

<i>integrin subunit alpha V</i>	ITGAV	tggcagatcttcctaa gttgc	cacataggtattcc aagaacgactc	22	NM_0011 44999.2
--	-------	---------------------------	-------------------------------	----	--------------------

La selección de los genes de referencia para analizar los genes de interés anteriormente descritos se hizo en base a 6 genes ampliamente utilizados en la bibliografía (Tabla 5). El estudio de la estabilidad y reproducibilidad de los genes se llevó a cabo con la herramienta informática *geNorm* (Hellemans, et al. 2007) considerando que un gen de referencia con una estabilidad elevada reflejara un valor de $M \leq 0,5$ y de $V < 0,15$. En base a los parámetros descritos se escogió como gen de referencia el más estable para cada grupo de muestras.

Para seleccionar los genes de referencia se hicieron pruebas previas con seis genes para estudiar su estabilidad (Tabla 5). Dicha estabilidad se estudió empleando un análisis *geNorm* de las muestras prueba, considerando un gen de referencia con una estabilidad elevada cuando el *geNorm* $M \leq 0,5$. En base a esto, se escogió como gen de referencia el más estable para cada grupo de muestras.

Tabla 5. Sondas y cebadores diseñados a través de la página web de Roche para los genes de referencia probados.

Nombre	Abreviatura	Sentido (3'-5')	Antisentido (5'-3')	Sonda	Nº Acceso Genbank
<i>ribosomal protein L13a</i>	RPL13A	ggataagaaacct gcgaca	gcctcgaccatcaa gcac	63	NM_012423.3
<i>beta-2-microglobulin</i>	B2M	ttctggcctggagg ctatc	tcaggaaattgac ttccattc	42	NM_004048.3
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	agccacatcgctca gacac	gcccaatacgacc aatcc	60	NM_002046.7
<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	HPRT1	tgatagatccattcc tatgactgtaga	caagacattcttc cagtaaagtg	22	NM_000194.3
<i>TATA-box binding protein</i>	TBP	gcccatagtgatctt tgcagt	cgctggaactcgtc tcacta	67	NM_003194.5
<i>RNA, 18S ribosomal 1</i>	RNA18S1	ctcaacacgggaa acctcac	cgctccaccaacta agaacg	77	

10 Dendrímeros RGD-Cys-D1

Los dendrímeros de primera generación RGD-Cys-D1 fueron proporcionados por el departamento de química orgánica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga (IBIMA) de la Universidad de Málaga (UMA). Se conservaron liofilizados a temperatura ambiente.

Para la preparación de las cuatro concentraciones de dendrímeros RGD-Cys-D1, se disolvieron en agua ultrafiltrada desionizada 18 MΩ·cm Milli-Q (Merck Millipore, Francia) en una solución inicial de 0,77 mg/ml, se sonicaron con un sonicador (Bandelin, Alemania) durante 10 min. Dicha solución se conservó a -20°C.

A partir de esta solución se prepararon las diluciones de 10^{-2} y 10^{-5} % p/p. La solución de 10^{-5} % p/p se sonicó y se empleó para obtener las de $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} % p/p, posteriormente se conservó a -20°C.

Previamente a su uso, las soluciones de 10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} % p/p se sonicaron durante 10 min y se filtraron con un filtro de 0,22 μm (Merck Millipore, Francia).

11 Membranas de PLLA

11.1 Fabricación de membranas de PLLA

Para la fabricación de membranas de PLLA, se preparó la solución con el copolímero ácido 95/5 L-láctico/DL-láctido (*poly-L-lactide acid*, PLLA; Corbion, España) al 2 % m/V en de 1,4-dioxano (Sigma-Aldrich, Alemania) dejándola 24 h con agitación magnética a 60°C. Se cortaron portaobjetos *Corning glass microslides* (Corning, EEUU) con un cúter de punta de diamante en 12 cuadrados de 1,25 cm de lado, lavándose posteriormente con agua miliQ y etanol 96°.

La solución de PLLA y las láminas se calentaron durante 10 min a 60°C. Posteriormente, se le dio un *spin* a la solución de PLLA con un *Spin Coater* (Laurell Technologies Corporation, EEUU), en las láminas con un programa de dos pasos, primero 5 s con una velocidad de 2 *xg* y una aceleración de 0,6 *xg/s*, y segundo, 30 s con una velocidad de 64 *xg* y una aceleración de 16 *xg/s* (Tabla 6).

Tabla 6. Proceso de fabricación de las láminas de PLLA en el *Spin Coater*.

Pasos	Tiempo (s)	<i>xg</i>	Aceleración (<i>xg/s</i>)
1	5 seg.	2	0,6
2	30 seg.	64	16

Una vez fabricadas se esterilizaron durante 1h con luz ultravioleta (UV).

11.2 Funcionalización con dendrímeros RGD-Cys-D1 y Fn

Las soluciones de RGD-cys-D1 se añadieron a las láminas de *PLLA* en una placa de 12 pocillos estéril no adherente (Falcon, EEUU) y se incubaron durante 16 h a temperatura ambiente.

Para la funcionalización con Fn se preparó una solución de suero salino estéril con Fn de plasma bovino (Sigma-Aldrich, Alemania) a una concentración de 0,1 mg/ml. Se cubrieron las correspondientes láminas de *PLLA* con ella y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente a ambas incubaciones, se lavaron los materiales con suero salino, se movieron a otra placa de 12 pocillos no adherente y se sembraron (Figura 15).

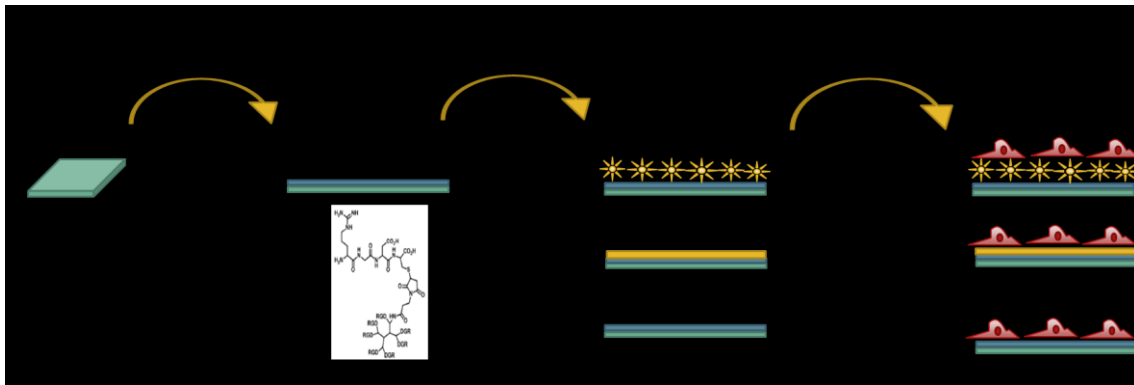


Figura 15. Fabricación y siembra de las láminas de *PLLA* funcionalizadas con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 y Fn.

12 Andamios de PCL

12.1 Fabricación de andamios de PCL

Los andamios de PCL se diseñaron con el *software* de la impresora Regemat 3D (Regemat, España). Los andamios se imprimieron por deposición de material fundido (*Fused Deposition Modelling, FDM*) usando una impresora Regemat 3D (Regemat, España) e hilo de PCL 1,75 mm eMate 3D Filament (Esun, China). La temperatura de extrusión fue de 75°C, velocidad de 1,2 mm/s y temperatura ambiente en la placa de deposición. El tamaño de la boquilla del extrusor fue de 0,4 mm, obteniendo un diámetro de fibra de ese mismo tamaño. Las dimensiones del andamio fueron con poros en forma de triángulos equiláteros (lados de 1 mm y una altura aproximada de 870 μm). El andamio se diseñó con tres capas compactas de fondo y una capa de perímetro. El número total de capas fue de 24, con una altura de capa de 200 μm . La altura total del andamio fue de 5 mm y el diámetro de 10 mm (Figura 16).

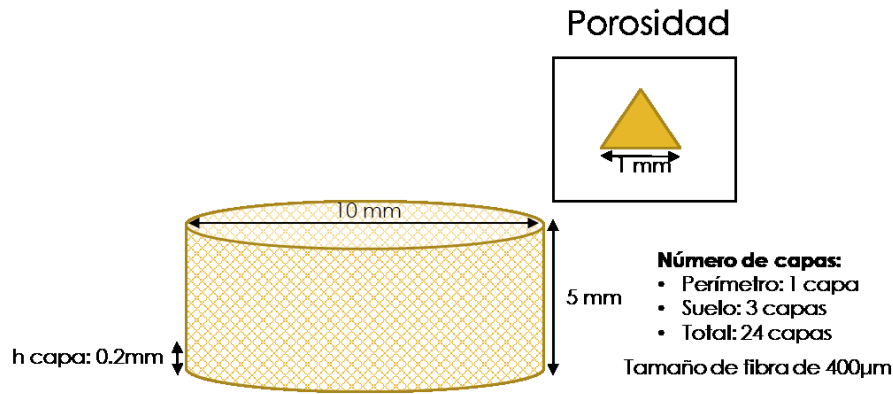


Figura 16. Proporciones de los andamios de PCL diseñados e impresos mediante *FDM*. Siendo la *h* capa la altura de capa.

Los andamios impresos se conservaron a temperatura ambiente.

12.2 Esterilización de andamios de PCL

Para esterilizar los andamios se realizaron lavados en un gradiente de alcoholes descendiente, primero un lavado con alcohol de 70° durante 30 min en agitación, un lavado con alcohol de 50° 30 min en agitación y un último lavado en alcohol de 20° durante 16 h en agitación. Todos los alcoholes empleados se filtraron con filtros de 0,22 μm.

Posteriormente, los andamios fueron lavados con suero salino estéril durante 30 min en agitación y esterilizados una hora con luz UV. A continuación, se realizó un breve lavado con suero salino (Figura 17).

12.3 Funcionalización con dendrímeros RGD-Cys-D1 y fibronectina

La funcionalización de los andamios de PCL se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente en el apartado 11.2 (página 61) para las láminas de *PLLA*. Brevemente, se añadieron las soluciones a los andamios de PCL, inyectándolas con una aguja de 25G 5/8" (BD Microlance, España) y una jeringa de 2 ml (BD Discardit, España) asegurando así que llegase la solución a toda la parte interna del andamio; y se incubaron durante 16 h a temperatura ambiente.

Para la funcionalización con Fn se preparó la solución de Fn al 0,1mg/ml. Esta solución fue inyectada en los correspondientes andamios y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente a ambas incubaciones, se realizaron dos lavados de los materiales con suero salino, se movieron a otra placa de 12 pocillos no adherente y se sembraron (Figura 17).

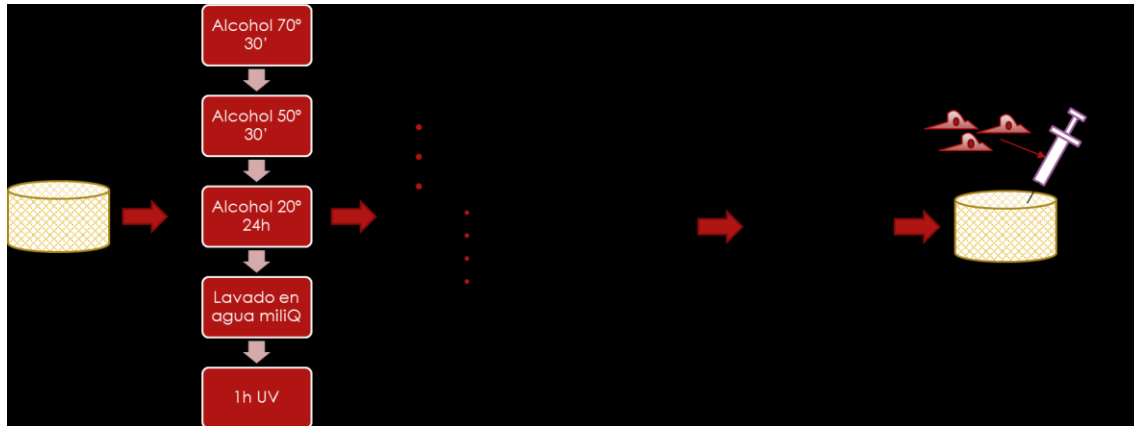


Figura 17. Esterilización, fabricación y siembra de los andamios de PCL funcionalizados con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 y Fn.

12.4 Viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad celular en los andamios de PCL se realizó un ensayo empleando *Alamar Blue* (Invitrogen, EEUU). 2×10^6 células/andamio se sembraron en andamios de PCL sin funcionalizar con medio de mantenimiento. La viabilidad fue determinada a los 3, 7, 9, 14 y 21 días con el lector de placas *multi-mode reader* Synergy HTX (BioTek, EEUU) y el programa Gen5 versión 2.08 (BioTek, EEUU). Se realizaron dos medidas por muestra. Este experimento se realizó por triplicado.

12.5 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)

Para iniciar la preparación de los andamios de PCL para su observación en el FESEM se lavaron con suero salino, se sumergieron en glutaraldehído (*Electron Microscopy Science*, EEUU) al 2% diluido en tampón cocodilato (Sigma-Aldrich, Alemania) y se incubaron a 4°C durante toda la noche. A continuación, se realizaron repetidos lavados con tampón fosfato para eliminar los restos de glutaraldehído en los andamios. Posteriormente, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes. El último paso del proceso de deshidratación, el secado de punto crítico, no se pudo realizar dado que afectaba al biomaterial. Para finalizar, las muestras se recubrieron con un metal pesado que facilitase la observación de la muestra en el FESEM al hacerla conductora, en concreto con un equipo de pulverización catódica con Pt-Pd Cressington 208HR (Cressington, Reino Unido).

Se observaron las muestras en el FESEM y posteriormente se usó el programa ImageJ para realizar mediciones del tamaño de poro de los andamios.

13 Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias significativas entre los grupos de estudio se realizó el análisis de varianza (*Analysis of variance, ANOVA*) *One-Way* acompañado de un test de comparación múltiple de Bonferroni, considerando las diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1 Evaluación del potencial condrogénico de membranas de ácido poli-L-láctico transportadoras con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1

Con el fin de evaluar si las membranas de *PLLA* con diferentes nanopatrones de dendrímeros RGD-Cys-D1 podrían potenciar la diferenciación condrogénica de *MSCs* se estudió la respuesta temprana, 3 días, de *MSCs* estimuladas con medio condrogénico a los diferentes nanopatrones de dendrímeros sobre membranas de *PLLA*. Las condiciones de estudio fueron: láminas de *PLLA* funcionalizadas con Fn (FN-*PLLA*) como control positivo, con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} %p/p) dando lugar a los diferentes nanopatrones de superficie y sin funcionalizar (*PLLA*) como control negativo. Como control de condrogénesis del estudio se emplearon micromasas cultivadas con medio condrogénico a 3 días, dado que el cultivo en micromasa es el método estándar usado en la diferenciación condrogénica. En este estudio se emplearon células primarias *MSCs* de pacientes no *OA* y *OA*.

Durante esta evaluación se analizó en las diferentes muestras la expresión génica de los genes marcadores de diferenciación condrogénica: *COL2A1* y *SOX9*; gen marcador de desdiferenciación: *COL1A1*; y genes de adhesión celular: *TNC* y *GJA1*. También se realizó un estudio mediante inmunofluorescencia de la expresión proteica de *COL2* y *GJA1*. Por último, se evaluó el tamaño de los agregados que las *MSCs* formaban al ser sembradas sobre las superficies de *PLLA* funcionalizadas.

1.1 Análisis de expresión génica en las membranas de *PLLA*

Se estudió la expresión génica de *COL2A1*, *SOX9*, *COL1A1*, *TNC* y *GJA1* en las células *MSCs* de pacientes *OA* y no *OA* sembradas en las diferentes condiciones de las membranas de *PLLA*. Los resultados de la expresión génica se representan como la media con la desviación estándar de la expresión de los genes de estudio en todas las condiciones en proporción a la expresión en la condición de *PLLA* sembrado con *MSCs* no *OA* (valor otorgado de 1).

Las *MSCs* de pacientes no *OA* no expresaron *COL2A1* cuando fueron sembradas en las membranas de *PLLA* ni en micromasa. Las células de pacientes *OA* sí que lo expresaron cuando fueron sembradas en las láminas de *PLLA*, pero no en micromasa. Observándose el menor nivel de expresión en la condición de *PLLA* $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($2,91 \pm 4,31$). Además, los resultados mostraron un incremento de expresión en la lámina de *PLLA* sin funcionalizar ($2,88 \times 10^1 \pm 4,11 \times 10^1$) con respecto al resto de condiciones (Figura 18, a).

La expresión de *SOX9* presentó su menor valor en las condiciones de *PLLA* RGD-Cys-D1 $2,5 \times 10^{-8}$ (no *OA* $2,77 \pm 1,23$ y *OA* $3,05 \pm 2,65$) y 10^{-8} % p/p (no *OA* $1,56 \pm 1,23$ y *OA* $2,33 \pm 2,42$) tanto en

las *MSCs* no *OA* como *OA*. Se pudo observar un incremento de la expresión a medida que disminuye la concentración de RGD-Cys-D1 obteniendo los valores más elevados en la lámina de *PLLA* sin funcionalizar tanto para las *MSCs* no *OA* ($6,97 \pm 5,18$) como *OA* ($9,34 \pm 8,51$). Sin embargo, la condición *PLLA* 10^{-2} % p/p ($1,39 \times 10^1 \pm 5,89$) las *MSCs* *OA* presentaron un pico de expresión. En las micromasas (no *OA* $7,95 \pm 3,04$ y *OA* $1,4 \times 10^1 \pm 7,62$) se observó una elevada expresión de *SOX9* (Figura 18, b).

Los resultados mostraron una mayor expresión de *COL1A1* en las *MSCs* *OA* con respecto a las *OA*. Tanto en *MSCs* no *OA* como *OA* se pudo detectar un pico de expresión en la condición de Fn-*PLLA*, siendo más pronunciado en las *MSCs* *OA* ($2,10 \pm 2,27$) que en las no *OA* ($1,10 \pm 5,9$). En el caso de las no *OA*, se observó una bajada de la expresión en la condición *PLLA* 10^{-2} %p/p ($3,6 \times 10^{-1} \pm 1,5 \times 10^{-1}$), una posterior subida en $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($6,3 \times 10^{-1} \pm 5 \times 10^{-1}$) y a continuación una nueva bajada de expresión en *PLLA* 10^{-8} %p/p ($2,4 \times 10^{-1} \pm 1,5 \times 10^{-1}$) y *PLLA* 4×10^{-9} %p/p ($3,3 \times 10^{-1} \pm 8 \times 10^{-2}$); volviendo a recuperar los niveles de expresión previos en la condición de *PLLA* sin funcionalizar ($5,6 \times 10^{-1} \pm 6,6 \times 10^{-1}$). Por otro lado, en las *MSCs* *OA* se observó una expresión relativamente estable entre las condiciones de *PLLA* 10^{-2} %p/p ($9,5 \times 10^{-1} \pm 8,1 \times 10^{-1}$); $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($8,8 \times 10^{-1} \pm 9,4 \times 10^{-1}$) y 10^{-8} %p/p ($8,6 \times 10^{-1} \pm 1,17$) y una posterior bajada de la expresión en las condiciones de *PLLA* 4×10^{-9} %p/p ($6,3 \times 10^{-1} \pm 4,9 \times 10^{-1}$) y *PLLA* sin funcionalizar ($7,2 \times 10^{-1} \pm 3,2 \times 10^{-1}$). Los resultados mostraron una expresión de *COL1A1* muy disminuida con respecto al resto de condiciones en las micromasas tanto en no *OA* ($2 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$) como *OA* ($1 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$) (Figura 18, c).

La *TNC* se expresó siguiendo un patrón similar entre las *MSCs* no *OA* y *OA*. Las *MSCs* no *OA* presentaron su menor expresión en *PLLA* 10^{-2} %p/p ($3,3 \times 10^{-1} \pm 1,9 \times 10^{-1}$), posteriormente la expresión aumentó en $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($1,40 \pm 1,03$) volviendo a disminuir en 10^{-8} %p/p ($6 \times 10^{-1} \pm 2,5 \times 10^{-1}$). A partir de este punto la expresión de *TNC* aumentó a medida que disminuía la concentración de RGD-Cys-D1, obteniendo el nivel de expresión más alto en la condición de *PLLA* sin funcionalizar ($1,53 \pm 1,21$). Las *MSCs* *OA* presentaron su pico de expresión en *PLLA* 10^{-2} %p/p ($1,57 \pm 1,68$) desde este punto la expresión fue disminuyendo a la vez que disminuía la concentración de RGD-Cys-D1 hasta encontrar el menor nivel de expresión en *PLLA* 10^{-8} %p/p ($1,8 \times 10^{-1} \pm 1,6 \times 10^{-1}$). A partir de esta concentración de RGD-Cys-D1, se observó un aumento de la expresión a medida que seguía disminuyendo la concentración de RGD-Cys-D1 hasta la condición de *PLLA* sin funcionalizar ($1,21 \pm 1,01$) (Figura 18, d).

Por último, *GJA1* presentó un pico de expresión en la condición de Fn-*PLLA* tanto en el caso de las células no *OA* ($1,12 \pm 6,4 \times 10^{-1}$) como *OA* ($1,32 \pm 1,65$). En el caso de las *MSCs* no *OA* disminuyó

en la condición más elevada de RGD-Cys-D1 ($5 \times 10^{-1} \pm 3,1 \times 10^{-1}$) para posteriormente volver a aumentar en la condición de PLLA $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($6,8 \times 10^{-1} \pm 6,4 \times 10^{-1}$) disminuyendo de nuevo a continuación hasta 4×10^{-9} %p/p ($4,2 \times 10^{-1} \pm 1,6 \times 10^{-1}$). En la condición de PLLA sin funcionalizar se encontró de nuevo levemente elevado ($8,2 \times 10^{-1} \pm 7,5 \times 10^{-1}$). Por otro lado, en el caso de las MSCs OA se observa una disminución de la expresión en la condición PLLA $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($4,2 \times 10^{-1} \pm 4 \times 10^{-1}$) aumentando en PLLA 10^{-8} %p/p ($9,4 \times 10^{-1} \pm 1,31$) y disminuyendo de nuevo desde esta condición, aunque levemente. En las micromasas tanto no OA ($2,5 \times 10^{-1} \pm 2,6 \times 10^{-1}$) como OA ($2,9 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$) se observaron los valores más bajos de expresión (Figura 18, e).

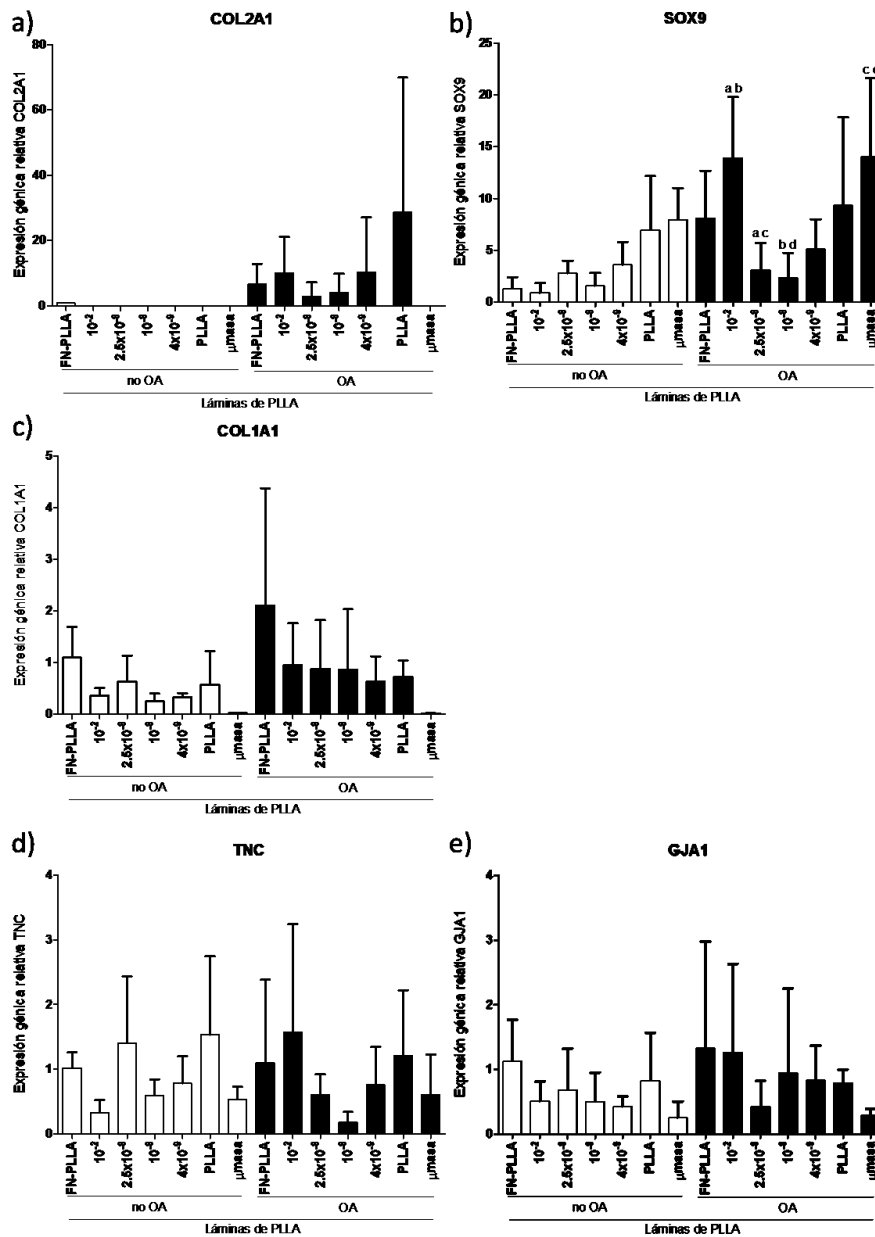


Figura 18. Expresión génica relativa de (a) COL2A1; (b) SOX9; (c) COL1A1; (d) TNC; y (e) GJA1 (gen de referencia empleado RPL13A) en MSCs de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) sembradas sobre las láminas de PLLA funcionalizadas con Fn (FN-PLLA), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PLLA) a 3 días estimuladas. a, b, c, d $p < 0,05$.

1.2 Análisis por inmunofluorescencia en las membranas de PLLA

Mediante marcaje con inmunofluorescencia de las proteínas COL2 (en verde) y *GJA1* (en rojo) se pudo observar la presencia de ambas proteínas en las células *MSCs* de pacientes *OA* o no *OA* sembradas en las láminas de *PLLA* en todas las condiciones. Sin embargo, COL2 y *GJA1* apenas fueron detectable en el caso de FN-*PLLA* y en las condiciones donde las células formaban agregados más difusos y de tamaño reducido (Figura 19).

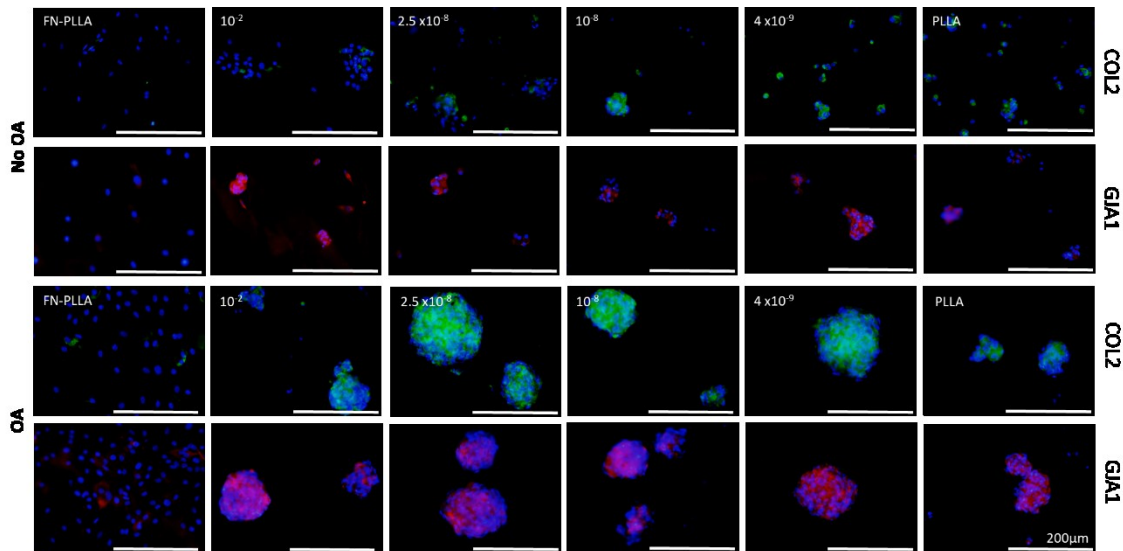


Figura 19. Inmunofluorescencia de COL2 (verde) y *GJA1* (rojo) con contratinción de DAPI (azul) de las células *MSCs* de pacientes no artrósicos (no *OA*) y artrósicos (*OA*) sembradas sobre las láminas de *PLLA* funcionalizadas con Fn (FN-*PLLA*), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} %p/p) y sin funcionalizar (*PLLA*) a 3 días estimuladas. Barra de escala de 200 µm.

Por otro lado, no se detectó fluorescencia en las micromasas formadas a 3 días con medio condrogénico con células *MSCs* de pacientes no *OA* ni con *MSCs* de pacientes *OA* (Figura 20).

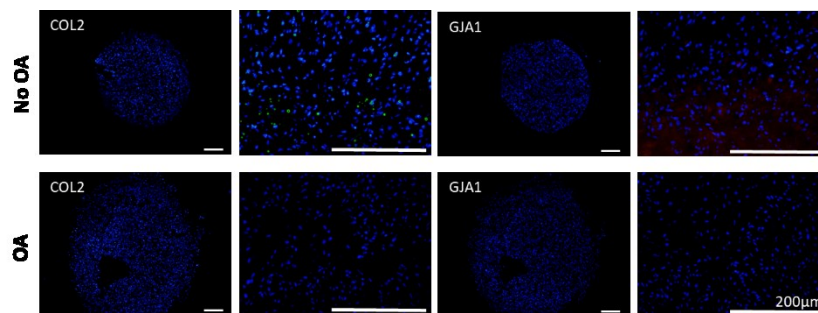


Figura 20. Inmunofluorescencia de COL2 (verde) y *GJA1* (rojo) con contratinción de DAPI (azul) de las células *MSCs* de pacientes no artrósicos (no *OA*) y artrósicos (*OA*) sembradas en micromasa a 3 días estimuladas. Barra de escala de 200 µm.

1.2.1 Evaluación del tamaño de los agregados celulares formados en las membranas de PLLA

Las células *MSCs* sembradas en las láminas de PLLA formaron agregados, considerando agregado una agrupación constituida como mínimo por 5 células, en todas las condiciones excepto en FN-PLLA donde las células formaron una monocapa.

Los agregados presentaron una tendencia a ser de mayor tamaño en la condición PLLA RGD-Cys-D1 $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p, tanto en el caso de las células de paciente OA ($6,39 \times 10^4 \pm 7,3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) como no OA ($1,35 \times 10^4 \pm 1,31 \times 10^4 \mu\text{m}^2$). Sin embargo, los agregados formados por las *MSCs* de paciente OA tendieron a ser de mayor tamaño y su apariencia fue más compacta que en el caso de las *MSCs* no OA (Figura 21, a). El área de las micromasas formadas con estas células también se cuantificó. Los resultados mostraron un mayor tamaño en las micromasas formadas con *MSCs* de pacientes OA ($9 \times 10^{-1} \pm 5,1 \times 10^{-1} \text{mm}^2$) con respecto a las no OA ($5,1 \times 10^{-1} \pm 2,2 \times 10^{-1} \text{mm}^2$). Sin embargo, en ningún caso la diferencia fue significativa (Figura 21, b).



Figura 21. (a) Gráfica del área (μm^2) de los agregados formados por las *MSCs* de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) sembradas sobre las láminas de PLLA funcionalizadas con Fn (Fn-PLLA), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PLLA) a 3 días estimuladas. (b) Gráfica del área (mm^2) de las micromasas de células *MSCs* de pacientes no artrósicos (no OA, barra blanca) y artrósicos (OA, barra negra) a 3 días estimuladas.

2 Evaluación de la función de las uniones comunicantes y adhesiones focales en la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales humanas

2.1 Células primarias *MSCs* de pacientes no OA y OA y líneas celulares 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs*

Con el fin de poder evaluar la respuesta de las *MSCs* a los nanopatrones de RGD se estudió como las *MSCs* de pacientes no OA y OA expresaban los genes marcadores de condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; hipertrofia: *COL10A1*; y desdiferenciación: *COL1A1*; las conexinas y panexina, proteínas que conforman las uniones comunicantes, expresadas tanto por *MSCs* como condrocitos: *GJA1*, *GJA3*, *GJA5*, *GJB1*, *GJC1* y *PANX3*; y subunidades alfa de las integrinas, proteínas que conforman

las uniones focales, implicadas en el reconocimiento de la secuencia RGD de la Fn: ITGA2B, ITGA5, ITGA8 e ITGAV.

Asimismo, para poder continuar el estudio en andamios 3D de PCL con diferentes nanopatrones de dendrímeros se determinó que era necesario emplear una línea celular en lugar de células primarias ante el elevado número de *MSCs* necesarias para llevar a cabo los experimentos. Todas las células de una línea celular proceden de un mismo clon, es decir, tienen el mismo material genético, lo que permite obtener resultados sin desviación por las diferencias entre pacientes. Además, al estar las células de las líneas celulares inmortalizadas, no hay límite al número de células que se pueden emplear en los experimentos pudiéndose expandir las células hasta alcanzar la cantidad necesaria en cada caso.

De este modo se evaluó cuál de las líneas celulares de *MSCs* disponibles, 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs*, era la más apropiada para llevar al cabo el estudio. Esto se realizó comparando la expresión génica de los genes mencionados entre las *MSCs* y ambas líneas celulares de *MSCs*.

2.1.1 Expresión génica en *MSCs*

Los resultados de la expresión génica se representan como la media con la desviación estándar de la expresión de los genes de estudio en *MSCs OA*, 127TT-*hMSCs* y 3a6-*hMSCs* en proporción a la expresión en las *MSCs no OA* (valor otorgado de 1).

El estudio de la expresión de *SOX9* mostró, por un lado, una disminución de la expresión en las *MSCs OA* ($4,91 \times 10^{-1} \pm 3,45 \times 10^{-3}$) con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 1,59 \times 10^{-2}$). Por otro lado, una mayor expresión en las células de la línea 3a6-*hMSCs* ($1,53 \times 10^1 \pm 3,13 \times 10^{-1}$) y una menor expresión en las células de la línea 127TT-*hMSC* ($4,13 \times 10^{-2} \pm 7,82 \times 10^{-4}$) con respecto a las *MSCs no OA* (Figura 22, a).

Asimismo, las *MSCs no OA*, las *MSCs OA* y las 127TT-*hMSCs* no mostraron expresión de *COL2A1*, sí que se observó expresión de dicho gen en las 3a6-*hMSCs* ($4,14 \times 10^{-1} \pm 5,85 \times 10^{-1}$) (Figura 22, a).

La expresión de *COL1A1* fue similar en las *MSCs no OA* ($1 \pm 3,91 \times 10^{-4}$) y las *MSCs OA* ($8,38 \times 10^{-1} \pm 2,62 \times 10^{-4}$). Sin embargo, presentó un aumento de expresión en las 3a6-*hMSCs* ($1,74 \pm 2,37 \times 10^{-3}$) y una disminución en las 127TT-*hMSCs* ($1,87 \times 10^{-3} \pm 1,48 \times 10^{-6}$) con respecto a las *MSCs no OA* (Figura 22, b).

Finalmente, la expresión de *COL10A1* se mostró disminuida en las *MSCs OA* ($6,67 \times 10^{-1} \pm 2,96 \times 10^{-2}$) con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 2,22 \times 10^{-2}$). De mismo modo, presentándose la expresión

de este gen muy disminuida en las 3a6-*hMSCs* ($1,01 \times 10^{-2} \pm 4,48 \times 10^{-4}$) y no expresado en las 127TT-*hMSCs* (Figura 22, c).

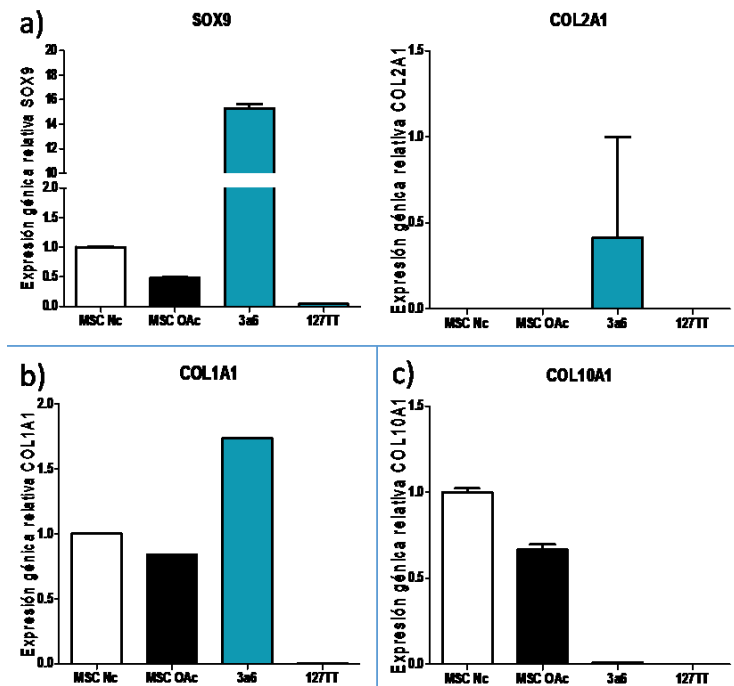


Figura 22. Expresión génica relativa en *MSCs* no OA (Nc, barra blanca) y OA (OAc, barra negra) y en *MSCs* de las líneas celulares (barras azules) 3a6-*hMSCs* (3a6) y 127TT-*hMSCs* (127TT) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; (b) gen marcador de la desdiferenciación: *COL1A1*; y (c) gen marcador de la hipertrofia: *COL10A1*. Datos representados como media con desviación estándar.

El análisis de la expresión de las conexinas y panexina expresadas por *MSCs* y condrocitos mostró, por un lado, un incremento de la expresión de *GJA1* en las *MSCs* OA ($3,53 \times 10^3 \pm 1,45 \times 10^4$) y las 3a6-*hMSCs* ($1,18 \times 10^3 \pm 7,91 \times 10^3$) con respecto a las *MSCs* no OA ($1 \pm 4,82$). Dicho aumento de expresión también se observó en las 127TT-*hMSCs* ($3,26 \pm 1,14 \times 10^1$) pero no tan marcado. Del mismo modo, se observó el mismo patrón de expresión en el gen *GJC1*, mostrándose un aumento de expresión en las *MSCs* OA ($2,42 \times 10^3 \pm 6,55 \times 10^3$) y las 3a6-*hMSCs* ($5,86 \times 10^2 \pm 5,78 \times 10^3$) con respecto a las *MSCs* no OA ($1 \pm 9,61$); y un incremento no tan marcado en las 127TT-*hMSCs* ($1,69 \times 10^1 \pm 1,27 \times 10^2$). Finalmente, la expresión de *PANX3* se observó incrementada en las *MSCs* OA ($1,7 \times 10^2 \pm 2,38 \times 10^3$), ligeramente incrementada en las 127TT-*hMSCs* ($4,2 \pm 5,2 \times 10^1$) e igualmente expresada en las 3a6-*hMSCs* ($8,94 \times 10^{-1} \pm 1,26 \times 10^1$) con respecto con las *MSCs* no OA ($1 \pm 2,28$) (Figura 23, a).

La expresión de *GJA5*, conexina expresada principalmente por las *MSCs*, se observó incrementada en las *MSCs* OA ($3,41 \times 10^2 \pm 7,96 \times 10^3$) con respecto a las *MSCs* no OA ($1 \pm 1,46 \times 10^1$). Por otro lado, la expresión de este gen se vio disminuida en las 3a6-*hMSCs* ($1,95 \times 10^{-1}$

$1 \pm 4,55$) y aumentada en las 127TT-*hMSCs* ($8,83 \pm 2,53 \times 10^2$) con respecto a las *MSCs* no OA (Figura 23, b).

Por último, la expresión de *GJA3* y *GJB1*, conexinas expresadas principalmente por condrocitos, mostró un aumento de la expresión de *GJA3* en las *MSCs* OA ($1,35 \times 10^3 \pm 1,49 \times 10^4$), 3a6-*hMSCs* ($2,06 \times 10^2 \pm 4,42 \times 10^3$) y 127TT-*hMSCs* ($7,66 \times 10^1 \pm 9,28 \times 10^2$) con respecto a las *MSCs* no OA ($1 \pm 8,71$). Sin embargo, solo las *MSCs* no OA ($1 \pm 1,65 \times 10^1$) expresaron *GJB1* (Figura 23, c).

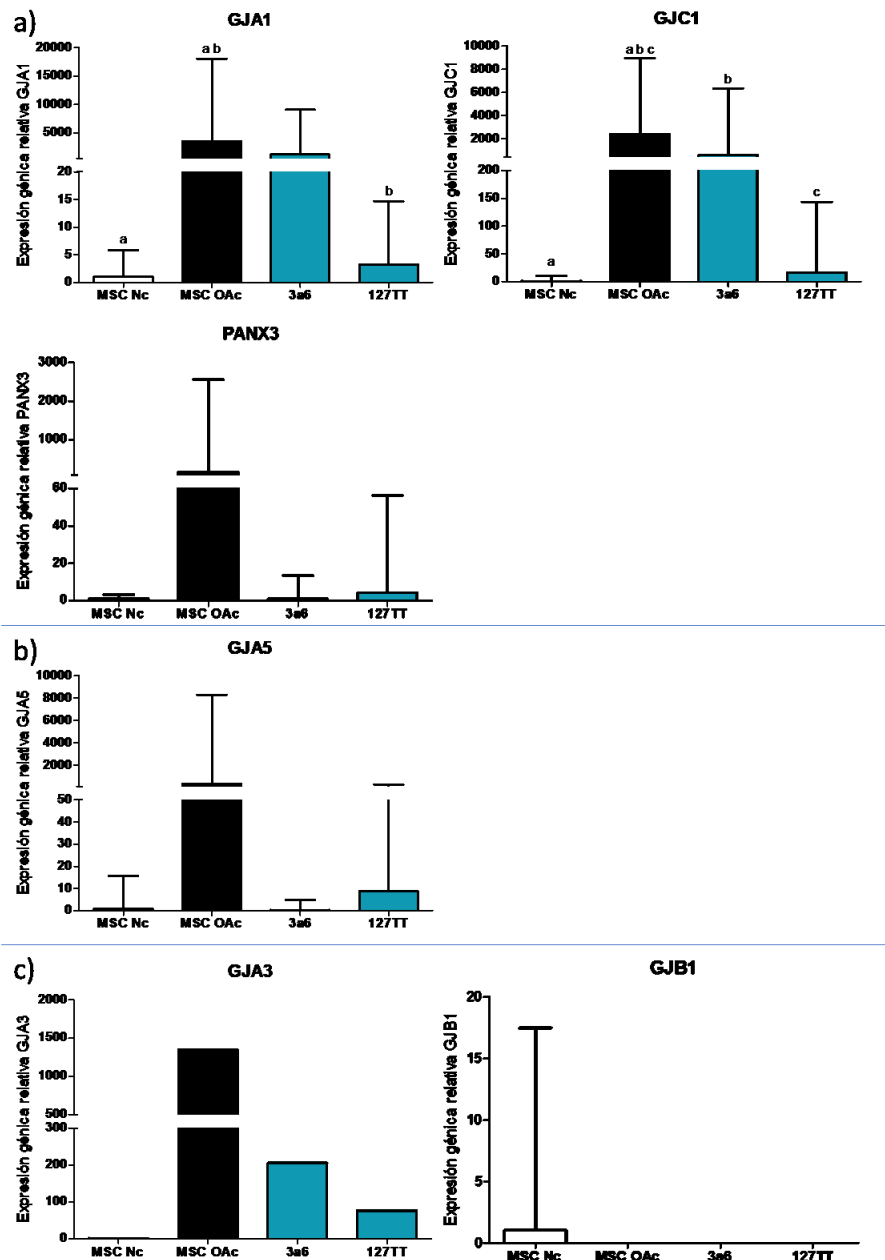


Figura 23. Expresión génica relativa en *MSCs* no OA (Nc, barra blanca) y OA (OAc, barra negra) y en *MSCs* de las líneas celulares (barras azules) 3a6-*hMSCs* (3a6) y 127TT-*hMSCs* (127TT) de las conexinas y panexinas expresadas principalmente por (a) *MSCs* y condrocitos: *GJA1*, *GJC1* y *PANX3*; (b) *MSCs*: *GJA5*; y (c) condrocitos: *GJA3* y *GJB1*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c $p < 0,05$.

La expresión de las subunidades alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD de la Fn mostró una expresión de ITGA2B incrementada en las *MSCs OA* ($1,59 \times 10^3 \pm 2,38 \times 10^4$) con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 9,98$). También se observó este incremento en la expresión en las *3a6-hMSCs* ($7,36 \pm 1,36 \times 10^2$) y las *127TT-hMSCs* ($8,21 \times 10^1 \pm 2,16 \times 10^3$), aunque no tan marcado. Asimismo, la expresión de ITGA5 en las *MSCs OA* ($2,87 \times 10^3 \pm 6,02 \times 10^3$), *3a6-hMSCs* ($1,13 \times 10^3 \pm 6,29 \times 10^3$) y *127TT-hMSCs* ($8,85 \pm 1,89 \times 10^1$) también se observó incrementada con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 4,92$). Por otro lado, la expresión de ITGAV se mostró incrementada en las *MSCs OA* ($1,56 \times 10^3 \pm 9,72 \times 10^2$) con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 7,05 \times 10^{-1}$). Observándose del mismo modo incrementada en las *3a6-hMSCs* ($6,41 \times 10^1 \pm 1,89 \times 10^2$) y *127TT-hMSCs* ($2,92 \pm 7,46$) aunque en menor medida. De igual forma, la expresión de ITGA8 se mostró incrementada en las *MSCs OA* ($4,26 \times 10^2 \pm 3,62 \times 10^2$) con respecto a las *MSCs no OA* ($1 \pm 7,37 \times 10^{-1}$). Sin embargo, la expresión en *3a6-hMSCs* ($2,63 \pm 3,96$) y *127TT-hMSCs* ($1,21 \pm 3,85$) se presentó similar a observada en las *MSCs no OA* (Figura 24).

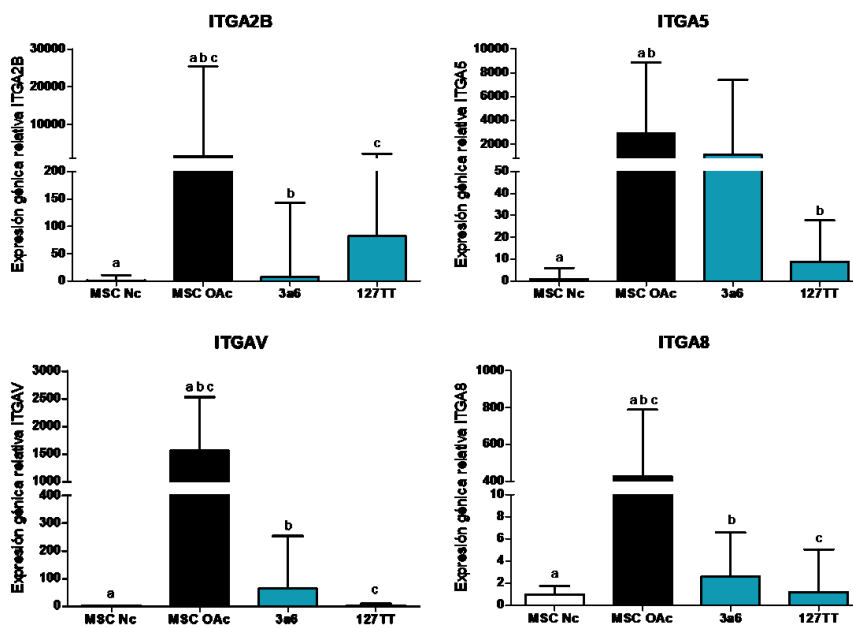


Figura 24. Expresión génica relativa en *MSCs no OA* (Nc, barra blanca) y *OA* (OAc, barra negra) y en *MSCs* de las líneas celulares (barras azules) *3a6-hMSCs* (3a6) y *127TT-hMSCs* (127TT) de subunidades alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD: ITGA2B, ITGA5, ITGAV e ITGA8. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c $p < 0,05$.

2.2 Diferenciación condrogénica en las líneas celulares *3a6-hMSCs* y *127TT-hMSCs*

Del mismo modo, se estudió el potencial condrogénico y la importancia de las uniones comunicantes y adhesiones focales durante la condrogénesis en las *3a6-hMSCs* y *127TT-hMSCs*. Para ello se emplearon cultivos en micromasa con medio condrogénico a diferentes tiempos, usando como control positivo de condrogénesis condrocitos primarios de pacientes no *OA*. Los resultados de la expresión génica se representan como la media con la desviación estándar de

la expresión de los genes de estudio en todas las condiciones en proporción a la expresión en las 3a6-*hMSCs* o 127TT-*hMSCs* basal (valor otorgado de 1).

2.2.1 Línea celular 3a6-*hMSCs*

En la línea celular 3a6-*hMSCs* se estudió la expresión génica en el cultivo en micromasa a 3, 9 y 21 días. Complementando los resultados con histología e inmunofluorescencia para analizar la morfología y *ECM* sintetizada por estas células durante la diferenciación condrogénica.

2.2.1.1 Expresión génica durante la condrogénesis en 3a6-*hMSCs*

Los genes a estudiar en las 3a6-*hMSCs* fueron los marcadores de condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; hipertrofia: *COL10A1*; y desdiferenciación: *COL1A1*; y, posteriormente, las conexinas y panexina: *GJA1*, *GJA3*, *GJA5*, *GJB1*, *GJC1* y *PANX3*; y subunidad alfa de la integrina: *ITGA5*; con el propósito de entender que genes expresa durante la condrogénesis esta línea celular, y si expresaba integrinas reconocedoras de la secuencia RGD que le permitirían responder a los nanopatrones que posteriormente se emplearían.

La expresión de *SOX9* en las 3a6-*hMSCs* mostró una considerable disminución cuando fueron cultivadas en micromasa tanto cuando no fueron estimuladas (3 días: $7,61 \times 10^{-4} \pm 8,61 \times 10^{-8}$; 9 días: $8,38 \times 10^{-4} \pm 3,47 \times 10^{-7}$; y 21 días: $5,53 \times 10^{-4} \pm 8,78 \times 10^{-8}$) como cuando fueron estimuladas condrogénicamente (3 días: $4,81 \times 10^{-4} \pm 5,35 \times 10^{-8}$; 9 días: $5,11 \times 10^{-4} \pm 1,1 \times 10^{-7}$; y 21 días: $1 \times 10^{-3} \pm 1,92 \times 10^{-7}$) con respecto a nivel basal ($1 \pm 1,34 \times 10^{-3}$). También se observó una mayor expresión en las 3a6-*hMSCs* que en los condrocitos ($1,29 \times 10^{-4} \pm 9,24 \times 10^{-8}$). Puede apreciarse una ligera tendencia a aumentar la expresión de *SOX9* en las micromasas estimuladas a medida que pasa el tiempo de cultivo. Por otro lado, la expresión de *SOX9* fue en todas las condiciones superior a la expresión en los condrocitos (Figura 25, a).

Sin embargo, la expresión de *COL2A1* se presentó aumentada en las micromasas de 3a6-*hMSCs* no estimuladas (3 días: $2,31 \pm 5,41$; 9 días: $5,2 \pm 1,73 \times 10^1$; y 21 días: $2,27 \times 10^{-1} \pm 7,75 \times 10^{-1}$) con respecto a las estimuladas (3 días: $1,72 \times 10^{-1} \pm 5,89 \times 10^{-1}$; 9 días: sin expresión; y 21 días: $7,28 \times 10^{-1} \pm 2,49$). Presentándose en todas las condiciones disminuida la expresión de este gen con respecto a la expresión en condrocitos ($2,49 \times 10^1 \pm 8,33 \times 10^1$) (Figura 25, a).

Por otro lado, la expresión de *COL1A1* se mostró significativamente disminuida en todas las condiciones con respecto a la expresión a nivel basal ($1 \pm 7,87 \times 10^{-4}$) de las 3a6-*hMSCs*. Manteniéndose la expresión estable en los diferentes tiempos de cultivo en las micromasas no estimuladas (3 días: $1,87 \times 10^{-3} \pm 2,62 \times 10^{-6}$; 9 días: $1,58 \times 10^{-3} \pm 2,5 \times 10^{-6}$; y 21 días: $1,44 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-6}$) y aumentando en las micromasas estimuladas (3 días: $1,15 \times 10^{-3} \pm 1,54 \times 10^{-6}$; 9 días: $5,46 \times 10^{-3}$

$\pm 8,33 \times 10^{-6}$; y 21 días: $1,28 \times 10^{-2} \pm 1,72 \times 10^{-5}$). En todos los casos la expresión fue superior a la observada en los condrocitos ($7,46 \times 10^{-6} \pm 5,64 \times 10^{-9}$) (Figura 25, b).

Finalmente, COL10A1 presentó un aumento de la expresión en las micromasas estimuladas a los 9 días ($1,86 \times 10^2 \pm 3,2 \times 10^2$) y 21 días ($1,68 \times 10^2 \pm 4,22 \times 10^2$) de cultivo con respecto al nivel basal ($1 \pm 4,41$) en las 3a6-*hMSCs*. Siendo este aumento considerable también con respecto a los condrocitos ($6,18 \pm 2,53 \times 10^1$) (Figura 25, c).

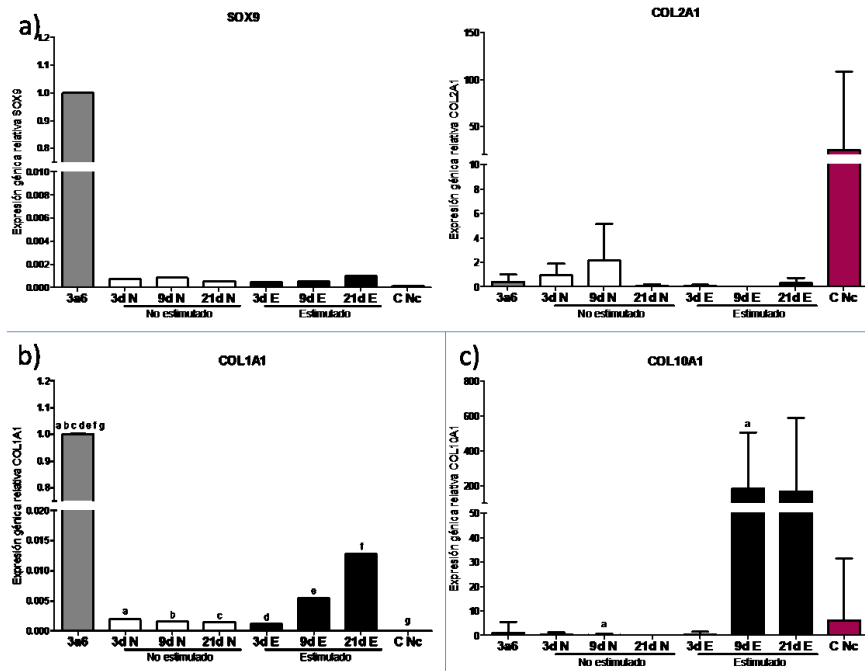


Figura 25. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 3a6-*hMSCs* a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; (b) gen marcador de la desdiferenciación: *COL1A1*; y (c) gen marcador de la hipertrofia: *COL10A1*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$.

El estudio de la expresión de las conexinas expresadas por las *MSCs* y condrocitos durante la condrogénesis en las 3a6-*hMSCs* mostró una disminución de la expresión del gen *GJA1* cuando fueron cultivadas en micromasa, tanto no estimulada (3 días: $3,29 \times 10^{-3} \pm 1,09 \times 10^{-5}$; 9 días: $2,79 \times 10^{-3} \pm 1,53 \times 10^{-5}$; y 21 días: $5,43 \times 10^{-3} \pm 3,74 \times 10^{-5}$) como estimulada (3 días: $2,14 \times 10^{-3} \pm 5,3 \times 10^{-6}$; 9 días: $3,04 \times 10^{-3} \pm 1,06 \times 10^{-5}$; y 21 días: $7,08 \times 10^{-3} \pm 2,92 \times 10^{-5}$), con respecto al nivel basal ($1 \pm 5,7 \times 10^{-3}$). También se pudo observar que a medida que aumentaba el tiempo de cultivo la expresión presentó una tendencia a incrementar en ambas condiciones. Sin embargo, todas las condiciones presentaron una mayor expresión de *GJA1* que los condrocitos ($3,42 \times 10^{-4} \pm 1,13 \times 10^{-6}$). Del mismo modo, la expresión de *GJC1* fue superior a nivel basal ($1 \pm 1,68 \times 10^{-2}$) en las 3a6-*hMSCs* que en el resto de las condiciones. Observándose una ligera tendencia a aumentar la expresión con respecto a los 3 días de cultivo (no estimuladas: $6,63 \times 10^{-3} \pm 6,25 \times 10^{-5}$; y

estimuladas: $4,86 \times 10^{-3} \pm 4,76 \times 10^{-5}$), a los 9 días de cultivo tanto en las no estimuladas ($2,51 \times 10^{-2} \pm 2,66 \times 10^{-4}$) como en las estimuladas ($4,81 \times 10^{-2} \pm 1,07 \times 10^{-3}$), y disminuyendo en ambos casos a los 21 días de cultivo (no estimuladas: $7,04 \times 10^{-3} \pm 4,24 \times 10^{-5}$; y estimuladas: $1,1 \times 10^{-2} \pm 4,51 \times 10^{-6}$). Por último, la PANX3 presentó un patrón de expresión diferente en el caso de las micromasas no estimuladas donde se observó con respecto a los 3 días ($3,75 \pm 1,18 \times 10^1$) un aumento de expresión a los 9 días ($7,76 \times 10^1 \pm 5,69 \times 10^2$) y posterior disminución a los 21 días ($1,64 \times 10^1 \pm 2,54 \times 10^2$); que en el caso de las micromasas estimuladas, en las cuales se observó un aumento de la expresión a medida que aumentaba el tiempo de cultivo (3 días: $2,32 \pm 1,87 \times 10^1$; 9 días: $4,59 \pm 5,74 \times 10^1$; y 21 días: $1,65 \times 10^1 \pm 2,22 \times 10^2$). Siendo en todos los casos la expresión superior a la observada a nivel basal ($1 \pm 1,57 \times 10^1$) e inferior a la expresada por los condrocitos ($4,57 \times 10^1 \pm 4,52 \times 10^2$) (Figura 26).

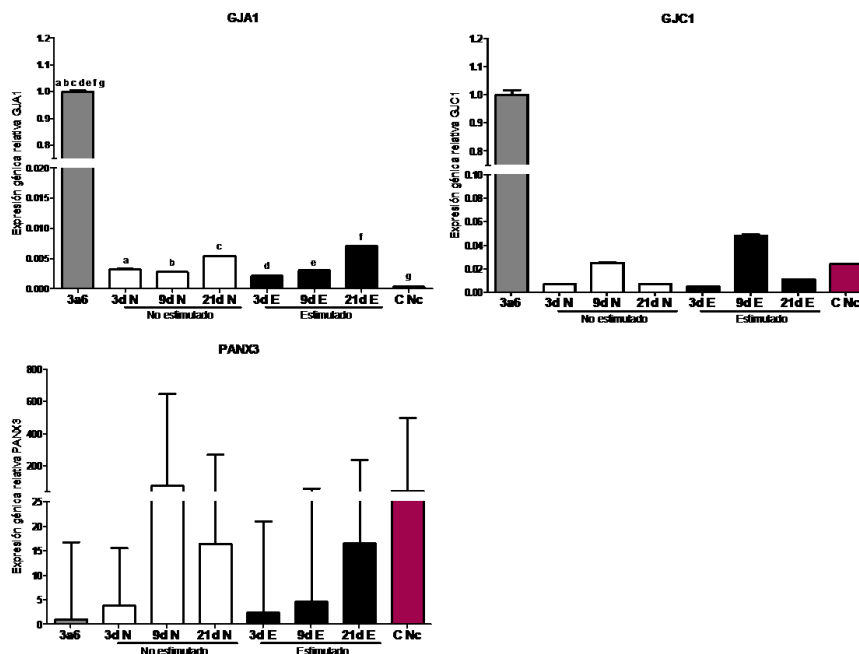


Figura 26. Expresión génica relativa en MSCs de la línea celular 3a6-*hMSCs* a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por MSCs y condrocitos: *GJA1*, *GJC1* y *PANX3*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$.

La conexina *GJA5* durante la condrogénesis en las 3a6-*hMSCs* presentó una expresión aumentada, con respecto a los 3 días de cultivo (no estimulada: $1,18 \pm 1 \times 10^2$; y estimulada: $1,39 \pm 1,17 \times 10^2$), a 9 días (no estimulada: $1,65 \times 10^1 \pm 1,04 \times 10^3$; y estimulada: $1,13 \times 10^1 \pm 6,96 \times 10^2$) y una disminución posterior de la expresión a 21 días (no estimuladas: $2,62 \pm 1,89 \times 10^2$; y estimulada: $4,29 \pm 1,99 \times 10^2$). Sin embargo, la expresión en ningún caso alcanzó la presentada por los condrocitos ($1,29 \times 10^4 \pm 9,24 \times 10^8$) (Figura 27, a).

Por otro lado, la expresión de *GJA3* y *GJB1*, conexinas expresadas por los condrocitos, presentaron un patrón similar en ambos casos con una expresión en las micromasas no estimuladas aumentada, con respecto a los 3 días (*GJA3*: $3,35 \times 10^{-2} \pm 2,67 \times 10^{-3}$; y *GJB1*: $3,1 \times 10^{-1} \pm 3,44 \times 10^{-1}$), en las micromasas cultivadas a 9 días (*GJA3*: $1,17 \pm 1,23 \times 10^{-1}$; y *GJB1*: $1,36 \times 10^1 \pm 1,85 \times 10^1$) y una disminución de la expresión a los 21 días (*GJA3*: $2,51 \times 10^{-1} \pm 2,58 \times 10^{-2}$; y *GJB1*: $6,69 \pm 9,44$). Mientras que en las micromasas estimuladas lo que se observó fue una tendencia a aumentar progresivamente a medida que aumentaban los días de cultivo (*GJA3*: 3 días $4,23 \times 10^{-2} \pm 2,44 \times 10^{-3}$; 9 días $9,56 \times 10^{-2} \pm 9,4 \times 10^{-3}$ y 21 días $3,17 \times 10^{-1} \pm 3,17 \times 10^{-2}$; y *GJB1*: 3 días $4,18 \times 10^{-1} \pm 5,43 \times 10^{-1}$; 9 días $1,69 \pm 1,94$; 21 días $4,02 \pm 5,59$). En el caso de *GJA3* la expresión a 21 días de las micromasas estimuladas fue superior que la expresión en los condrocitos ($1,19 \times 10^{-1} \pm 1,17 \times 10^{-2}$); sin embargo, en el caso de la expresión de *GJB1* la expresión a 21 días en las micromasas estimuladas fue inferior a la observada en los condrocitos ($1,71 \times 10^1 \pm 2,27 \times 10^1$) (Figura 27, b).

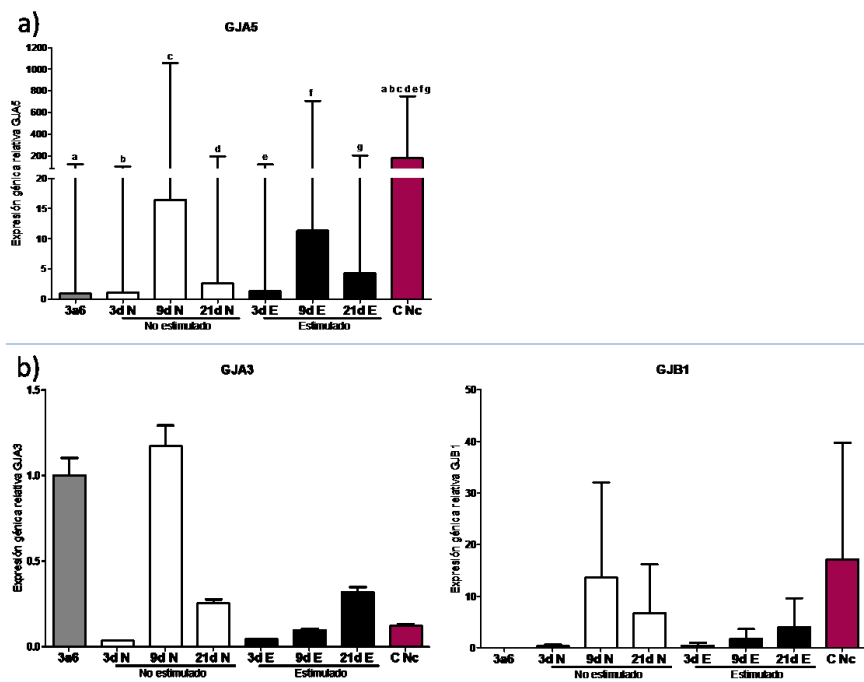


Figura 27. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 3a6-*hMSCs* a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por (a) *MSCs*: *GJA5* y (b) condrocitos: *GJA3* y *GJB1*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$.

Finalmente, la expresión de la *ITGA5* durante la condrogénesis de las 3a6-*hMSCs* mostró una tendencia a mantenerse la expresión sin apenas variaciones en el caso de las micromasas no estimuladas a los 3 días ($4,93 \times 10^{-3} \pm 2,11 \times 10^{-5}$), 9 días ($3,79 \times 10^{-3} \pm 9,61 \times 10^{-6}$) y 21 días ($2,93 \times 10^{-3} \pm 1,06 \times 10^{-5}$) de cultivo; mientras que en las estimuladas se observó una tendencia a aumentar

la expresión, con respecto a los 3 días ($4,64 \times 10^{-3} \pm 7,74 \times 10^{-6}$), a los 9 días ($8,52 \times 10^{-3} \pm 1,54 \times 10^{-5}$) y una posterior disminución a los 21 días ($5,01 \times 10^{-3} \pm 2,34 \times 10^{-5}$). La expresión en todas las condiciones fue inferior a la observada a nivel basal ($1 \pm 4,95 \times 10^{-3}$) en las 3a6-*hMSCs* y superior a la mostrada por los condrocitos ($1,85 \times 10^{-3} \pm 4,01 \times 10^{-6}$) (Figura 28).

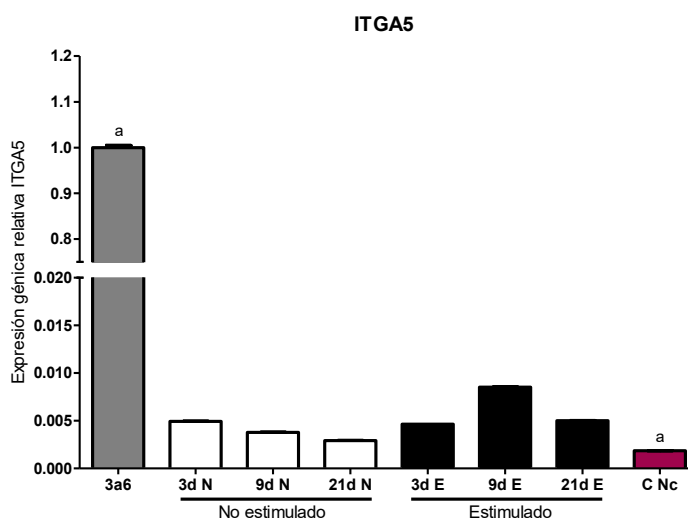


Figura 28. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 3a6-*hMSCs* a nivel basal (3a6, barra gris) y en cultivo en micromasa a 3 (3d), 9 (9d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de la subunidad alfa de la integrina reconocedora de RGD: ITGA5. Datos representados como media con desviación estándar. a $p < 0,05$.

2.2.1.2 Análisis histológico de las micromasas de 3a6-*hMSCs*

Con el fin de reforzar los resultados obtenidos mediante expresión génica y analizar la diferenciación condrogénica en las micromasas formadas con las células 3a6-*hMSCs* a los tiempos 3, 9 y 21 días, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para ver la morfología y distribución celular y safranina-o para la detección de glicosaminoglicanos.

La tinción con hematoxilina-eosina nos permite realizar un estudio de la morfología y disposición de las células, observándose el núcleo celular en tonos de color azul y púrpura y el citoplasma en tonos de color rosa. De este modo observamos que las micromasas estimuladas condrogénicamente presentaron un aspecto más compacto en comparación con las no estimuladas. En las micromasas estimuladas a 21 días se pudo observar dos zonas diferenciadas: una zona externa donde las células de aspecto más fibroblástico se organizaron paralelamente a la superficie de la micromasa y una zona más interna donde se observó una organización aleatoria de las células, que presentaban una morfología más redondeada, más típica de los condrocitos (Figura 29, a).

La tinción de la safranina-o permite evidenciar la presencia de glucosaminoglicanos observándose un viraje hacia el naranja en caso afirmativo. Dado que no se observó viraje a

naranja tras la tinción de las muestras, no se pudo determinar la presencia de los mismos en las micromasas de 3a6-*hMSC* (Figura 29, a).

La medición del área de las micromasas no mostró diferencias significativas en tamaño entre las dos condiciones, no estimuladas (3 días $5,67 \pm 3,89$ %; 9 días $5,11 \pm 3,47$ % y 21 días $6,53 \pm 1,91$ %) y estimuladas (3 días $8,11 \pm 3,84$ %; 9 días $7,15 \pm 2,20$ % y 21 días $6,51 \pm 1,61$ %), a lo largo del tiempo. Sí se observaron diferencias significativas en la circularidad, siendo las micromasas estimuladas a 3 ($7,4 \times 10^{-1} \pm 1,6 \times 10^{-1}$) y 9 días ($8,7 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-2}$) significativamente más circulares que las micromasas no estimuladas de los mismos tiempos (3 días $4 \times 10^{-1} \pm 1,7 \times 10^{-1}$ y 9 días $4,3 \times 10^{-1} \pm 2,2 \times 10^{-1}$). A 21 días se perdió la significancia, pero se mantiene la tendencia (no estimulada $4,3 \times 10^{-1} \pm 3 \times 10^{-1}$ vs estimulada $8 \times 10^{-1} \pm 7 \times 10^{-2}$) (Figura 29, b).

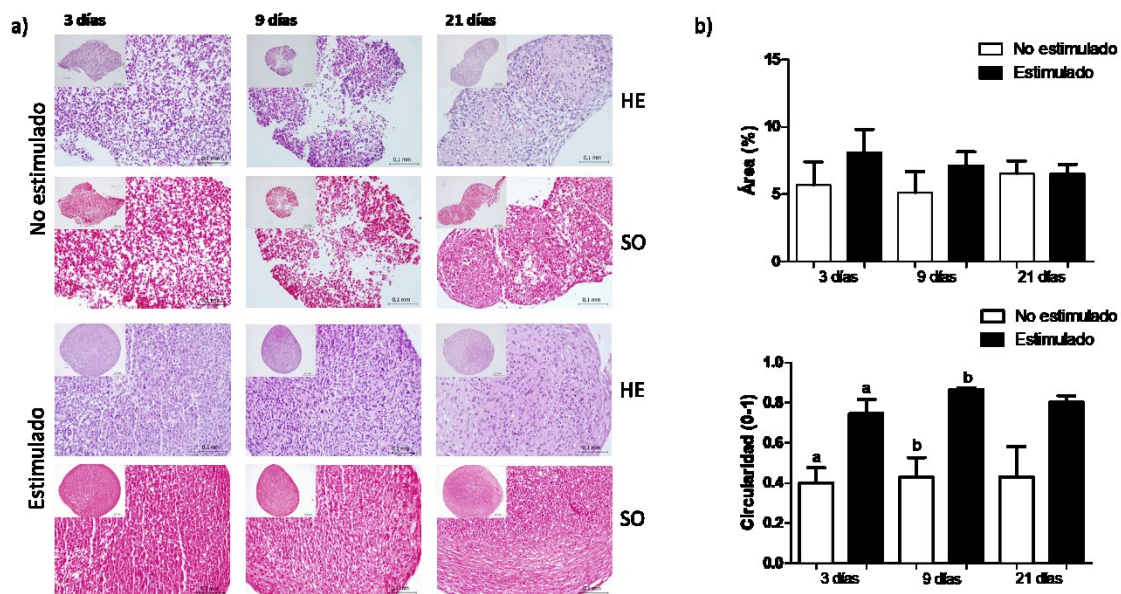


Figura 29. (a) Tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y safranina-o (SO) de las micromasas de 3a6-*hMSCs* a 3, 9 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm. (b) Gráficas del área (%) y circularidad (0-1) de las micromasas de 3a6-*hMSCs* a 3, 9 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b, $p < 0,05$.

2.2.1.3 Análisis por inmunofluorescencia de las micromasas de 3a6-*hMSCs*

Se estudió la presencia de *GJA1* y *COL2* en las micromasas de 3a6-*hMSC* formadas a 3, 9 y 21 días mediante inmunofluorescencia. Se detectó presencia de ambas proteínas a todos los tiempos en las micromasas tanto no estimuladas como estimuladas. Se observó una distribución aproximadamente uniforme de ambas proteínas, sin observarse ninguna diferencia entre las zonas de las micromasas (Figura 30, a).

Se observó mayor área de fluorescencia de *GJA1* en las micromasas no estimuladas que en las estimuladas a 3 días (no estimuladas $4,46 \times 10^1 \pm 4,95 \times 10^1$ %*GJA1*/ %*DAPI* vs estimuladas $1,23 \times 10^1 \pm 2,6 \times 10^{-1}$ %*GJA1*/ %*DAPI*), 9 días (no estimuladas $6,1 \times 10^1 \pm 3,47 \times 10^1$ %*GJA1*/ %*DAPI* vs

estimuladas $2,16 \times 10^1 \pm 9,45$ %GJA1/%DAPI) y 21 días (no estimuladas $8,44 \times 10^1 \pm 1,88 \times 10^1$ %GJA1/%DAPI vs estimuladas $3,27 \times 10^1 \pm 2,96 \times 10^1$ %GJA1/%DAPI) (Figura 30, b).

El área de fluorescencia de COL2 a 3 días fue mayor en no estimuladas ($1,43 \times 10^2 \pm 1,35 \times 10^2$ %COL2/%DAPI) que en las estimuladas ($5,62 \pm 6,81$ %COL2/%DAPI). Los resultados a los 9 días fueron similares entre las micromasas no estimuladas ($1,02 \times 10^2 \pm 4,85 \times 10^1$ %COL2/%DAPI) y estimuladas ($9,56 \times 10^1 \pm 8,72 \times 10^1$ %COL2/%DAPI). Sin embargo, a 21 días el área de fluorescencia de COL2 volvió a mostrar la misma tendencia que a 3 días, siendo significativamente mayor en las micromasas no estimuladas ($1,71 \times 10^2 \pm 8,16 \times 10^1$ %COL2/%DAPI) que en las estimuladas ($4,02 \times 10^1 \pm 2,88 \times 10^1$ %COL2/%DAPI) (Figura 30, b).

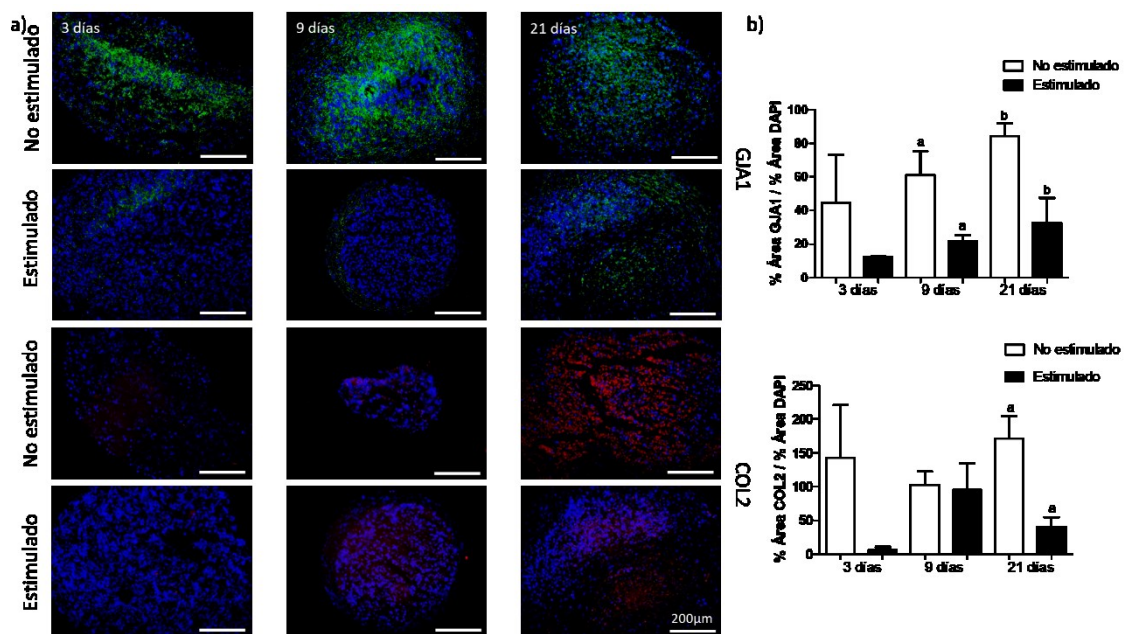


Figura 30. (a) Inmunofluorescencia de *GJA1* (verde) y *COL2* (rojo) con contratinción de *DAPI* (azul) de las micromasas de 3a6-hMSCs a 3, 9 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 200 μ m. (b) Gráficas del área (%) de fluorescencia de *GJA1* y *COL2* en proporción al área (%) de fluorescencia de *DAPI* de las micromasas de 3a6-hMSCs a 3, 9 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b $p < 0,05$.

2.2.2 Línea celular 127TT-hMSCs

La línea celular 127TT-hMSCs presenta limitaciones a la hora de cultivarse en micromasa, por lo que se sustituyó la micromasa por el método de gota colgante para obtener un cultivo 3D que permita la agregación celular y la condrogénesis. De este modo, en la línea celular 127TT-hMSCs se estudió la expresión génica en el cultivo en gota colgante a 3, 9, 14 y 21 días. Posteriormente complementándose dicho estudio con la histología de los agregados formados para analizar la morfología y *ECM* sintetizada por estas células durante la diferenciación condrogénica.

2.2.2.1 Expresión génica durante la condrogénesis en 127TT-hMSCs

Los genes estudiados en la línea celular 127TT-*hMSCs* fueron los marcadores de condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; hipertrofia: *COL10A1*; y desdiferenciación: *COL1A1*; y, posteriormente, las conexinas y panexina: *GJA1*, *GJA3*, *GJA5*, *GJB1*, *GJC1* y *PANX3*; y subunidades alfa de las integrinas: *ITGA2B*, *ITGA5*, *ITGA8* e *ITGAV*. Con el propósito, como se dijo anteriormente, de entender que genes se expresan durante la condrogénesis en esta línea celular, y si expresan integrinas reconocedoras de la secuencia RGD que le permitirían responder a los nanopatrones que posteriormente se emplearían.

El estudio de los genes marcadores de condrogénesis en las 127TT-*hMSCs* mostró una tendencia a aumentar la expresión de *SOX9* con respecto al nivel basal ($1 \pm 4,58 \times 10^{-1}$) a los 3 ($1,06 \pm 4,27 \times 10^{-1}$) y 9 días ($1,33 \pm 3,93 \times 10^{-1}$) de cultivo en los agregados no estimulados; disminuyendo la expresión a los 14 ($2,95 \times 10^{-1} \pm 7,2 \times 10^{-2}$) y 21 días ($1,5 \times 10^{-1} \pm 7,84 \times 10^{-2}$). En los agregados estimulados condrogénicamente aumentó la expresión, con respecto a los 3 días de cultivo ($3,25 \times 10^{-1} \pm 5,42 \times 10^{-2}$), a los 9 ($6,06 \times 10^{-1} \pm 1,29 \times 10^{-1}$) y 14 días ($5,82 \times 10^{-1} \pm 2,94 \times 10^{-2}$); disminuyendo a los 21 días ($3 \times 10^{-1} \pm 9,49 \times 10^{-2}$). Todas las condiciones presentaron una mayor expresión génica de *SOX9* que los condrocitos ($4,76 \times 10^{-2} \pm 1,27 \times 10^{-2}$) (Figura 31, a).

Por otro lado, solo se detectó expresión génica de *COL2A1* en los agregados estimulados condrogénicamente a los 3 ($1,79 \times 10^{-1} \pm 2,54 \times 10^{-1}$), 14 ($4,75 \times 10^{-1} \pm 1,47 \times 10^{-1}$) y 21 días ($4,14 \times 10^{-1} \pm 5,85 \times 10^{-1}$) de cultivo, aunque no alcanzó la expresión detectada en los condrocitos ($2,14 \pm 1,75$) (Figura 31, a).

Asimismo, la expresión de *COL1A1* fue disminuyendo, con respecto al nivel basal ($1 \pm 4,24 \times 10^{-1}$) de expresión en las 127TT-*hMSCs* y los agregados no estimulados a 3 días ($1,48 \pm 7,36 \times 10^{-1}$), en los agregados no estimulados a 9 ($7,13 \times 10^{-1} \pm 3,29 \times 10^{-1}$), 14 ($2,44 \times 10^{-1} \pm 5,06 \times 10^{-2}$) y 21 días ($3,73 \times 10^{-1} \pm 2,66 \times 10^{-1}$). Cuando estimulados condrogénicamente la expresión de *COL1A1* se incrementó, llegando a su valor máximo a los 9 días ($4,41 \pm 1,2$) y disminuyendo a los 14 ($2,36 \pm 1,47$) y 21 días ($6,63 \times 10^{-1} \pm 7,34 \times 10^{-1}$). La expresión en los condrocitos ($6,92 \times 10^{-3} \pm 4,85 \times 10^{-3}$) fue menor que en el resto de las condiciones (Figura 31, b).

Finalmente, solo se observó expresión de *COL10A1* en las condiciones estimuladas a 9 ($6,65 \times 10^{-2} \pm 5,26 \times 10^{-2}$), 14 ($3,54 \times 10^{-2} \pm 3,45 \times 10^{-2}$) y 21 días ($4,37 \times 10^{-3} \pm 6,18 \times 10^{-3}$) y en los tres casos los valores fueron inferiores a la expresión detectada en los condrocitos ($1,98 \pm 2,6$) (Figura 31, c).

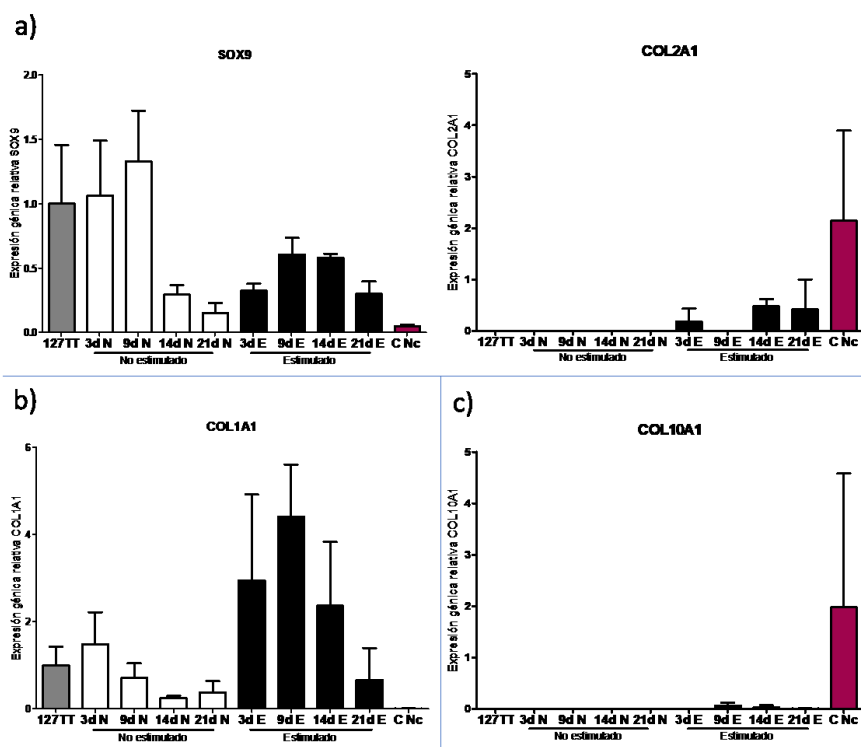


Figura 31. Expresión génica relativa en MSCs de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de (a) genes marcadores de la condrogénesis: *SOX9* y *COL2A1*; (b) gen marcador de la desdiferenciación: *COL1A1*; y (c) gen marcador de la hipertrofia: *COL10A1*. Datos representados como media con desviación estándar.

El estudio de las conexinas y panexinas durante la condrogénesis en las 127TT-*hMSCs* mostró que esta línea celular no expresaba *GJA5*, conexina asociada a las MSCs, y *GJB1*, conexinas asociada a los condrocitos.

Por otro lado, la expresión de *GJA1* aumento con respecto al nivel basal ($1 \pm 1,07$) cuando fueron cultivadas mediante la técnica de gota colgante tanto en no estimuladas como estimuladas. En el caso de los agregados no estimulados se observó un aumento significativo a los 3 días ($6,13 \pm 1,63$) y tendencia a disminuir a medida que pasaba el tiempo de cultivo (9 días: $2,53 \pm 5,78$; 14 días: $2 \pm 2,97$; y 21 días: $1,44 \pm 3,27$). Sin embargo, los agregados estimulados condrogénicamente mostraron una tendencia a aumentar la expresión llegando a los picos de expresión a los 9 ($4,02 \pm 2,84$) y 14 días ($3,66 \pm 3,1$) y disminuyendo a los 21 días ($4,9 \times 10^{-1} \pm 1,62$), llegando a valores similares a los observados en los condrocitos ($1,23 \times 10^{-1} \pm 1,47 \times 10^{-1}$) (Figura 32, a).

La expresión de *GJC1* se mantuvo relativamente estable, con respecto al nivel basal ($1 \pm 4,42 \times 10^{-1}$) expresado por las 127TT-*hMSCs*, a los 3 ($9,5 \times 10^{-1} \pm 3,77 \times 10^{-1}$) y 9 días ($9,44 \times 10^{-1} \pm 1,94 \times 10^{-1}$) en los agregados no estimulados; observándose una tendencia a disminuir la expresión a los 14 ($6,4 \times 10^{-1} \pm 2,72 \times 10^{-1}$) y 21 días ($4,21 \times 10^{-1} \pm 8,64 \times 10^{-2}$). En contraste, la expresión en los

agregados estimulados condrogénicamente se mantuvo a los 3 ($2,9 \times 10^{-1} \pm 5,26 \times 10^{-2}$), 9 ($3,65 \times 10^{-1} \pm 2,24 \times 10^{-2}$) y 14 días ($4,35 \times 10^{-1} \pm 7,84 \times 10^{-2}$) de cultivo, observándose un pico de expresión a los 21 días de cultivo ($1,66 \pm 5,64 \times 10^{-1}$). La expresión de *GJC1* en condrocitos ($8,26 \times 10^{-1} \pm 4,21 \times 10^{-1}$) se mantuvo similar a la observada a nivel basal (Figura 32, a).

La PANX3 presentó valores de expresión estables tanto en los agregados no estimulados (3 días: $6,17 \pm 3,69$; 9 días: $1,33 \pm 2,22$; 14 días: $5 \times 10^{-1} \pm 1,67$; y 21 días: $1,15 \pm 2,79$) como los estimulados (3 días: $8,09 \times 10^{-1} \pm 2,53$; 9 días: $6,42 \times 10^{-1} \pm 1,73$; y 14 días: $1,01 \pm 6,13 \times 10^{-1}$), similares a los observados a nivel basal ($1 \pm 2,94$). No observándose expresión a los 21 días cuando se estimuló condrogénicamente. La expresión génica de PANX3 fue inferior en todas las condiciones a la observada en los condrocitos ($9,71 \pm 2,04 \times 10^1$) (Figura 32, a).

Por último, la expresión de *GJA3*, principalmente detectada en condrocitos, se mostró disminuida en todas las condiciones con respecto a la observada a nivel basal ($1 \pm 1,31 \times 10^{-1}$) en la línea 127TT-*hMSCs*. En los agregados no estimulados se observó una disminución de la expresión, con respecto a los 3 días ($3,03 \times 10^{-1} \pm 4,43 \times 10^{-2}$), a los 9 días ($1,18 \times 10^{-1} \pm 6,01 \times 10^{-2}$), y una posterior tendencia a aumentar la expresión a los 14 ($1,52 \times 10^{-1} \pm 3,9 \times 10^{-2}$) y 21 días ($2,61 \times 10^{-1} \pm 3,94 \times 10^{-2}$). Por el contrario, en los agregados estimulados se observó un aumento de la expresión, con respecto a los 3 días ($1,83 \times 10^{-1} \pm 3,76 \times 10^{-2}$), a los 9 días ($4,21 \times 10^{-1} \pm 5,44 \times 10^{-2}$), y una posterior tendencia a disminuir la expresión a los 14 ($1,37 \times 10^{-1} \pm 2,8 \times 10^{-2}$) y 21 días ($5,24 \times 10^{-2} \pm 2,67 \times 10^{-2}$). La expresión en los cultivos mediante gota colgante tanto no estimulados como estimulados fue inferior a la observada en los condrocitos ($5,76 \times 10^{-1} \pm 2,72 \times 10^{-1}$) (Figura 32, b).

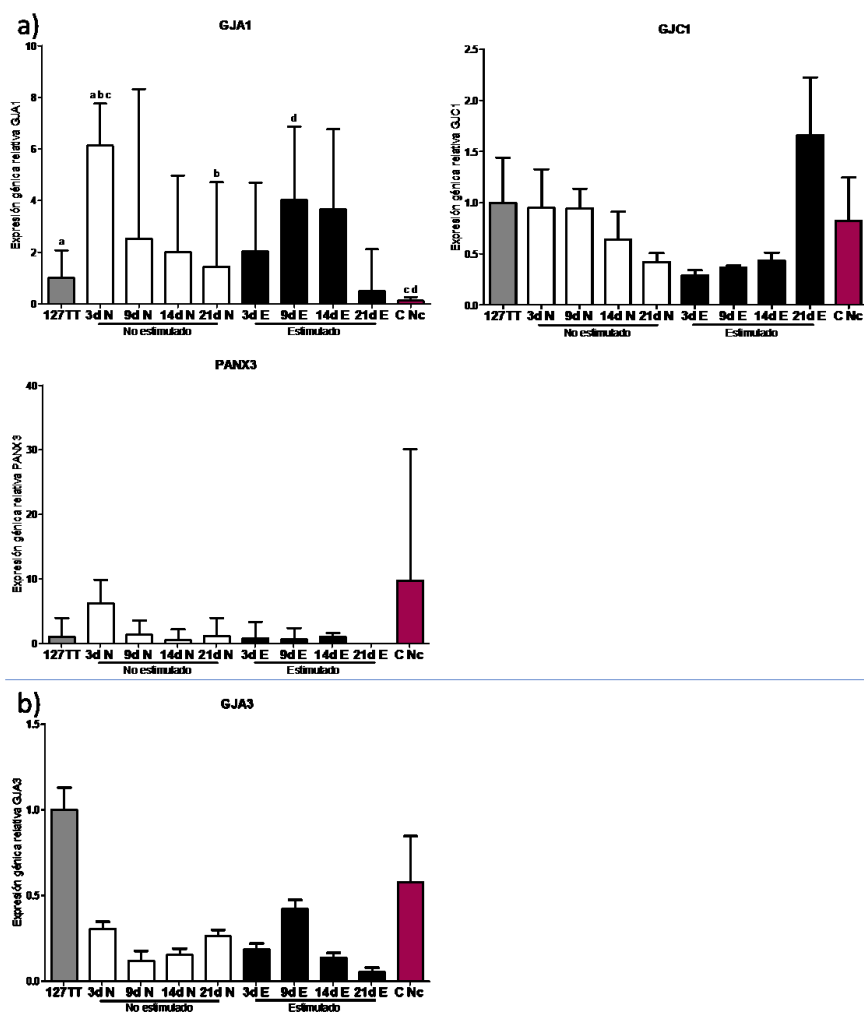


Figura 32. Expresión génica relativa en MSCs de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las conexinas y panexina expresadas por (a) MSCs y condrocitos: *GJA1*, *GJC1* y *PANX3*; y (b) condrocitos: *GJA3*. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d $p < 0,05$.

El estudio de la expresión de la subunidad alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD de la Fn mostró que la línea celular 127TT-*hMSCs* no expresaba ITGA8.

Por otro lado, la expresión de ITGA2B disminuyó, con respecto a nivel basal ($1 \pm 3,21 \times 10^{-1}$), a los 3 días ($4,92 \times 10^{-1} \pm 1,37 \times 10^{-1}$) de cultivo no estimulado en gota colgante. Se observó posteriormente un aumento de la expresión a los 9 días ($1,04 \pm 2,42 \times 10^{-1}$) y una disminución a los 14 ($8,3 \times 10^{-2} \pm 2,14 \times 10^{-2}$) y 21 días ($2,86 \times 10^{-1} \pm 8,9 \times 10^{-2}$). Sin embargo, en el cultivo estimulado condrogénicamente la expresión se mantuvo constante a los 3 ($1,83 \times 10^{-1} \pm 5,24 \times 10^{-2}$), 9 ($1,86 \times 10^{-1} \pm 4,04 \times 10^{-2}$) y 14 días ($2,19 \times 10^{-1} \pm 1,13 \times 10^{-2}$), aumentando significativamente a los 21 días ($4,11 \pm 1,07$). La expresión en los condrocitos ($7,01 \times 10^{-1} \pm 2,95 \times 10^{-1}$) fue similar a la observada a nivel basal (Figura 33).

La expresión de ITGA5 presentó una tendencia a disminuir en los agregados no estimulados, con respecto al nivel basal ($1 \pm 2,42 \times 10^{-1}$) y los 3 días ($1,41 \pm 6,55 \times 10^{-1}$), a los 9 ($8,24 \times 10^{-1} \pm 3,56 \times 10^{-1}$) y 14 días ($2,72 \times 10^{-1} \pm 1,55 \times 10^{-2}$); observándose un incremento posterior a los 21 días ($7,21 \times 10^{-1} \pm 3,17 \times 10^{-1}$). En cambio, en los agregados estimulados se observa un aumento de la expresión, con respecto a los 3 días ($4,67 \times 10^{-1} \pm 1,18 \times 10^{-1}$), a los 9 días ($2,08 \pm 8,92 \times 10^{-1}$); y una tendencia a disminuir la expresión a los 14 ($1,47 \pm 5,4 \times 10^{-1}$) y 21 días ($3,03 \times 10^{-1} \pm 9,96 \times 10^{-2}$). La expresión en los agregados de 127TT-*hMSCs* estimulados a 21 días es similar a la presentada por los condrocitos ($2,36 \times 10^{-1} \pm 6,5 \times 10^{-2}$) (Figura 33).

Finalmente, la expresión de ITGAV siguió un patrón similar al observado en el caso de ITGA5. En los agregados no estimulados se observó una tendencia a disminuir la expresión (3 días: $1,85 \pm 3,92 \times 10^{-1}$; 9 días: $1,09 \pm 6,68 \times 10^{-1}$; 14 días: $5,51 \times 10^{-1} \pm 4,82 \times 10^{-1}$; y 21 días: $4,84 \times 10^{-1} \pm 4,28 \times 10^{-1}$). Mientras que en los agregados estimulados se observó un incremento de la expresión, con respecto a los 3 días ($1,34 \pm 1,35 \times 10^{-1}$), a los 9 días ($3,18 \pm 1,48$); y una tendencia a disminuir la expresión de ITGAV a los 14 ($1,8 \pm 8,34 \times 10^{-1}$) y 21 días ($1,2 \pm 6,9 \times 10^{-1}$). Sin embargo, en este caso la expresión a los 21 días no alcanzó la observada en los condrocitos ($3,49 \times 10^{-1} \pm 4,37 \times 10^{-1}$) (Figura 33).

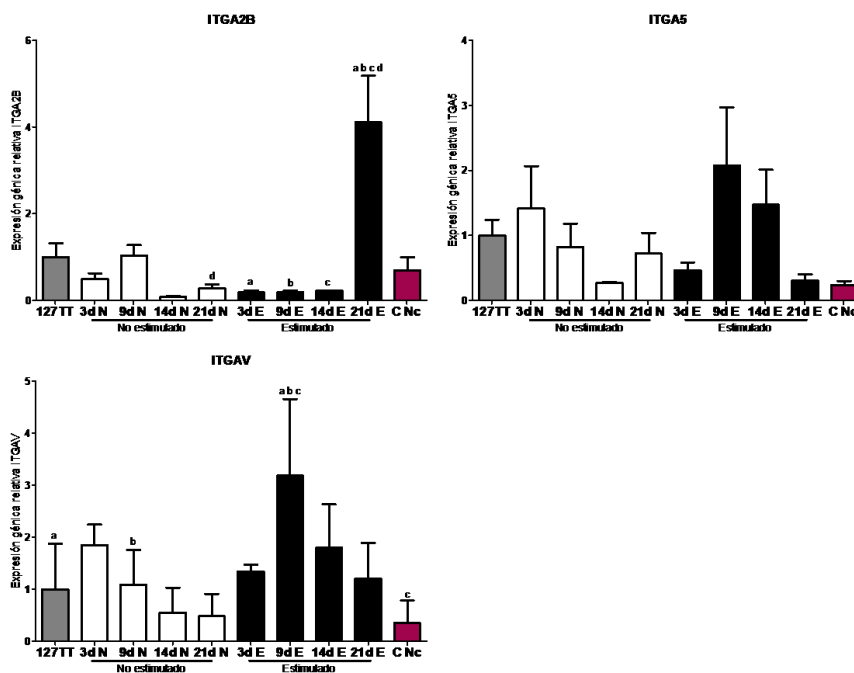


Figura 33. Expresión génica relativa en *MSCs* de la línea celular 127TT-*hMSCs* a nivel basal (127TT, barra gris) y en cultivo en gota colgante a 3 (3d), 9 (9d), 14 (14d) y 21 días (21d) no estimuladas (N, barras blancas) y estimuladas condrogénicamente (E, barras negras) y en condrocitos no OA (C Nc, barra roja) de las subunidades alfa de las integrinas reconocedoras de la secuencia RGD: ITGA2B, ITGA5 e ITGAV. Datos representados como media con desviación estándar. a, b, c, d $p < 0,05$.

2.2.2.2 Análisis histológico de los agregados de 127TT-*hMSCs* formados mediante gota colgante

El estudio histológico realizado de las 127TT-*hMSCs* en agregados celulares formados por la técnica de gota colgante a 3, 9, 14 y 21 días se realizó mediante las tinciones de hematoxilina-eosina, safranina-o, tricrómico de Masson, para evidenciar la presencia de colágenos, y rojo alizarina y von Kossa, para depósitos de calcio extracelulares e intracelulares respectivamente.

La tinción con hematoxilina-eosina nos permite, como se mencionó anteriormente, realizar un estudio de la morfología y disposición de las células, observándose el núcleo celular en tonos de color azul y púrpura y el citoplasma en tonos de color rosa. De este modo, observamos que los agregados formados con medio de estimulación condrogénica presentaron un aspecto menos disgregado en comparación con los formados con medio de mantenimiento (no estimulado). Mientras que en los agregados no estimulados y los estimulados a 3 días no presentaron diferencias en la organización celular, los estimulados a 9, 14 y 21 días presentaron dos zonas de diferente organización celular, una zona más externa con una organización de las células paralela a la superficie del agregado, con un aspecto celular más fibroblástico, y una zona central sin organización celular con células de aspecto más redondeado (Figura 34, a).

Al medir el área de los agregados encontramos que no hay diferencias significativas entre el área de los no estimulados y los estimulados. Sin embargo, se pudo observar que en el caso de los agregados no estimulados hubo un aumento del área a los 9 días ($1,78 \times 10^1 \pm 1,23 \times 10^1$ %) con respecto a los 3 días ($7,13 \pm 4,46$ %), una bajada significativa del tamaño a los 14 días ($6,07 \pm 2,74$ %) y un aumento significativo a los 21 días ($1,31 \times 10^1 \pm 2,63$ %) con respecto al anterior punto. En el caso de los estimulados se observó un mantenimiento del tamaño a los 3 ($1,09 \times 10^1 \pm 2,21$ %) y 9 días ($1,04 \times 10^1 \pm 4,03$ %), una disminución a los 14 días ($6,31 \pm 2,71$ %) y un aumento a los 21 días ($1,78 \times 10^1 \pm 9,65$ %) al igual que en los estimulados, aunque en este caso no fueron variaciones significativas (Figura 34, b).

El estudio de la circularidad de los agregados no mostró apenas variación entre las diferentes condiciones, no habiendo diferencias significativas entre los valores no estimulados y estimulados, ni entre los diferentes tiempos en el caso de los no estimulados (3 días $4,9 \times 10^{-1} \pm 1,6 \times 10^{-1}$; 9 días $5,3 \times 10^{-1} \pm 2,7 \times 10^{-1}$; 14 días $5,9 \times 10^{-1} \pm 1,8 \times 10^{-1}$ y 21 días $4,5 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-2}$). Sin embargo, sí que se observó una disminución significativa de la circularidad entre los días 9 ($6,1 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-1}$) y 21 ($3,6 \times 10^{-1} \pm 1,5 \times 10^{-1}$) en el caso de los agregados estimulados (Figura 34, b).

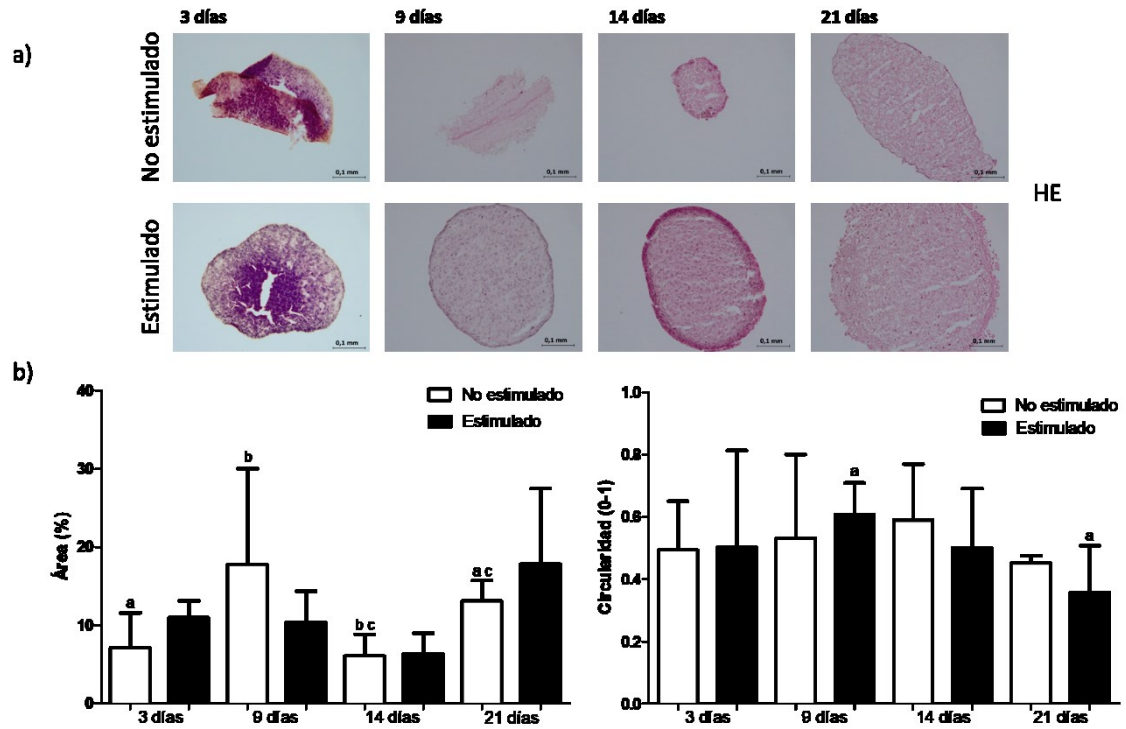


Figura 34. (a) Tinción de hematoxilina (HE) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm. (b) Gráficas del área (%) y circularidad (0-1) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas (barra blanca) y estimuladas (barra negra). a, b, c $p < 0,05$.

La tinción de la safranina-o permite evidenciar la presencia de glucosaminoglicanos observándose un viraje hacia el naranja en caso afirmativo. En el caso de los agregados de las 127TT-*hMSCs* esta tinción no evidenció presencia de glucosaminoglicanos tanto en los cultivos estimulados como en los no estimulados (Figura 35).

La tinción de tricrómico de Masson permite observar la presencia de colágenos, tiñéndose estos de azul, mientras que el núcleo celular se tiñe de lila y el citoplasma de tonos rojizos. Las tinciones de los agregados de 127TT-*hMSCs* no estimulados a 3, 9 y 14 días y los estimulados a 9 días no evidencian presencia de colágenos. Los agregados estimulados a 3, 14 y 21 días mostraron tonalidades azuladas, también se pueden observar en el caso de los no estimulados a 21 días (Figura 35).

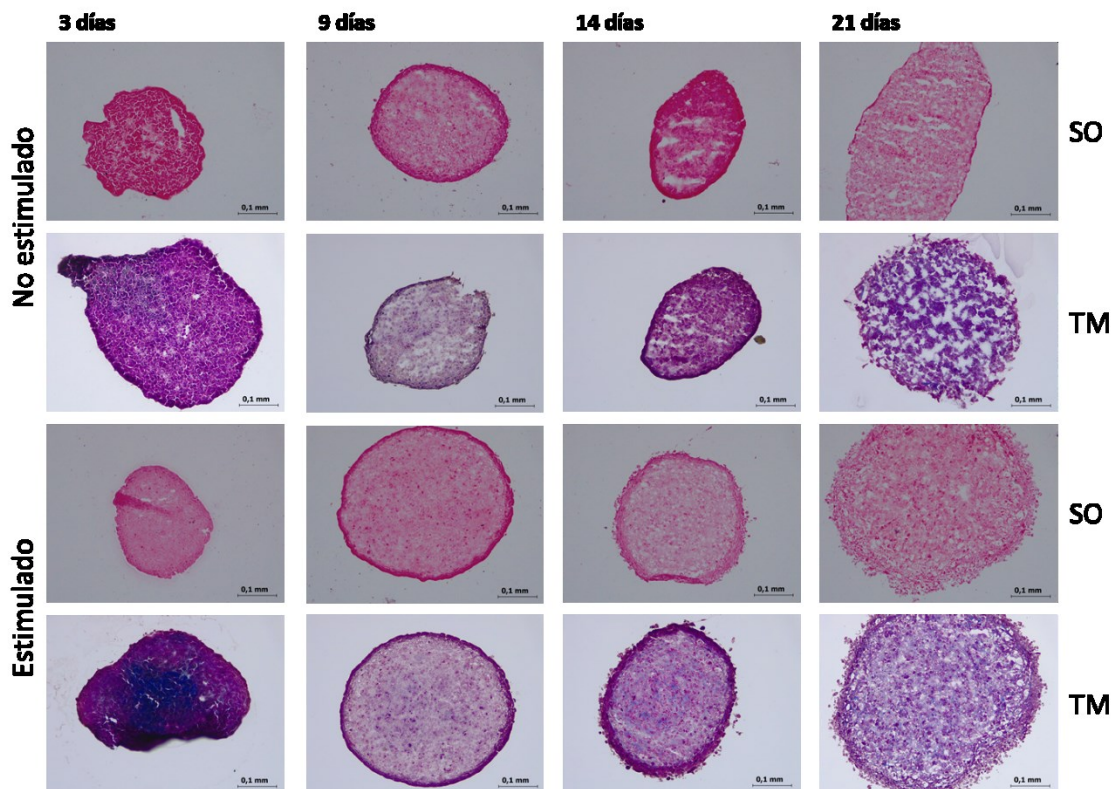


Figura 35. Tinciones de safranina-o (SO) y tricrómico de Masson (TM) de los agregados celulares de 127TT-hMSCs a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.

El análisis de las muestras mediante la tinción de rojo alizarina permite observar calcificaciones, depósitos cálcicos extracelulares, teñidos de un rojo intenso. No se observan evidencias de presencia de depósitos cálcicos en los agregados no estimulados a 3 y 9 días y en los estimulados durante todos los tiempos de estudio. Sí se observan evidencias de dicha tinción en los agregados no estimulados formados a los 14 y 21 días (Figura 36).

A su vez, la tinción de von Kossa permite detectar depósitos cálcicos intracelulares teñidos de negro. Tampoco se observan evidencias de presencia de depósitos cálcicos con esta tinción en los agregados no estimulados a 3 y 9 días y en los estimulados durante todos los tiempos de estudio. Sí se volvió a observar marcaje en los agregados no estimulados formados a los 14 y 21 días (Figura 36).

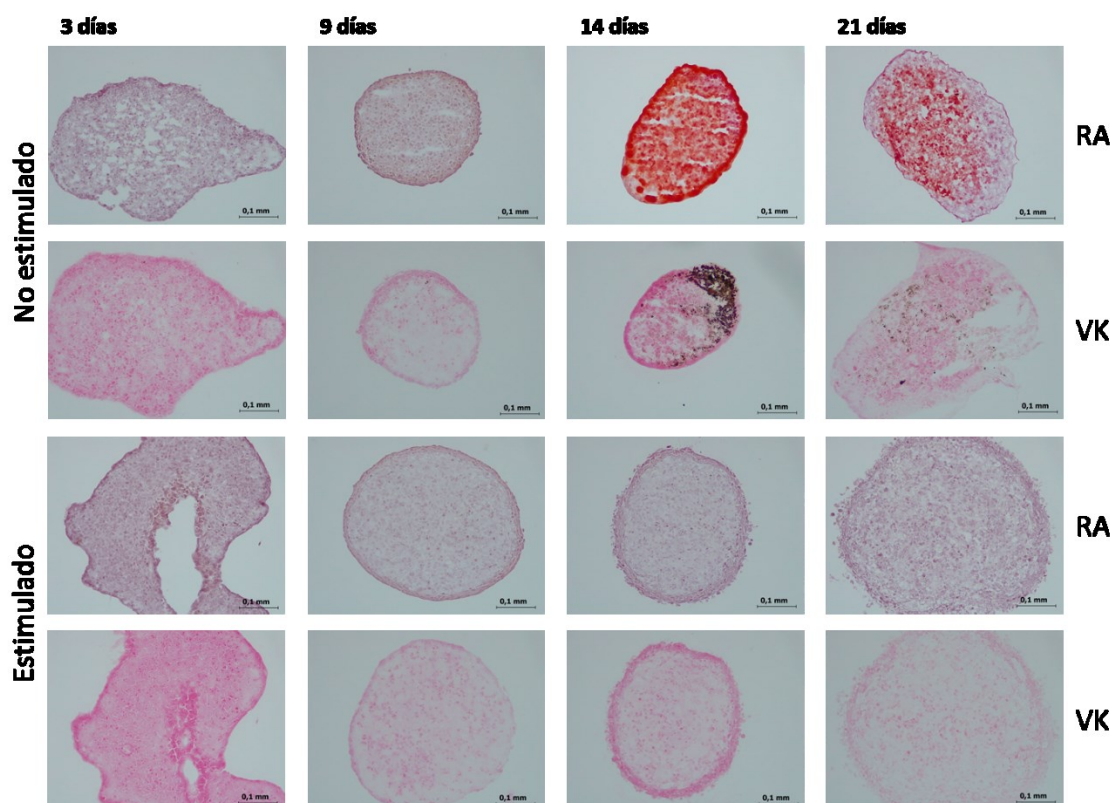


Figura 36. Tinciones de rojo alizarina (RA) y von Kossa (VK) de los agregados celulares de 127TT-*hMSCs* a 3, 9, 14 y 21 días, no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.

3 Evaluación del potencial condrogénico de andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1

Las membranas de *PLLA* son un andamio 2D y, por tanto, es un sistema limitado que no proporciona una estructura 3D como la que encontraríamos en el cuerpo humano. Por ello, se decidió evaluar el potencial condrogénico de andamios 3D de PCL funcionalizados con diferentes nanopatrones de dendrímeros de RGD-Cys-D1. Las condiciones de estudio fueron: andamios de PCL funcionalizadas con Fn (FN-PCL) como control positivo, con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} %p/p) dando lugar a los diferentes nanopatrones de superficie y sin funcionalizar (PCL) como control negativo.

Dado el gran número de células necesario para realizar este estudio se optó por usar las células de la línea celular 127TT-*hMSCs* al haber sido con las que mejores resultados se habían obtenido anteriormente. Por otro lado, se decidió prolongar el periodo de estudio hasta los 21 días con el fin de que las células pudieran producir *ECM* y diferenciarse condrogénicamente en los andamios.

Dentro de este estudio se analizaron las características fisicoquímicas de los andamios de PCL, mediante el estudio del diseño del poro de dichos andamios; y sus características biológicas,

mediante el estudio de la viabilidad y diferenciación condrogénica de las 127TT-*hMSCs* sembradas en dichos andamios.

Con el fin de realizar la caracterización biológica de los andamios de PCL se realizó un estudio de la viabilidad celular en los andamios de PCL sin funcionalizar empleando la línea celular 127TT-*hMSCs*. Por otro lado, para realizar el estudio de la diferenciación condrogénica de las 127TT-*hMSCs* sembradas en estos materiales a 21 días se analizó la expresión génica de el gen marcador de condrogénesis: *SOX9*; y los genes de adhesión celular: *GJA1*, *GJAC1* e *ITGA5*; seleccionándose únicamente estos cuatro genes para el estudio dada la limitación en la cantidad de ARN extraída de las muestras. Además, se complementaron los resultados realizando tinciones histológicas para analizar la *ECM* formada por 127TT-*hMSCs* y analizando la distribución de las células en los andamios mediante *FESEM*.

3.1 Caracterización fisicoquímica de los andamios de PCL

3.1.1 Diseño del poro de los andamios de PCL

El diseño del poro de los andamios de PCL se realizó con forma triangular y lados de 1mm (Figura 37, a); mediante la medición del tamaño de poro se pudo observar que dicho tamaño era consistente a lo largo de diferentes andamios (PCL1 $1,03 \times 10^3 \pm 1,83 \times 10^2 \mu\text{m}$; PCL2 $1,05 \times 10^3 \pm 2,22 \times 10^2 \mu\text{m}$ y PCL3 $1,05 \times 10^3 \pm 2,46 \times 10^2 \mu\text{m}$) y diferentes poros de cada andamio. No se encontraron diferencias significativas entre los tamaños de poros en los andamios estudiados. Los poros de los andamios no divergieron significativamente de la medida de 1 mm (Figura 37, b).

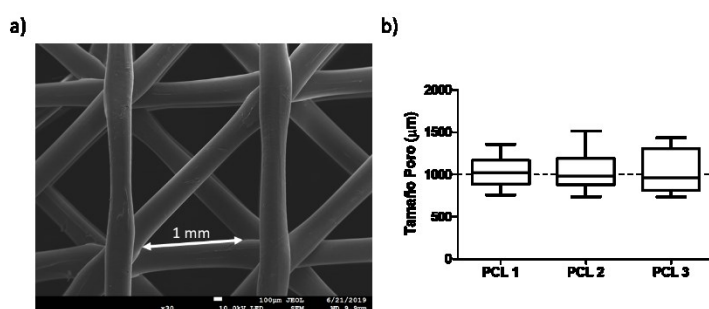


Figura 37. (a) Imagen *FESEM* del poro de los andamios de PCL con flecha blanca indicando tamaño de poro correspondiente a 1 mm. (b) Gráfica de la media del tamaño de poro (μm) de tres andamios de PCL diferentes.

3.2 Caracterización biológica de los andamios de PCL

3.2.1 Viabilidad celular de las 127TT-*hMSCs* en los andamios de PCL

Mediante la medida de Alamar blue se pudo comprobar que las células 127TT-*hMSCs* en los andamios de PCL no presentaban muerte celular a lo largo del período de estudio y su actividad celular aumentó progresivamente de forma significativa (3 días $2,12 \times 10^1 \pm 1,27 \%$; 7 días

$2,24 \times 10^1 \pm 2,12 \%$; 9 días $2,62 \times 10^1 \pm 1,40 \%$; 14 días $3,06 \times 10^1 \pm 2,85 \%$ y 21 días $4,65 \times 10^1 \pm 5,73 \%$) cuando se incubaban con medio de mantenimiento (Figura 38).

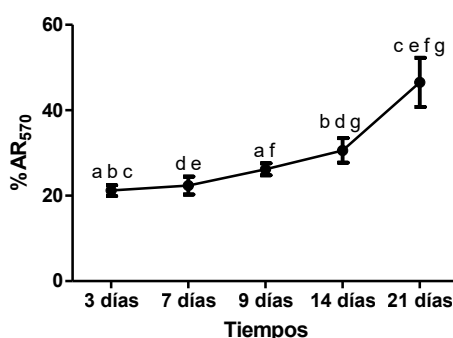


Figura 38. Gráfica de los datos obtenidos mediante la técnica de alamar blue, medidas tomadas a lo largo del tiempo de 127TT-*hMSCs* sembradas en andamios de PCL no estimuladas. a, b, c, d, e, f, g $p < 0,05$.

3.2.2 Diferenciación condrogénica de las 127TT-*hMSCs* en los andamios de PCL

Se realizó un estudio de la diferenciación condrogénica en los andamios de PCL funcionalizados con las diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1, esto es, 10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9} % p/p, con Fn o sin funcionalizar. Para realizar dicho estudio se realizaron análisis de expresión génica, tinciones histológicas e imágenes con FESEM.

3.2.2.1 Expresión génica de las 127TT-*hMSCs* en los andamios de PCL

A causa de imprevistos sucedidos durante la realización de estos experimentos, los resultados mostrados corresponden a la expresión génica de las 127TT-*hMSCs* sembradas en los andamios de PCL en las diferentes condiciones en una única réplica del experimento.

En las 127TT-*hMSCs* sembradas en los andamios de PCL se estudió la expresión de *GJA1*, *GJC1*, *ITGA5* y *SOX9*. Los resultados mostraron la ausencia de *GJA1* y una expresión poco consistente del resto de genes a lo largo de las diferentes condiciones.

La expresión de *GJC1* se detectó en las condiciones de Fn-PCL (6,18), PCL 10^{-2} %p/p ($5,92 \times 10^1$), PCL 4×10^{-9} %p/p ($1,04 \times 10^1$) y PCL sin funcionalizar ($1,7 \times 10^1$) en el caso de las no estimuladas; y en PCL 10^{-8} %p/p ($2,91 \times 10^2$) y PCL 4×10^{-9} %p/p ($1,2 \times 10^2$) en el caso de las estimuladas (Figura 39, a).

Por otro lado, la expresión de *ITGA5* se observó en el caso de las no estimuladas en el Fn-PCL ($2,1 \times 10^1$), PCL 10^{-8} %p/p (2×10^2) y PCL sin funcionalizar (9×10^2). En las estimuladas se detectó en Fn-PCL (5,21), PCL $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p (5,55) y 10^{-8} %p/p (6,92) (Figura 39, b).

Por último, la expresión de *SOX9* solo se detectó en las no estimuladas en las condiciones de PCL $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p ($3,58 \times 10^1$), PCL 10^{-8} %p/p (1,07) y PCL sin funcionalizar (3,82) (Figura 39, c).

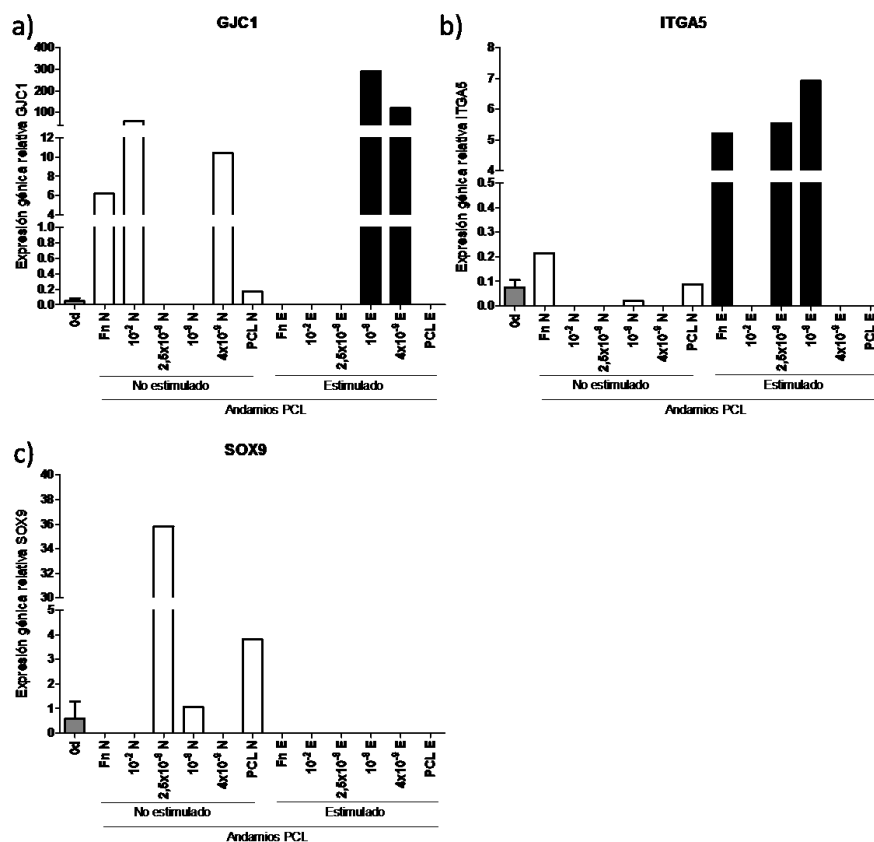


Figura 39. Expresión génica relativa de (a) *GJC1*; (b) *ITGA5*; y (c) *SOX9* (gen de referencia empleado 18S) en 127TT-hMSCs sembradas a nivel basal (0d, barra gris) y sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (Fn), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas (N, barra blanca) y estimuladas (E, barra negra).

3.2.2.2 Análisis histológico de las 127TT-hMSCs en los andamios de PCL

El análisis histológico de los andamios de PCL permitió observar que las células 127TT-hMSCs, que presentaban una morfología circular, tendían a crecer y prosperar en las esquinas que formaban las fibras de los andamios. La tinción de hematoxilina-eosina nos permite analizar la morfología y localización de las células, al teñir el núcleo de color azul o púrpura y el citoplasma de rosa. De este modo, se observó una distribución de las células dispersa y rodeando las fibras de PCL.

Para estudiar la presencia de glucosaminoglicanos se intentó emplear la tinción de safranina-O, sin embargo, al tener los reactivos de dicha tinción una base alcohólica muy elevada, los cortes de los andamios de PCL se perdían al ser sumergidas en dichos reactivos. Por ello se optó por emplear la tinción de azul alcian-PAS. La tinción de azul alcian-PAS tiñe los glúcidos de rosa intenso a fucsia y los mucopolisacáridos ácidos de azul, lo que conlleva que los

glucosaminoglicanos queden teñidos de azul. Esta tinción nos mostró tonalidades azuladas en las zonas donde las células formaban *ECM*, viéndose marcaje azulado en las condiciones FN-PCL, PCL 10^{-2} %p/p y PCL $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p, tanto no estimuladas como estimuladas, y no tan intensamente en PCL 10^{-8} %p/p y PCL sin funcionalizar, tanto no estimuladas como estimuladas (Figura 40).

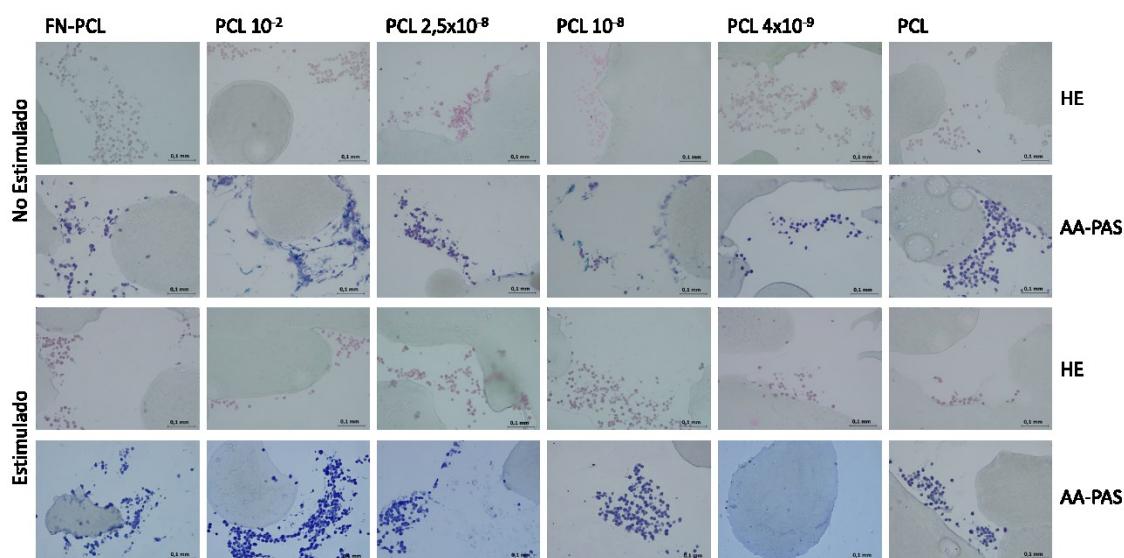


Figura 40. Tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y azul alcian (AA-PAS) de las células 127TT-*hMSCs* sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.

También se estudió la presencia de colágenos en la *ECM* formada mediante la tinción de tricrómico de Masson. La tinción de tricrómico de Masson permite observar la presencia de colágenos, tiñéndose estos de azul, mientras que el núcleo celular se tiñe de lila y el citoplasma de tonos rojizos. Con esta técnica se pudo observar una cierta tonalidad azulada en las zonas donde las células se acumulaban, indicando presencia de colágenos en dichas zonas. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias entre no estimulado y estimulado (Figura 41).

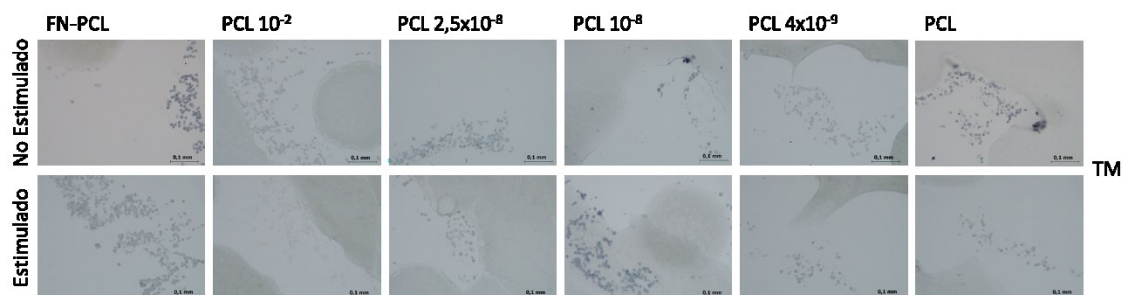


Figura 41. Tinción de tricrómico de Masson (TM) de las células 127TT-*hMSCs* sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.

Por último, se estudió la presencia de depósitos cálcicos mediante las tinciones de rojo alizarina, en la que los depósitos cálcicos se tiñen de rojo intenso, y de von Kossa, tinción en la que los depósitos cálcicos se tiñen de negro. Ninguna de las técnicas empleadas evidenció presencia de depósitos cálcicos (Figura 42).

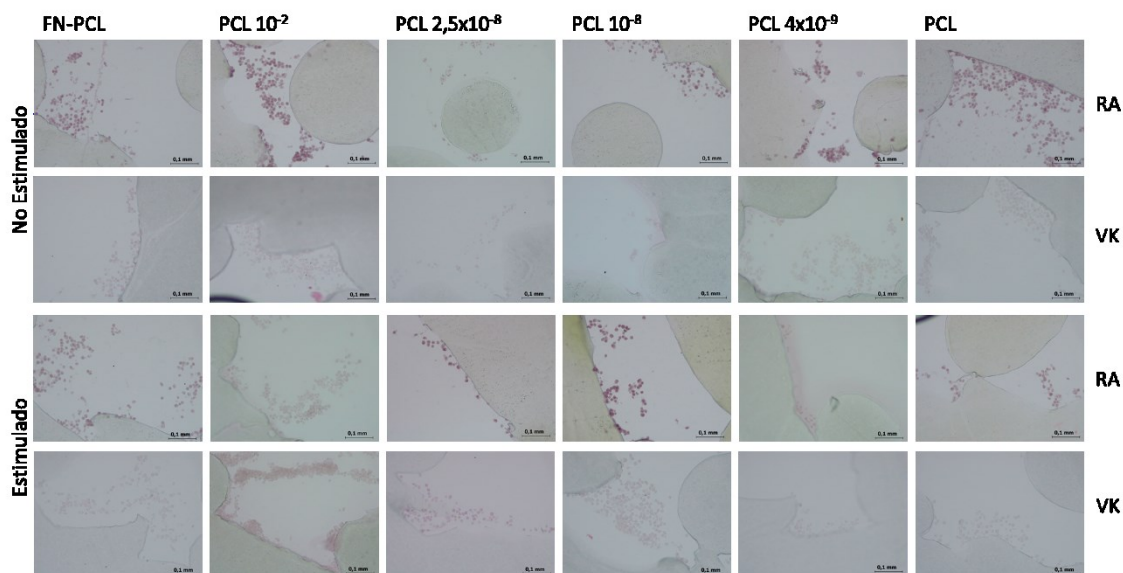


Figura 42. Tinciones de rojo alizarina (RA) y von Kossa (VK) de las células 127TT-*hMSCs* sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala de 0,1 mm.

3.2.2.3 Estudio de la morfología celular en los andamios de PCL mediante *FESEM*

Las imágenes de los andamios de PCL estimulados presentaron una densidad celular inferior a los andamios no estimulados. En los andamios no estimulados se pudieron observar agrupaciones de células 127TT-*hMSCs* de morfología redondeada localizadas principalmente en las intersecciones de fibras, es decir, las esquinas de los poros. En los andamios estimulados se observó esta tendencia también, pero no tan claramente dado el inferior número de células.

Tanto en los andamios no estimulados como estimulados, la condición donde pareció observarse una mayor presencia celular fue Fn-PCL. En el caso de los no estimulados podría haber una tendencia a que disminuyera el número de células a medida que disminuía la concentración de RGD-Cys-D1, siendo la condición que presentaba peor resultado PCL sin funcionalizar. En los andamios estimulados no se pudo observar una tendencia clara de ningún tipo (Figura 43).

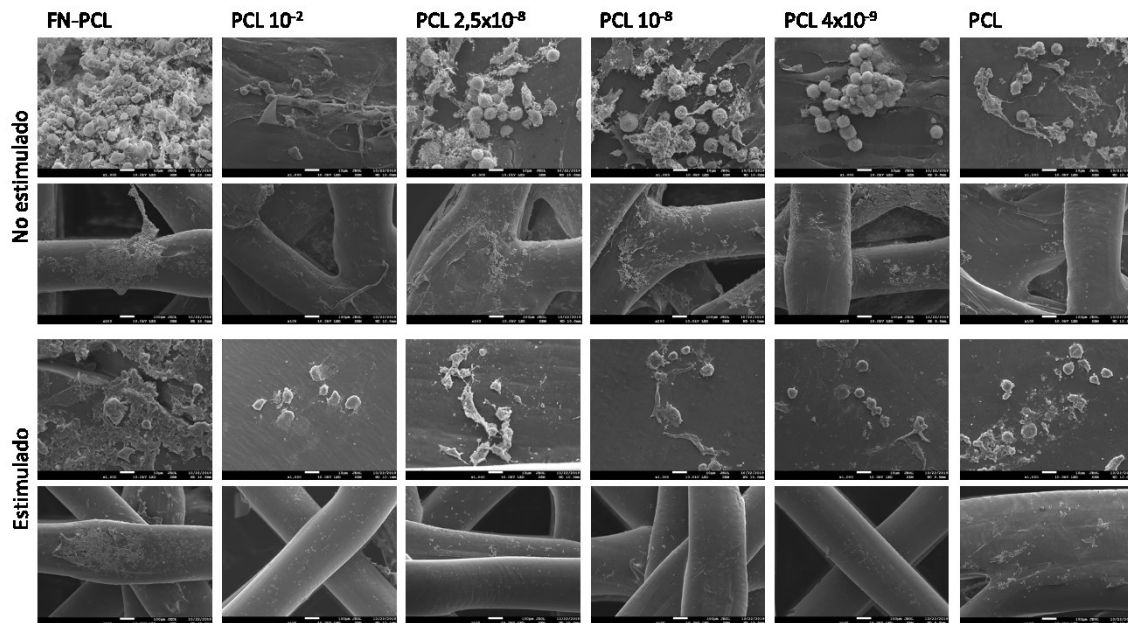


Figura 43. Imágenes de FESEM a 1000 aumentos (línea superior) y 100 aumentos (línea inferior) de las células 127TT-*hMSCs* sembradas sobre los andamios de PCL funcionalizados con Fn (FN-PCL), con diferentes concentraciones de RGD-Cys-D1 (10^{-2} ; $2,5 \times 10^{-8}$; 10^{-8} y 4×10^{-9}) y sin funcionalizar (PCL) a 21 días no estimuladas y estimuladas. Barra de escala en fotos a 100 aumentos de $100 \mu\text{m}$ y barra de escala en fotos de 1000 aumentos de $10 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

1 Evaluar el potencial condrogénico de membranas de ácido poli-L-láctico transportadoras con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1

Existe una necesidad de buscar nuevos métodos que ayuden a la regeneración del cartílago. El uso de membranas transportadoras permitiría, tal y como indica el nombre, transportar las células, ya en vías de formar cartílago, a la zona de la lesión (Yamato y Okano, 2004; Elloumi-Hannachi, Yamato y Okano, 2010). En estudios previos se observó un potencial prometedor en el uso de los dendrímeros asociados a RGD para guiar las células. Observándose además que diferentes concentraciones del dendrímero daría diferentes patrones en la superficie del material (Lagunas *et al.*, 2014) y diferentes patrones en materiales originan diferentes respuestas celulares (Engel *et al.*, 2008; Wang, Ye, *et al.*, 2013). Por otro lado, el PLLA es un material polimérico ampliamente usado en la ingeniería tisular en la fabricación de andamios (Ushida *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010).

En este caso, para evaluar el potencial condrogénico de diferentes nanopatrones de RGD-Cys-D1 en membranas de PLLA se usaron células MSCs de pacientes no OA y OA, dada su disponibilidad en el momento.

Los resultados muestran que las MSCs respondieron de diferente modo dependiendo de la densidad de RGD-cys-D1 en la superficie de la membrana, observándose que, en concentraciones de $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p formaban agregados de mayor tamaño que en las demás condiciones. Por otro lado, se destaca que los agregados formados por las células provenientes de pacientes OA son de mayor tamaño y densidad que los de no OA; y, a su vez, por inmunofluorescencia se detecta en ellos una tendencia a presentar mayor COL2 y GJA1.

Estudios previos indicaron que la concentración de RGD-Cys-D1 influenciaba la madurez de las adhesiones focales en las MSCs (Lagunas *et al.*, 2017). Por otro lado, también se ha descrito una relación entre el estado de desdiferenciación celular y una mayor rigidez de la membrana celular asociada a un aumento de la actina y las adhesiones focales (Sliogeryte *et al.*, 2016). Está descrito que las MSCs OA presentan un estado de mayor desdiferenciación que las no OA. De este modo, se explicaría mayor capacidad de responder a estímulos de migración celular por parte de estas células (Charlier *et al.*, 2019); lo que podría explicar que las MSCs OA respondieran de un modo muy temprano a estos materiales obteniéndose agregados más compactos y de mayor tamaño que en el caso de las células provenientes de pacientes no OA.

Asimismo, el estudio de la expresión génica mostró una diferente respuesta de las MSCs dependiendo si procedían de pacientes OA o no OA. Las MSCs no OA no expresaron COL2 en ninguna de las condiciones y presentaron una tendencia a expresar más SOX9 a medida que

disminuía la concentración de RGD-Cys-D1. Por otro lado, presentaron valores un poco más elevados de COL1, TNC y GJA1 en la concentración de $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p RGD-Cys-D1, lo que podría estar indicándonos un cierto grado de hipertrofia y desdiferenciación en dicho punto. Sin embargo, no hay diferencias significativas en ningún punto por lo que lo que se observan son tendencias que deberían confirmarse aumentando el número de experimentos.

Por otro lado, las MSCs de pacientes OA expresa COL2, con una tendencia creciente a medida que disminuye la concentración de RGD-Cys-D1. También expresa SOX9, presentando sus valores más bajos en las concentraciones de $2,5 \times 10^{-8}$ y 10^{-8} %p/p RGD-cys-D1. Pese a que esto favorece la idea de que estas membranas están ayudando en la diferenciación condrogénica, no explica porque los valores de SOX9 son más bajos cuando los agregados son de mayor tamaño. Podría ser una respuesta temprana de las células OA al estímulo, favorecidas por su número de receptores, de tal modo que son células ya diferenciadas y por ello se observa una disminución de la expresión (Lefebvre y Dvir-Ginzberg, 2017). Sin embargo, este experimento se realizó con un tiempo de 3 días, lo que es demasiado temprano para que la condrogénesis se haya dado, produciéndose normalmente hacia los 9 o 14 días (Dexheimer, Frank y Richter, 2012). Sería necesario realizar más experimentos a diferentes tiempos para poder concluir fielmente que es posible estimular una condrogénesis de un modo tan temprano.

De igual modo, las MSCs OA expresan COL1 de un modo constante en las diferentes concentraciones de dendrímeros, lo que estaría indicando un cierto grado de desdiferenciación. La TNC disminuye, aunque no significativamente, en las concentraciones de $2,5 \times 10^{-8}$ y 10^{-8} %p/p y GJA1 en $2,5 \times 10^{-8}$ %p/p. Teniendo en cuenta que ambas son marcadores de no diferenciación, estos valores están a favor de la teoría anteriormente planteada, es decir, que se ha producido una condrogénesis temprana, sin embargo, son tendencias no significantes.

Este es un estudio preliminar en andamios 2D sobre la influencia de diferentes patrones de dendrímeros sobre las MSCs tanto OA como no OA. Podemos concluir que, las MSCs responden de un modo temprano a los materiales con dendrímeros y que, dependiendo de si son OA o no OA, presentan una respuesta diferente posiblemente a causa de un diferente perfil de expresión de receptores. Además, observamos que posiblemente la funcionalización con dendrímeros RGD-Cys-D1 tenga un papel positivo en la diferenciación condrogénica de las MSCs, siendo principalmente relevante en el caso de las células provenientes de pacientes OA.

Para poder comprender en mayor profundidad la respuesta observada se decidió evaluar la expresión de integrinas reconocedoras de la secuencia de RGD y proteínas conformadoras de las uniones comunicantes, implicadas en el reconocimiento célula-célula y célula-matriz, en las

MSCs. Por otro lado, también se consideró necesario el estudio de la expresión de dichos genes durante la condrogénesis.

Asimismo, ante la intención de continuar el estudio en andamios 3D se optó por valorar dos líneas celulares de *MSCs*, 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs*, ante la imposibilidad de obtener suficientes células para llevar a cabo los experimentos con células primarias.

2 Evaluación del rol de las uniones comunicantes y adhesiones focales en la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales humanas

La condrogénesis es el proceso por el cual se forma el cartílago, se caracteriza por la diferenciación de las *MSCs* a condrocitos y la producción de la *ECM* del cartílago. Durante este proceso hay un gran número de genes y proteínas implicados, con el fin de guiar las células correctamente (Goldring, Tsuchimochi y Ijiri, 2006; Green *et al.*, 2015). *SOX9* es un gen fundamental durante el desarrollo y la maduración del cartílago articular. Su expresión se mantiene durante toda la vida en los condrocitos del cartílago articular sano, sin embargo, disminuye en los condrocitos hipertróficos (Li y Dong, 2016). Está implicado en la condensación precartilaginosa, en los primeros pasos de diferenciación de los condrocitos y la deposición de *ECM* cartilaginosa compuesta de COL2, entre otras proteínas (Hardingham, Oldershaw y Tew, 2006; Lefebvre, Angelozzi y Haseeb, 2019). La incorrecta regulación de la condrogénesis da lugar a la hipertrofia de los condrocitos, caracterizada por la producción de COL10 (Dreier, 2010; Chen, Fu, Cong, H. Wu, *et al.*, 2015), y la desdiferenciación de los condrocitos y producción de un cartílago fibroso, cuya *ECM* contiene COL1 (Sliogeryte *et al.*, 2016).

Por otro lado, la comunicación entre las células y las células con la *ECM* es fundamental a la hora de la condensación de las *MSCs* y la organización posterior en un cartílago funcional (Kang, 2008). En esta labor intervienen las uniones comunicantes compuestas por las conexinas (Iwamoto *et al.*, 2013) y las uniones focales en las que participan las integrinas (Song y Park, 2014).

2.1 Perfil de expresión de las *MSCs*

Lo primero que se estudió fue el perfil de expresión en las *MSCs* de los genes marcadores de diferenciación condrogénica *SOX9* y COL2; y de los genes marcadores de hipertrofia y desdiferenciación COL10 y COL1.

Las *MSCs* no OA expresan más *SOX9* que las OA, aunque la diferencia no es significativa, esto podría estar asociado a la hipertrofia de las células provenientes de pacientes artrósicos (Hardingham *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2019). Por otro lado, las células de la línea celular 3a6-

hMSCs expresan más *SOX9* que las *MSCs* de pacientes no *OA*. Esto podría estar asociado a una predisposición a la condrogénesis por parte de las células (Green *et al.*, 2015); sin embargo, no hay diferencias significativas. En el otro extremo, la línea 127TT-*hMSCs* presenta una menor expresión de *SOX9*. Asimismo, mientras que las *MSCs* tanto no *OA* como *OA* y las células de la línea celular 127TT-*hMSCs*, no expresan *COL2*, las 3a6-*hMSCs* sí que presentan expresión de esta proteína de *ECM*. Esto, junto a los resultados de la expresión de *SOX9*, podría estar indicando que estas células están más cerca de condrocitos que de *MSCs* (Luo *et al.*, 2017).

Al estudiar el *COL1* y el *COL10*, marcadores de desdiferenciación e hipertrofia respectivamente, se observa una mayor expresión en las *MSCs* no *OA* en ambos casos, aunque la diferencia no es significativa. Sin embargo, lo esperado habría sido obtener resultados inversos, es decir, una mayor expresión de ambos genes por las *MSCs* *OA*. Esto podría estar dado por la avanzada edad de los pacientes de los que se obtuvieron las células. Diversos autores han encontrado que no hay diferencias significativas en la expresión de los marcadores de superficie y la capacidad de diferenciación condrogénica entre *MSCs* provenientes de médula ósea de pacientes de edad avanzada y *OA* (García-Álvarez *et al.*, 2011; Brady, Dickinson y Hollander, 2015), esto explicaría las similitudes en el perfil de expresión entre *MSCs* de pacientes no *OA* y *OA* que se ha observado.

Por otro lado, el estudio de ambos genes en las líneas celulares muestra que las 3a6-*hMSCs*, contrario a lo anteriormente observado, presenta mayor expresión de *COL1*, lo que indicaría que presenta un mayor grado de desdiferenciación. Mientras que las 127TT-*hMSCs* apenas expresan *COL1*. En el caso de *COL10* las células de la línea 3a6-*hMSCs* expresan muy poco y las 127TT-*hMSCs* no lo expresan, esto podría estar mostrando un menor grado de hipertrofia con respecto a las células *MSCs* no *OA*.

El estudio de las conexinas cuya expresión se ha descrito en *MSCs*, *GJA1*, *GJA5*, *GJC1* y *PANX3* (Batra, Kar y Jiang, 2012); y condrocitos, *GJA1*, *GJA3*, *GJB1*, *GJC1* y *PANX3* (Plotkin y Stains, 2015), permite comenzar a comprender el patrón de expresión teórico de estos genes durante la condrogénesis. Pese a que la función y expresión de algunas conexinas como *GJA1* (Gago-Fuentes *et al.*, 2014; Ishikawa *et al.*, 2016) y, más recientemente, *PANX3* (Iwamoto *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2015), han sido ampliamente estudiadas en *MSCs* y condrocitos; la expresión y función de otras como *GJA5*, *GJA3*, *GJB1* y *GJC1* aún permanecen una incógnita.

Lo primero que se estudió fue la expresión de las conexinas expresadas tanto por *MSCs* como por condrocitos, esto es, *GJA1*, *GJC1* y *PANX3*. En ellas se observó una tendencia a una mayor expresión de estas proteínas por parte de las *MSCs* *OA* con respecto a las *MSCs* no *OA*. De este

modo observamos que *GJA1* se expresó significativamente más en *MSCs OA* que no *OA*. Estudios previos observaron una mayor expresión de *GJA1* en condrocitos de pacientes *OA* en comparación con no *OA*, este incremento se ha asociado a la desdiferenciación de estos condrocitos. Del mismo modo, se ha descrito que las *MSCs* expresan más *GJA1* que los condrocitos dado que son células en un estado de diferenciación menor (Mayan *et al.*, 2013).

En la misma línea, las 3a6-*hMSCs* presenta una expresión similar a la observada en las *MSCs OA*, mientras que las 127TT-*hMSCs* tiene niveles más similares a los expresados por las *MSCs* no *OA*. Lo que podría estar reforzando la idea de que las 3a6-*hMSCs*, al igual que las *MSCs OA*, presentan un estado de mayor desdiferenciación.

Por otro lado, *GJC1* se observó, al igual que en el caso de *GJA1*, significativamente más expresada en *MSCs OA* que no *OA*. Esta conexina está descrita como una de las conexinas expresadas por el sistema vascular (Pogoda *et al.*, 2019; Pohl, 2020). La implicación de *GJC1* en diferentes enfermedades cardíacas ha sido estudiada, mostrando un aumento de su expresión en el miocardio, asociado a un remodelado del acoplamiento intercelular y a una mayor susceptibilidad a arritmias ventriculares (Betsuyaku *et al.*, 2006). Li y colaboradores en 2018 trasplantaron *MSCs* en ratas con infarto de miocardio y observaron que las *MSCs* modulaban la expresión de *GJA1* y *GJC1*, volviendo a obtenerse valores de expresión similares a los de corazones de rata sanos (Li *et al.*, 2018). Por otro lado, *GJC1* también ha sido descrita en condrocitos, mostrándose implicada en la mecanotransducción (Asmar *et al.*, 2016). Además, estudios previos muestran que condrocitos provenientes de pacientes *OA* presentan un aumento de esta conexina, lo que estaría asociado, al igual que en el caso de la *GJA1*, a un estado de mayor desdiferenciación de estos condrocitos (Mayan *et al.*, 2013).

La expresión de *GJC1* en ambas líneas celulares, 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs*, sigue el mismo patrón observado para *GJA1*. Lo que nuevamente aportaría fuerza a la idea de que la línea 3a6-*hMSCs* presenta un patrón de expresión que se correspondería con el de células desdiferenciadas, diferente al observado en *MSCs* no *OA*.

Finalmente, la PANX3 es una panexina, por lo tanto, forma hemicanales que permiten comunicar la célula con el medio que la rodea y su expresión ha sido descrita en todos los tejidos adultos excepto la piel (Bond y Naus, 2014). La expresión de PANX3 se ha detectado aumentada en las *MSCs* y condrocitos pre-condrogénicos y en los condrocitos hipertróficos (Iwamoto *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2015). En este trabajo la expresión de PANX3 se muestra aumentada en las *MSCs* de pacientes *OA* con respecto a las *MSCs* de pacientes no *OA*. De tal modo que, siguiendo la línea de las conexinas anteriormente estudiadas, es posible que la expresión de la PANX3 detectada

esté asociada con un estado de mayor desdiferenciación e hipertrofia de las *MSCs* provenientes de pacientes *OA*.

Asimismo, cuando se estudió la expresión de *PANX3* en las *3a6-hMSCs* y las *127TT-hMSCs* se observó en ambas líneas celulares niveles de expresión similares a los observados en las *MSCs* no *OA*. La *PANX3* se asocia más a la hipertrofia que a la desdiferenciación de las células. Por lo que, teniendo en cuenta la expresión de *COL10* observada en ambas líneas celulares, podría estar indicando un bajo nivel de hipertrofia en estas células.

El estudio de las conexinas se continuó con *GJA5*, cuya expresión ha sido descrita en las *MSCs*. La expresión de *GJA5* ha sido mayor en las *MSCs OA* con respecto a las no *OA*, aunque no significativamente. La expresión de *GJA5* está ampliamente estudiada como una de las conexinas expresadas por el sistema vascular, al igual que *GJC1*. Las conexinas son fundamentales para la transmisión de la señal a través de los cardiomiocitos en el corazón y el músculo liso y el endotelio en los vasos sanguíneos (Pogoda y Kameritsch, 2019; Pohl, 2020). En el ámbito del desarrollo del cartílago su expresión se ha observado principalmente en *MSCs* (Valiunas *et al.*, 2004; Batra, Kar y Jiang, 2012). En 2005, Pizard y colaboradores describieron que el factor de transcripción *T-box 5* (*T-box transcription factor 5*, *TBX5*) ejercía parte de su efecto regulador del desarrollo esquelético controlando la expresión de *SOX9* a través de *GJA5* (Pizard *et al.*, 2005). Posteriormente, se describió que deficiencias en *TBX5*, el cual interacciona con *GJA5* y otras proteínas implicadas en el desarrollo de la vascularización, causaba un aporte de sangre insuficiente conllevando problemas en el desarrollo del cartílago y el hueso (Rangkasenee *et al.*, 2013). La elevada expresión de *GJA5* en las *MSCs OA* con respecto a las *MSCs* no *OA* podría estar indicando un desequilibrio en las vías de señalización de la condrogénesis asociadas a *SOX9*, lo que podría derivar en una menor expresión de dicho gen, tal y como se observó anteriormente.

El estudio de la expresión de *GJA5* en las líneas celulares *3a6-hMSCs* y *127TT-hMSCs* muestra similitudes con la expresión en *MSCs* no *OA*. Esto podría estar indicando que en principio no hay alteraciones en la expresión de este gen por parte de ambas líneas.

Para finalizar el estudio de la expresión de conexinas se analizó la expresión de las conexinas descritas en condrocitos, *GJA3* y *GJB1*. De este modo, observamos una mayor expresión de *GJA3* en *MSCs OA* que en *MSCs* no *OA*. La *GJA3* se ha estudiado principalmente por su implicación en el desarrollo de cataratas congénicas cuando se produce una mutación. Mutaciones en este gen causan una disminución de la permeabilidad de los canales que forman comprometiendo el transporte de segundos mensajeros como cAMP e inositol fosfato (IP_3) entre las células lo que

causa alteraciones en el desarrollo de las lentes oculares (Valiunas, Brink y White, 2019; Ye *et al.*, 2019). En el cartílago se ha descrito principalmente en condrocitos, pero poco se sabe de su expresión génica o alteración en enfermedades como la OA (Mayan *et al.*, 2013).

Ambas líneas celulares presentan niveles más elevados de expresión de *GJA3* que las *MSCs* no OA; sin embargo, no llegan a la expresión observada en las *MSCs* OA.

Por el contrario, solo se observó expresión de *GJB1* en las *MSCs* no OA, ni las *MSCs* OA ni ninguna de las líneas celulares expresaron esta conexina. Esto coincide con lo previamente descrito, siendo esta una conexina expresada principalmente por los condrocitos (Plotkin y Stains, 2015).

Otras proteínas de gran relevancia para la comunicación de la célula, sobre todo con el medio que la rodea, son las integrinas. Las integrinas, junto con la actina y la vinculina entre otras, forman placas de comunicación celular llamadas adhesiones focales (Wu, 2007; Kanchanawong *et al.*, 2010). En estudios previos se ha encontrado que los condrocitos desdiferenciados presentan una mayor rigidez de su membrana celular asociada a un aumento de la actina y las adhesiones focales (Sliogeryte *et al.*, 2016).

Por otro lado, durante la condensación de las *MSCs*, una de las primeras fases de la diferenciación condrogénica, la Fn tiene una gran relevancia guiando la formación de la ECM (Singh y Schwarzbauer, 2012). El estudio de las subunidades alfa de las integrinas implicadas en el reconocimiento de la secuencia RGD de la Fn, *ITGA2B*, *ITGA5*, *ITGA8* e *ITGAV* (Barczyk, Carracedo y Gullberg, 2010), nos aproximará a la influencia de las uniones focales y la Fn durante la diferenciación condrogénica y a la capacidad que tienen las células de reconocer los materiales recubiertos con RGD o Fn.

En este estudio, el patrón de expresión observado de los genes *ITGA2B*, *ITGA5*, *ITGAV* e *ITGA8* es igual entre ellos, observándose en los cuatro casos una expresión significativamente mayor en las *MSCs* OA con respecto a las *MSCs* no OA. Pudiendo relacionarse la expresión significativamente superior de estas integrinas por parte de las *MSCs* OA con el estado de desdiferenciación de estas células (Charlier *et al.*, 2019).

Por otro lado, la expresión en las 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs* de los genes *ITGA2B* e *ITGAV* fue similar a la observada en las *MSCs* no OA. Sin embargo, la expresión de *ITGA5* en las 3a6-*hMSCs* fue mayor, no presentando diferencias con la observada en las *MSCs* OA. Este resultado podría asociarse a una mayor rigidez de la membrana de estas células asociada a un estado de desdiferenciación superior al de las *MSCs* no OA, como en el caso de las *MSCs* OA, lo que estaría en concordancia con lo que se ha ido observando a lo largo de este trabajo. Asimismo, las 127TT-

hMSCs no expresan ITGA8, mientras que las 3a6-*hMSCs* lo expresan en niveles similares a los presentados por las *MSCs* no OA.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que las conexinas y integrinas son proteínas que presentan interacción entre ellas. Las conexinas son proteínas con una vida muy corta, de unas pocas horas. La síntesis y el transporte hasta la membrana de nuevas conexinas está asociado a la estimulación de la internalización y la degradación de estas. La interacción de las conexinas con la actina del citoesqueleto y otras proteínas asociadas sirve para estabilizar las uniones comunicantes en la membrana plasmática (Dbouk *et al.*, 2009; Laird, 2010; Gago-Fuentes *et al.*, 2015). Esto podría explicar un cierto grado de similitud en el patrón de expresión de las integrinas y las conexinas.

Teniendo en cuenta los resultados que se han observado se puede concluir que, pese a que las *MSCs* no OA y *MSCs* OA presentan una expresión similar de los genes de diferenciación condrogénica, sin diferencias significativas; sí que presentan diferencias en su expresión de las conexinas e integrinas. Las *MSCs* OA presentan una mayor expresión de estos genes, posiblemente dado por su estado de hipertrofia y desdiferenciación (Charlier *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019). Este mayor número de receptores por parte de las *MSCs* OA podría explicar lo observado en las membranas de PLLA, donde estas células parecen responder de un modo más temprano a los estímulos con diferentes nanopatrones RGD-Cys-D1 que las *MSCs* no OA.

Asimismo, la comparación entre las 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs* con las *MSCs* no OA, muestra que ambas líneas celulares presentan en general un patrón de expresión similar. Sin embargo, sí que parece que las 3a6-*hMSCs* presentan una tendencia a la desdiferenciación que las 127TT-*hMSCs* no tiene. El análisis para determinar cuál de las dos líneas celulares es más adecuada para estudiar los andamios 3D se continuó mediante el estudio de la diferenciación condrogénica en ambas líneas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que este trabajo debe interpretarse como preliminar y sería recomendable que se continuase realizando más réplicas para confirmar los resultados obtenidos. Algunas de las limitaciones del estudio a tener en cuenta son: (1) El uso de solo tres pacientes por tipo celular. Existe una gran variabilidad entre pacientes (Cheng *et al.*, 2012) esto causa que los resultados presenten elevadas desviaciones estándar que derivan en la posibilidad de observar tendencias, pero con escasas diferencias significativas. (2) Para poder obtener un número de células suficiente para realizar los experimentos, las *MSCs* fueron expandidas en monocapa. La expansión en monocapa puede modificar el perfil de expresión génica de las células, alterando los resultados obtenidos (Darling y Athanasiou, 2005). Numerosos autores

están intentando abordar este problema actualmente diseñando nuevos métodos de cultivo que permitan mantener el perfil de expresión génica deseado (Costa *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no hay un método establecido que permita la expansión de las células evitando este problema.

2.2 3a6-*hMSC* durante la condrogénesis

El uso de líneas celulares nos permite por un lado obtener resultados con menores desviaciones entre las réplicas, dado que todas las células provienen del mismo paciente y presentan el mismo material genético; y por otro lado nos proporciona la facilidad de no estar limitados en el número de células a utilizar en los experimentos.

La línea 3a6-*hMSC* se usó para el estudio de la evaluación del perfil de expresión de las *MSCs* durante la condrogénesis. Para inducir la condrogénesis se empleó la técnica de micromasa, ya ampliamente descrita en la literatura (Johnstone *et al.*, 1998). El análisis de la expresión génica de los genes marcadores de condrogénesis en dichas micromasas muestra un incremento de la expresión de *SOX9* con el paso de los días cuando son estimuladas condrogénicamente y una cierta tendencia a la disminución cuando no son estimuladas. Sin embargo, pese a que esto apoye la idea de la diferenciación condrogénica, el estudio de la expresión de *COL2* muestra una expresión disminuida en las micromasas estimuladas con respecto a las no estimuladas.

Además, se observa un aumento significativo de la expresión de *COL1* y *COL10* cuando son estimuladas condrogénicamente, marcadores de dediferenciación e hipertrofia, esto indicaría que lo que posiblemente se esté obteniendo es un fibrocartilago con células hipertróficas y no un cartilago hialino (Benjamin y Ralphs, 2004; Hu *et al.*, 2019).

El estudio de la expresión génica de las conexinas muestra dos patrones diferentes. Por un lado, *GJA1* aumenta independientemente de si son estimuladas o no las micromasas, lo que podría estar indicando una influencia más de la técnica de inducción de la condrogénesis en micromasa, dado que se estimula la agregación mediante centrifugación de las células, que de la propia diferenciación condrogénica. Sí que se observa una elevada expresión de *GJA1* en las células sin agregar ni estimular lo que indicaría un estado de indiferenciación inicial propio de las células *MSCs* (Esseltine *et al.*, 2017). Por otro lado, el resto de las conexinas estudiadas *GJA3*, *GJA5*, *GJB1* y *GJC1* y la *PANX3*, siguen el mismo patrón de expresión tanto para estimuladas como no estimuladas. Caracterizándose dicho patrón por un aumento de la expresión a los 9 días de cultivo con respecto a los 3 días y una posterior disminución a los 21 días.

Anteriormente, se observó un aumento de la condensación de las MSCs a los 9 y 14 días asociado a la inducción de la condrogénesis mediante la técnica de micromasa (Dexheimer, Frank y Richter, 2012). Esto podría estar indicando una influencia de dichas conexinas y un aumento de la comunicación entre las células durante este periodo de condensación, que se podría asociar también al proceso de condensación de la mesénquima durante la condrogénesis embrionaria (Zimmermann, 1984). Sin embargo, esto no acaba de aclarar porque sucede de un mismo modo en todas las conexinas, tanto las descritas para células MSCs como condrocitos, y tanto si las micromasas se estimulan condrogénicamente como si no.

El estudio de la expresión de la *ITGA5* muestra una leve tendencia a aumentar a medida que se produce la diferenciación condrogénesis, siendo levemente superior a los 9 días, al igual que en el caso de las conexinas. Sin embargo, apenas hay diferencias entre las condiciones y los tiempos de estudio.

El análisis mediante histología mostró que las micromasas, tanto cuando eran estimuladas condrogénicamente como no estimuladas, fueron de un tamaño similar. Sin embargo, las micromasas estimuladas presentaron una morfología más redondeada y regular que las no estimuladas, presentando estas segundas una morfología menos compacta y menos regular. Por otro lado, se pudo observar que había un cierto grado de estratificación dentro de las micromasas estimuladas, observándose una capa exterior de células alargadas y colocadas paralelas a la superficie y una zona interior con células menos organizadas y de morfología más redondeada. Estas observaciones concuerdan con resultados previos de otros autores durante la diferenciación condrogénica de MSCs empleando esta técnica (Bosnakovski *et al.*, 2004; Pfeifer *et al.*, 2019).

Sin embargo, pese a que la morfología de las micromasas fue la correcta no se pudo determinar presencia de glucosaminoglicanos mediante la tinción de safranina-O y la fluorescencia con COL2 fue inferior en las micromasas estimuladas con respecto con las no estimuladas, resultado que no es favorable a la teoría de que las MSCs se estuvieran diferenciando condrogénicamente, pero que coincide con lo observado mediante el estudio de la expresión génica. No obstante, se observa una menor expresión de *GJA1* en las micromasas estimuladas. Si se tiene en cuenta que dicha proteína tiene tendencia a expresarse en células menos diferenciadas (Mayan *et al.*, 2013), dicho resultado podría estar indicando una cierta diferenciación de las MSCs.

Posiblemente, aumentando el número de experimentos podría llegar a obtenerse resultados más fiables que no fueran únicamente tendencias y en las que se pudieran observar diferencias

significativas que ayudaran a dilucidar más adecuadamente que está influenciando la expresión de estos genes.

2.3 127TT-*hMSC* durante la condrogénesis

Dada la disponibilidad para utilizar la línea celular 127TT-*hMSC* en los experimentos, también se usó para el estudio de la evaluación del perfil de expresión de las *MSCs* durante la condrogénesis. Sin embargo, esta línea presenta una limitación inicial, esto es, la imposibilidad de formar micromasas mediante la inducción de la agregación celular mediante centrifugación. Por ello se optó por el uso de la inducción de la agregación celular mediante la técnica de gota colgante, que sí permitió su formación.

El estudio de la expresión génica de los genes marcadores de condrogénesis en los agregados de 127TT-*hMSCs* formados mediante gota colgante permitió detectar la ausencia de expresión de COL10. Siendo este un marcador de hipertrofia, el no detectarlo es una señal positiva a la hora de usar estas células para estudios preliminares de diferenciación condrogénica (Mwale *et al.*, 2011). En la misma línea se observa una tendencia a aumentar la expresión de *SOX9* en los agregados estimulados, siendo más elevada a los 9 y 14 días, lo que se asociaría con la idea de que estos son los tiempos donde las *MSCs* comienzan a diferenciarse condrogénicamente (Dexheimer, Frank y Richter, 2012). Concordando esta idea con la expresión de tendencia creciente de COL2 en los agregados estimulados y ausencia de expresión en los no estimulados.

En contraposición, la expresión de COL1 se observa incrementada significativamente a los 9 días cuando las 127TT-*hMSCs* son estimuladas, disminuyendo posteriormente la expresión a los 14 y 21 días. Esto podría estar asociado a la formación temprana de un fibrocartílago (Benjamin y Ralphs, 2004), pero su posterior disminución y expresión de COL2 no permiten llegar a una conclusión.

A continuación, el estudio de la expresión génica de las conexinas nos permite detectar en primer lugar la ausencia de expresión de *GJA5*, conexina propia de las *MSCs*, y de *GJB1*, conexina propia de los condrocitos.

La expresión de *GJA1* presenta dos tendencias diferentes dependiendo si los agregados son no estimulados o estimulados, de tal modo que en el primer caso se detecta una disminución de la expresión a lo largo del tiempo significativa, y en el segundo caso un aumento de la expresión significativo llegando a su punto más alto a los 9 y 14 días y disminuyendo posteriormente. Estudios previos han descrito que *GJA1* está implicada en el proceso de la condrogénesis, de tal modo que alteraciones en el gen causan enfermedades del sistema esquelético (Batra, Kar y

Jiang, 2012). Asimismo, está descrito una mayor expresión de esta proteína en las células desdiferenciadas, *MSCs* que en condrocitos (Esseltine *et al.*, 2017). Esto lleva a deducir que, su aumento a los 9 y 14 días cuando las *MSCs* son estimuladas condrogénicamente está posiblemente asociado a un efecto inicial durante la condrogénesis y una disminución posterior causada por la diferenciación de éstas.

Por otro lado, *GJC1* presenta una expresión estable a lo largo del tiempo aumentando a los 21 días en el caso de los estimulados. Lo que podría estar indicando una cierta influencia de esta conexina en los estadios un poco más tardíos de la diferenciación condrogénica. Sin embargo, pese a que su expresión está descrita en *MSCs* y en condrocitos, su influencia en la condrogénesis no está clara (Batra, Kar y Jiang, 2012; Asmar *et al.*, 2016).

GJA3, conexina descrita principalmente en condrocitos, se expresa en los agregados no estimulados de un modo estable sin apenas diferencias; mientras que cuando son estimulados condrogénicamente aumenta a los 9 días de cultivo y disminuye significativamente a los 21 días. Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que esta conexina esté influenciando la diferenciación condrogénica al igual que en el caso de la *GJA1* (Asmar *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

Finalmente, la expresión de la *PANX3* se ve disminuida en la diferenciación condrogénica, observándose una tendencia descendente que acaba con la ausencia de expresión a los 21 días. En la literatura está descrito la expresión de este gen en las *MSCs* no diferenciadas y en los condrocitos hipertróficos, en contraposición con una ausencia de expresión de este gen en las *MSCs* en fase de condensación o condrocitos en fase de diferenciación (Oh *et al.*, 2015). Los resultados observados podrían estar asociados a que se esté llevando a cabo una diferenciación condrogénica de las *MSCs*. La *PANX3* interviene al comienzo de la diferenciación actuando como un hemicanal que regula los niveles intracelulares de ATP/cAMP. Al promover la liberación de ATP al espacio extracelular se inhibe la vía de proliferación celular activada por la hormona paratiroidea, los niveles intracelulares de cAMP y la fosforilación de CREB, lo que lleva a la transición de una fase proliferativa a una fase de diferenciación en los condrocitos (Iwamoto *et al.*, 2010).

Para finalizar, el estudio de las integrinas mostró que las 127TT-*hMSCs* no expresan ITGA8, lo que no resulta extraño dado que no está descrita en la literatura la expresión de esta integrina en *MSCs* ni condrocitos, pese a que inicialmente se detectó en las *MSCs* primarias. Sí que expresa ITGA2B, ITGA5 e ITGAV, las cuales sí que están previamente descritas (Goessler *et al.*, 2006).

Mientras que ITGA2B presenta una expresión constante a lo largo del tiempo en los agregados estimulados, observando un pico a los 21 días. ITGA5 e ITGAV se expresan de un modo similar entre ellas, mostrando un aumento de su expresión a los 9 días de cultivo que disminuye posteriormente. Diversos estudios han demostrado la importancia de la comunicación célula-ECM durante la condrogénesis, siendo de gran relevancia en esta comunicación las integrinas (Goessler *et al.*, 2006; Song y Park, 2014; Prein y Beier, 2019). De este modo, el grupo de Tao en 2018 describieron que la Fn promovía la reparación del cartílago al promover la proliferación, migración y diferenciación condrogénica de las células progenitoras condrogénicas. Sin embargo, el bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$ disminuía significativamente esta promoción de la reparación del cartílago (Tao *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos podrían estar indicando que, así como ITGA2B no parece tener un papel relevante durante el desarrollo de la diferenciación condrogénica, las integrinas ITGA5 e ITGAV sí que parece estar moduladas durante la condrogénesis de las 127TT-*hMSCs*.

Los resultados de expresión génica obtenidos se complementaron con el estudio histológico de los agregados. Dicho análisis mostró que estos presentan tamaños poco regulares con una tendencia a disminuir a los 14 días y volver a aumentar a los 21 días, tanto en el caso de los no estimulados como en los estimulados. Por otro lado, muestran una morfología sin apenas variaciones a lo largo del tiempo y sin diferencias entre ambas condiciones. En el caso de los agregados estimulados a partir de los 9 días de cultivo se observó células de morfología más alargada dispuestas paralelas a la superficie en la periferia de los agregados y células de morfología más redondeada dispuestas de un modo menos ordenado en la parte central de los mismos. Esto ya se había observado previamente en el caso de las micromasas de las 3a6-*hMSCs* y, como se dijo previamente, concuerdan con resultados previos de otros autores durante la diferenciación condrogénica de *MSCs* (Bosnakovski *et al.*, 2004; Pfeifer *et al.*, 2019).

Aunque, la tinción con safranina-O no evidenció presencia de glucosaminoglicanos en los agregados, la tinción de tricrómico de Masson permitió observar una cierta tinción de azul, en los agregados estimulados en todos los tiempos y los no estimulados a 21 días, que podría asociarse a presencia de colágenos. Sin embargo, no podemos con esta tinción saber qué tipo de colágeno es el que se estaría depositando en cada caso.

Por último, se evaluó la presencia de depósitos cálcicos en los agregados mediante la tinción de rojo alizarina y von Kossa. En ambas tinciones se observan evidencias de depósitos cálcicos a los 14 y 21 días de los agregados no estimulados, mientras que los estimulados no presentan en ningún caso indicios. Esto estaría indicando que, pese a que estas células presentan una cierta

tendencia a la formación de depósitos cálcicos y posiblemente la osteogénesis (Sanjurjo-Rodríguez *et al.*, 2017), cuando es inducida su condrogénesis se inhibe dicha vía (Zhang *et al.*, 2017).

Al igual que en caso de la línea celular 3a6-*hMSCs*, es necesario aumentar el número de experimentos para poder llegar a obtenerse resultados más fiables que ayudaran a aclarar más adecuadamente que está influenciando la expresión de estos genes y la importancia de cada uno. Podríamos, sin embargo, concluir que la línea 127TT-*hMSCs* presenta un menor hipertrofia y desdiferenciación, y un perfil condrogénico más claro que la línea celular 3a6-*hMSCs*. Por lo que será la línea de *MSCs* escogida para estudios posteriores.

3 Evaluar el potencial condrogénico de andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1

Los andamios 3D permiten aportar una estructura más similar a la biológica (Knight y Przyborski, 2015). El PCL es un material polimérico, al igual que el PLLA, que se ha usado ampliamente en la fabricación de andamios y en la regeneración del cartílago (Kundu *et al.*, 2015; Kazemnejad *et al.*, 2017). Asimismo, debido al número de células necesario para realizar los experimentos con los andamios 3D se optó por usar células de la línea 127TT-*hMSCs* dados los resultados previamente discutidos.

La técnica de impresión empleada es el FDM, la cual permite imprimir estructuras de un modo reproducible (Tamay *et al.*, 2019), tal y como muestra el estudio del tamaño del poro. El tamaño de poro diseñado fue de 1 mm y este tamaño se mantuvo constante en diferentes andamios y dentro del mismo andamio en los diferentes poros.

Por otro lado, el estudio de viabilidad celular mostró que las células se mantienen viables en los andamios de PCL y proliferan, aumentando significativamente su actividad a medida que pasa el tiempo.

Sin embargo, pese a estos resultados se encontró que, aunque las células sobreviven se encuentran localizadas en las intersecciones de los filamentos, es decir, las esquinas, donde se localizan los pocos depósitos de *ECM* observados en las tinciones histológicas, y apenas se extienden por los filamentos del andamio; esto podría deberse al tamaño del poro. El tamaño del poro es un factor fundamental en el diseño de los andamios de tal modo que se ha observado en estudios previos que la modificación de este puede causar respuestas diferentes entre las células (Zeltinger *et al.*, 2001; Lammi *et al.*, 2018). Pese a que no se ha conseguido establecer un tamaño de poro ideal para la diferenciación condrogénica, sí que los autores coinciden en que

estaría entre valores de 100 a 400 μm (Di Luca *et al.*, 2016; Ferlin *et al.*, 2016; Nava *et al.*, 2016; Gupte *et al.*, 2018).

Lo que nos lleva a pensar que, en estos andamios, las MSCs al no encontrar un lugar adecuado para adherirse migran a los lugares donde hay más superficie de adhesión, es decir, las esquinas. Las MSCs que no migren podrían estar muriendo por anoikis, esto es, apoptosis en respuesta a interacciones célula-ECM inadecuadas. Anoikis es un mecanismo esencial para mantener la posición de las células en los tejidos, su inducción se da cuando las células pierden su unión a la ECM o cuando se adhieren a un tipo inadecuado de ECM, siendo esta segunda opción más relevante *in vivo* (Gilmore, 2005). La relativa ausencia de células en las fibras nos podría estar indicando que las 127TT-hMSCs no son capaces de interactuar con la superficie del PCL con suficiente fuerza como para permanecer ancladas y que no se induzca la apoptosis por insuficiente adhesión.

Esto podría solucionarse disminuyendo el tamaño del poro o usando un hidrogel que permitiera aportar una ECM con dos fases, un andamio sólido uniforme de PCL y una ECM gelatinosa de degradación más rápida que permitiera a las células crecer y establecerse correctamente (Mintz y Cooper, 2014). Este tipo de andamios híbridos ya se han usado anteriormente en la ingeniería de cartílago, el grupo de Schagemann en 2010 probaron cuatro andamios híbridos: PCL con AH, PCL con quitosano, PCL con fibrina y aprotinina y PCL con COL1. En ellos sembraron condrocitos articulares de conejo y los mantuvieron durante 50 días, observando que los andamios de PCL con AH y PCL con quitosano promovían la formación de neocartílago (Schagemann *et al.*, 2010). Del mismo modo, en 2015 el grupo de Kundu emplearon andamios híbridos de PCL con alginato y TGF- β , en los cuales encapsularon los condrocitos dentro del hidrogel y los implantaron en el espacio subcutáneo dorsal de ratones; observando a las 4 semanas formación de cartílago y formación de fibras de COL2 (Kundu *et al.*, 2015).

Por otro lado, la poca densidad celular observada y lo anteriormente descrito podría estar causando la poca respuesta observada de las 127TT-hMSCs a los dendrímeros. Los dendrímeros aportan un lugar de unión, pero si las células de por sí no tienen la capacidad de reconocer la superficie y responder a causa del estrés biológico al que se les está sometiendo al estar estimulándolas condrogénicamente en un andamio que no es propicio para su diferenciación (Wang *et al.*, 2010), el factor modificador que puedan aportar los dendrímeros pierde importancia, esto es, el estímulo que aportan los diferentes nanopatrones de dendrímeros es insuficiente. Por el contrario, la Fn sí que aporta una mejor zona de anclaje a la superficie, siendo la proteína usada de modo estándar para fomentar la unión de las células a las superficies

(Liverani *et al*, 2019) y por ello se observa un mayor número de células y se muestra una mayor formación *ECM* en las condiciones de Fn-PCL, tanto no estimulada como estimulada.

Los resultados obtenidos de la expresión génica son producto del poco material que se consiguió obtener para realizar los experimentos, por lo que ninguna conclusión fiable podría extraerse de ellos.

Para complementar este trabajo podría repetirse empleando andamios con un poro de menor tamaño o empleando un hidrogel para compensar el tamaño. Una de las posibilidades podría ser el uso de un hidrogel con diferentes concentraciones de RGD-cys-D1 con la posibilidad de guiar a las células hacia la diferenciación condrogénica. Por otro lado, con el fin de entender mejor como se están guiando las células, sería aconsejable incluir más tiempos en el estudio que permitieran hacer un seguimiento más cercano.

CONCLUSIONES

1. Evaluar el potencial condrogénico de membranas transportadoras de ácido poli-L-láctico con nanopatrón de dendrímeros RGD-Cys-D1.

1.1 Las *MSCs* responden a los nanopatrones de superficie generados a partir de diferentes concentraciones de dendrímeros RGD-Cys-D1.

1.2 Las *MSCs* cultivadas durante 3 días con medio condrogénico en las membranas de *PLLA* funcionalizadas con dendrímeros o sin funcionalizar forman agregados.

1.3 Las *MSCs* cultivadas en las láminas de *PLLA* funcionalizadas con la concentración de dendrímeros RGD-Cys-D1 $2,5 \times 10^{-8}$ % p/p forman agregados de mayor tamaño.

1.4 Las *MSCs OA* presentan una respuesta incrementada, con respecto a las *MSCs no OA*, a las láminas de *PLLA* funcionalizadas con dendrímeros. Las *MSCs* provenientes de pacientes *OA* forman agregados de mayor tamaño que las *MSCs* de pacientes no *OA*. En las *MSCs OA* se puede detectar expresión de COL2, no es así en las *MSCs no OA*.

2. Evaluar la función de las uniones comunicantes y adhesiones focales en la diferenciación condrogénica de las células estromales mesenquimales humanas.

2.1 Las *MSCs OA* presentan una mayor expresión que las *MSCs no OA* de las conexinas y panexina estudiadas (*GJA1*, *GJA3*, *GJA5*, *GJC1* y *PANX3*).

2.2 Las *MSCs OA* presentan una mayor expresión que las *MSCs no OA* de las subunidades alfa de las integrinas estudiadas (*ITGA2B*, *ITGA5*, *ITGAV* e *ITGA8*). Esta mayor expresión de integrinas de las *MSCs OA* podría explicar una respuesta incrementada a los materiales funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1.

2.3 Las líneas celulares 3a6-*hMSCs* y 127TT-*hMSCs* presentan una expresión de las conexinas, panexina e integrinas estudiadas similar al de las *MSCs no OA*.

2.4 Durante la condrogénesis la expresión de las proteínas formadoras de uniones comunicantes y adhesiones focales se ve modulada tanto en las 3a6-*hMSCs* como en las 127TT-*hMSCs*. Sin embargo, la línea 3a6-*hMSCs* presenta una mayor expresión de COL1 y COL10 que la línea 127TT-*hMSCs*. La línea celular 127TT-*hMSCs* presenta un perfil de expresión más adecuado que la línea 3a6-*hMSCs* para ser empleada en los experimentos de condrogénesis.

3. Evaluar el potencial condrogénico de andamios tridimensionales de policaprolactona funcionalizados con dendrímeros RGD-Cys-D1.

3.1 Los andamios 3D de PCL permiten la supervivencia de las células de la línea 127TT-*hMSCs*.

3.2 Los andamios de PCL funcionalizados con RGD-Cys-D1 no inducen diferenciación condrogénica de las células 127TT-*hMSCs* a los 21 días de cultivo con medio condrogénico.

3.3 Un tamaño de poro de 1 mm de lado en los andamios de PCL no estimula ni favorece la diferenciación condrogénica de las 127TT-*hMSCs*.

Estos hallazgos respaldan la **hipótesis** de que las uniones comunicantes y las adhesiones focales ejercen un papel durante la condrogénesis y que es posible dirigir las células mediante un nanopatrón superficial de RGD en andamios 2D pero no en los andamios 3D estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhmanova, M. *et al.* (2015) «Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of in Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research», *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation, 2015. doi: 10.1155/2015/167025.
- Akkiraju, H. y Nohe, A. (2015) «Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration», *Journal of Developmental Biology*, 3(4), pp. 177-192. doi: 10.3390/jdb3040177.
- Alberts, B. *et al.* (2010) *Biología molecular de la célula*. 5ª Edición. Omega.
- Andia, I. y Maffulli, N. (2019) «New biotechnologies for musculoskeletal injuries», *Surgeon*. Elsevier Ltd, 17(4), pp. 244-255. doi: 10.1016/j.surge.2018.08.004.
- Andorko, J. I. y Jewell, C. M. (2017) «Designing biomaterials with immunomodulatory properties for tissue engineering and regenerative medicine», *Bioengineering & Translational Medicine*, 2(2), pp. 139-155. doi: 10.1002/btm2.10063.
- de Araújo, R. V. *et al.* (2018) «New advances in general biomedical applications of PAMAM dendrimers», *Molecules*, 23(11), pp. 1-27. doi: 10.3390/molecules23112849.
- Armiento, A. R. *et al.* (2018) «Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology», *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 65, pp. 1-20. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.021.
- Armoiry, X. *et al.* (2019) «Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal», *PharmacoEconomics*, 37(7), pp. 879-886. doi: 10.1007/s40273-018-0737-z.
- Asik, M. *et al.* (2008) «The Microfracture Technique for the Treatment of Full-Thickness Articular Cartilage Lesions of the Knee: Midterm Results», *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 24(11), pp. 1214-1220. doi: 10.1016/j.arthro.2008.06.015.
- Asmar, A. *et al.* (2016) «Membrane channel gene expression in human costal and articular chondrocytes», *Organogenesis*, 12(2), pp. 94-107. doi: 10.1080/15476278.2016.1181238.
- Barczyk, M., Carracedo, S. y Gullberg, D. (2010) «Integrins», *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp. 269-280. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6.
- Bassi, A. K. *et al.* (2011) «The chemical and physical properties of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds functionalised with poly(vinyl phosphonic acid-co-acrylic acid)», *Journal of Tissue Engineering*, 2(1), pp. 1-9. doi: 10.4061/2011/615328.
- Batra, N., Kar, R. y Jiang, J. X. (2012) «Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone», *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1818(8), pp. 1909-1918. doi: 10.1016/j.bbmem.2011.09.018.
- Benjamin, M. y Ralphs, J. R. (2004) «Biology of fibrocartilage cells.», *International review of cytology*, 233, pp. 1-45. doi: 10.1016/S0074-7696(04)33001-9.
- Bernhard, J. C. y Vunjak-Novakovic, G. (2016) «Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration?», *Stem Cell Research and Therapy*. Stem Cell Research & Therapy, 7(1), pp. 3-11. doi: 10.1186/s13287-016-0314-3.
- Betsuyaku, T. *et al.* (2006) «Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo.», *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(1), pp. H163-71. doi: 10.1152/ajpheart.01308.2004.

- Bieback, K. y Netsch, P. (2016) «Isolation, Culture, and Characterization of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells», en, pp. 245-258. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_14.
- Boehler, R. M., Graham, J. G. y Shea, L. D. (2011) «Tissue engineering tools for modulation of the immune response», *BioTechniques*, 51(4), pp. 239-254. doi: 10.2144/000113754.
- Bond, S. R. y Naus, C. C. (2014) «The pannexins: Past and present», *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), pp. 1-24. doi: 10.3389/fphys.2014.00058.
- Bosnakovski, D. *et al.* (2004) «Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system», *Experimental Hematology*, 32(5), pp. 502-509. doi: 10.1016/j.exphem.2004.02.009.
- Boyce, B. F., Zuscik, M. J. y Xing, L. (2018) «Biology of Bone and Cartilage», en *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*. Elsevier, pp. 173-195. doi: 10.1016/B978-0-12-804182-6.00011-3.
- Brady, K., Dickinson, S. C. y Hollander, A. P. (2015) «Changes in Chondrogenic Progenitor Populations Associated with Aging and Osteoarthritis», *Cartilage*, 6, pp. 30-35. doi: 10.1177/1947603515574838.
- Brittberg, M. *et al.* (2018) «Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial», *American Journal of Sports Medicine*, 46(6), pp. 1343-1351. doi: 10.1177/0363546518756976.
- Brody, L. T. (2015) «Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function», *Physical Therapy in Sport*. Elsevier Ltd, 16(4), pp. 301-316. doi: 10.1016/j.ptsp.2014.12.001.
- Cao, Z., Dou, C. y Dong, S. (2014) «Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration», *Journal of Nanomaterials*, 2014(July), pp. 1-8. doi: 10.1155/2014/489128.
- Caplan, A. I. (1991) «Mesenchymal stem cells.», *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), pp. 641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504.
- Caplan, A. I. (2017) «Mesenchymal stem cells: Time to change the name!», *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), pp. 1445-1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
- Carballo, C. B. *et al.* (2017) «Basic Science of Articular Cartilage», *Clinics in Sports Medicine*, 36(3), pp. 413-425. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001.
- Charbord, P. (2010) «Bone marrow mesenchymal stem cells: Historical overview and concepts», *Human Gene Therapy*, 21(9), pp. 1045-1056. doi: 10.1089/hum.2010.115.
- Charlier, E. *et al.* (2019) «Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)», *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 165(February), pp. 49-65. doi: 10.1016/j.bcp.2019.02.036.
- Chen, P. M. *et al.* (2011) «Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells», *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd, 18(1), p. 49. doi: 10.1186/1423-0127-18-49.
- Chen, S., Fu, P., Cong, R., Wu, H., *et al.* (2015) «Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration», *Genes & Diseases*, 2(1), pp. 76-95. doi: 10.1016/j.gendis.2014.12.003.
- Cheng, W.-C. *et al.* (2012) «Intra- and Inter-Individual Variance of Gene Expression in Clinical Studies», *PLoS ONE*. Editado por I. K. Jordan, 7(6), p. e38650. doi:

10.1371/journal.pone.0038650.

Chiquet-Ehrismann, R. y Tucker, R. P. (2004) «Connective tissues: Signalling by tenascins», *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(6), pp. 1085-1089. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.007.

Collins, C. y Nelson, W. J. (2015) «Running with neighbors: Coordinating cell migration and cell-cell adhesion», *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 36, pp. 62-70. doi: 10.1016/j.ceb.2015.07.004.

Connelly, J. T. *et al.* (2011) «Fibronectin- and collagen-mimetic ligands regulate bone marrow stromal cell chondrogenesis in three-dimensional hydrogels.», *European cells & materials*, 22(24), pp. 168-76; discussion 176-7. doi: 10.22203/ecm.v022a13.

Conoscenti, G. *et al.* (2017) «PLLA scaffolds produced by thermally induced phase separation (TIPS) allow human chondrocyte growth and extracellular matrix formation dependent on pore size», *Materials Science and Engineering C*, 80, pp. 449-459. doi: 10.1016/j.msec.2017.06.011.

Costa, E. *et al.* (2018) «Maintenance of chondrocyte phenotype during expansion on PLLA microtopographies», *Journal of Tissue Engineering*, 9. doi: 10.1177/2041731418789829.

Danišovič, L. *et al.* (2007) «Chondrogenic differentiation of human bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells», *Journal of Applied Biomedicine*, 5(3), pp. 139-150. doi: 10.32725/jab.2007.019.

Darling, E. M. y Athanasiou, K. A. (2005) «Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations.», *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23(2), pp. 425-32. doi: 10.1016/j.orthres.2004.08.008.

Dbouk, H. A. *et al.* (2009) «Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels», *Cell Communication and Signaling*, 7(1), p. 4. doi: 10.1186/1478-811X-7-4.

DeLise, A. M., Fischer, L. y Tuan, R. S. (2000) «Cellular interactions and signaling in cartilage development», *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(5), pp. 309-334. doi: 10.1053/joca.1999.0306.

Demange, M. y Gomoll, A. H. (2012) «The use of osteochondral allografts in the management of cartilage defects», *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 5(3), pp. 229-235. doi: 10.1007/s12178-012-9132-0.

Deng, C. *et al.* (2018) «Bioactive scaffolds for regeneration of cartilage and subchondral bone interface», *Theranostics*, 8(7), pp. 1940-1955. doi: 10.7150/thno.23674.

Dexheimer, V., Frank, S. y Richter, W. (2012) «Proliferation as a requirement for in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells», *Stem Cells and Development*, 21(12), pp. 2160-2169. doi: 10.1089/scd.2011.0670.

Diekman, B. O. *et al.* (2010) «Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: Induction by growth factors and cartilage-derived matrix», *Tissue Engineering - Part A*, 16(2), pp. 523-533. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0398.

Dominici, M. *et al.* (2006) «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement», *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Dormer, N. H. *et al.* (2012) «Osteochondral interface regeneration of the rabbit knee with macroscopic gradients of bioactive signals», *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(1), pp. 162-170. doi: 10.1002/jbm.a.33225.

- Dove, A. (2014) «The art of culture: Developing cell lines», *Science*, 346(6212), pp. 1013-1015. doi: 10.1126/science.346.6212.1013.
- Drake, R. L., Vogl, W. y Mitchell, A. W. M. (2015) *Gray. Anatomía para Estudiantes*. 3ª edición. Elsevier.
- Dreier, R. (2010) «Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders», *Arthritis Research & Therapy*, 12(5), p. 216. doi: 10.1186/ar3117.
- Duval, K. et al. (2017) «Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture», *Physiology*, 32(4), pp. 266-277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- Elloumi-Hannachi, I., Yamato, M. y Okano, T. (2010) «Cell sheet engineering: A unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine», *Journal of Internal Medicine*, 267(1), pp. 54-70. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02185.x.
- Eltom, A., Zhong, G. y Muhammad, A. (2019) «Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review», *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, pp. 1-13. doi: 10.1155/2019/3429527.
- EMA (2017a) *ChondroCelet*, European Medicines Agency. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/chondrocelect>.
- EMA (2017b) *Spherox*, European Medicines Agency. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spherox>.
- EMA (2018) *Maci*, European Medicines Agency. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/maci>.
- Engel, E. et al. (2008) «Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side», *Trends in Biotechnology*, 26(1), pp. 39-47. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.10.005.
- Ennis, J. et al. (2008) «Isolation, Characterization, and Differentiation of Human Umbilical Cord Perivascular Cells (HUCPVCs)», *Methods in Cell Biology*, 86(08), pp. 121-136. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00007-1.
- Erggelet, C. y Vavken, P. (2016) «Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint – A golden standard?», *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. Delhi Orthopedic Association, 7(3), pp. 145-152. doi: 10.1016/j.jcot.2016.06.015.
- Esseltine, J. L. et al. (2017) «Connexin43 Mutant Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Altered Differentiation Potential», *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(6), pp. 1368-1385. doi: 10.1002/jbmr.3098.
- Estevez, B., Shen, B. y Du, X. (2015) «Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), pp. 24-29. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303411.
- Fan, L. et al. (2016) «Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells», *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), p. 650. doi: 10.3390/ijms17050650.
- FDA (2019) *MACI (Autologous Cultured Chondrocytes on a Porcine Collagen Membrane)*, U.S. Food and Drug Administration. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/maci-autologous-cultured-chondrocytes-porcine-collagen-membrane>.

- Feng, K. *et al.* (2010) «Novel antibacterial nanofibrous PLLA scaffolds», *Journal of Controlled Release*, 146(3), pp. 363-369. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.05.035.
- Ferlin, K. M. *et al.* (2016) «Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation», *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 32, pp. 161-169. doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.007.
- Fernandes, T. L. *et al.* (2018) «Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration», *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 24(12), pp. 709-716. doi: 10.1089/ten.tec.2018.0219.
- Fernández-Moreno, M. *et al.* (2016) «Generating rho-0 cells using mesenchymal stem cell lines», *PLoS ONE*, 11(10), pp. 1-23. doi: 10.1371/journal.pone.0164199.
- Fitzgerald, R. *et al.* (2018) «Physiochemical Characteristics of Poly-L-Lactic Acid (PLLA)», *Aesthetic Surgery Journal*, 38, pp. S13-S17. doi: 10.1093/asj/sjy012.
- Foran, J. R. H. y Miller, M. D. (2018) *Osteonecrosis of the hip*, *OrthoInfo*. Disponible en: <https://orthoinfo.aaos.org/en/diseases--conditions/osteonecrosis-of-the-hip>.
- Fox, A. J. S., Bedi, A. y Rodeo, S. A. (2009) «The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function», *Sports Health*, 1(6), pp. 461-468. doi: 10.1177/1941738109350438.
- Friedenstein, A. J. *et al.* (1968) «Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.», *Transplantation*, 6(2), pp. 230-47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>.
- Funabashi, M., Ninomiya, F. y Kunioka, M. (2009) «Biodegradability evaluation of polymers by ISO 14855-2», *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), pp. 3635-3654. doi: 10.3390/ijms10083635.
- Gago-Fuentes, R. *et al.* (2014) «Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: A potential model in the study of cell communication in human chondrocytes», *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd, 22(4), pp. 586-590. doi: 10.1016/j.joca.2014.02.002.
- Gago-Fuentes, R. *et al.* (2015) «Proteomic Analysis of Connexin 43 Reveals Novel Interactors Related to Osteoarthritis», *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(7), pp. 1831-1845. doi: 10.1074/mcp.m115.050211.
- Gajardo-Gómez, R., Labra, V. C. y Orellana, J. A. (2016) «Connexins and pannexins: New insights into microglial functions and dysfunctions», *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(SEP2016), pp. 1-19. doi: 10.3389/fnmol.2016.00086.
- Gajdoš, I. y Slota, J. (2013) «Influence of printing conditions on structure in FDM prototypes», *Tehnicki Vjesnik*, 20(2), pp. 231-236.
- García-Álvarez, F. *et al.* (2011) «Chondrogenic differentiation in femoral bone marrow-derived mesenchymal cells (MSC) from elderly patients suffering osteoarthritis or femoral fracture», *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 52(2), pp. 239-242. doi: 10.1016/j.archger.2010.03.026.
- Geng, P. *et al.* (2019) «Effects of extrusion speed and printing speed on the 3D printing stability of extruded PEEK filament», *Journal of Manufacturing Processes*. Elsevier, 37(January), pp. 266-273. doi: 10.1016/j.jmapro.2018.11.023.
- Gilmore, A. P. (2005) «Anoikis», *Cell Death and Differentiation*, 12, pp. 1473-1477. doi: 10.1038/sj.cdd.4401723.

- Glennon-Alty, L. *et al.* (2013) «Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis by polyacrylate substrates», *Acta Biomaterialia*, 9(4), pp. 6041-6051. doi: 10.1016/j.actbio.2012.12.007.
- Goessler, U. R. *et al.* (2006) «In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture.», *International journal of molecular medicine*, 17(2), pp. 301-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16391830>.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. y Ijiri, K. (2006) «The control of chondrogenesis», *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(1), pp. 33-44. doi: 10.1002/jcb.20652.
- Green, J. D. *et al.* (2015) «Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering», *Genes and Diseases*. Elsevier Ltd, 2(4), pp. 307-327. doi: 10.1016/j.gendis.2015.09.003.
- Gross, A. E. *et al.* (2008) «Fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects: Long-term followup», *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(8), pp. 1863-1870. doi: 10.1007/s11999-008-0282-8.
- Gu, B. K. *et al.* (2016) «3-Dimensional Bioprinting for Tissue Engineering Applications», *Biomaterials Research*. Biomaterials Research, 20(1), pp. 1-8. doi: 10.1186/s40824-016-0058-2.
- Gupta, V. y Nayak, S. K. (2015) «Dendrimers: A review on synthetic approaches», *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), pp. 117-122. doi: 10.7324/JAPS.2015.50321.
- Gupte, M. J. *et al.* (2018) «Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization», *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 82, pp. 1-11. doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.016.
- Hall, A. C. (2019) «The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype- Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering.», *Current rheumatology reports*. Current Rheumatology Reports, 21(8), p. 38. doi: 10.1007/s11926-019-0837-6.
- Hangody, L. *et al.* (2008) «Autologous osteochondral grafting-Technique and long-term results», *Injury*, 39(1 SUPPL.), pp. 32-39. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.041.
- Hardingham, T. E., Oldershaw, R. A. y Tew, S. R. (2006) «Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis», *Journal of Anatomy*, 209(4), pp. 469-480. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00630.x.
- Harris, J. D. *et al.* (2011) «Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation - a systematic review», *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd, 19(7), pp. 779-791. doi: 10.1016/j.joca.2011.02.010.
- Hasegawa, M., Yoshida, T. y Sudo, A. (2018) «Role of tenascin-C in articular cartilage», *Modern Rheumatology*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 28(2), pp. 215-220. doi: 10.1080/14397595.2017.1349560.
- Hersel, U., Dahmen, C. y Kessler, H. (2003) «RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond», *Biomaterials*, 24(24), pp. 4385-4415. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
- Horwitz, E. M. *et al.* (2005) «Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement», *Cytotherapy*. Elsevier, 7(5), pp. 393-395. doi: 10.1080/14653240500319234.

Hou, L.-T. *et al.* (2010) «Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines», *Journal of Biomedical Science*, 17(1), p. 64. doi: 10.1186/1423-0127-17-64.

Hu, J. *et al.* (2010) «Porous nanofibrous PLLA scaffolds for vascular tissue engineering», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 31(31), pp. 7971-7977. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.028.

Hu, N. *et al.* (2019) «Chondrogenic induction of human osteoarthritic cartilage-derived mesenchymal stem cells activates mineralization and hypertrophic and osteogenic gene expression through a mechanomiR», *Arthritis Research and Therapy*. Arthritis Research & Therapy, 21(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/s13075-019-1949-0.

Hu, Q. *et al.* (2018) «Chondrocyte affinity peptide modified PAMAM conjugate as a nanoplatform for targeting and retention in cartilage», *Nanomedicine*, 13(7), pp. 749-767. doi: 10.2217/nnm-2017-0335.

Im, G. I., Ko, J. Y. y Lee, J. H. (2012) «Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous polymer scaffold: Influence of the pore size», *Cell Transplantation*, 21(11), pp. 2397-2405. doi: 10.3727/096368912X638865.

Ishikawa, M. *et al.* (2016) «Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns», *Journal of Cell Science*, 129(5), pp. 1018-1030. doi: 10.1242/jcs.176883.

Iwamoto, T. *et al.* (2010) «Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation», *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), pp. 18948-18958. doi: 10.1074/jbc.M110.127027.

Iwamoto, T. *et al.* (2013) «Biological roles of gap junction proteins in cartilage and bone development», *Journal of Oral Biosciences*. Elsevier, 55(1), pp. 29-33. doi: 10.1016/j.job.2012.12.001.

Jacobi, M. *et al.* (2011) «MACI - a new era?», *Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy and Technology*, 3(1), pp. 1-7. doi: 10.1186/1758-2555-3-10.

Jacobs, S. A. *et al.* (2013) «Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells», *Immunology and Cell Biology*. Nature Publishing Group, 91(1), pp. 32-39. doi: 10.1038/icb.2012.64.

James, A. W. (2013) «Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation», *Scientifica*, 2013, pp. 1-17. doi: 10.1155/2013/684736.

Jay, G. D. y Waller, K. A. (2014) «The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion», *Matrix Biology*. Elsevier B.V., 39, pp. 17-24. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.008.

Jiang, T. *et al.* (2019) «Biomimetic poly(poly(-caprolactone)polytetrahydrofuran urethane) based nanofibers enhanced chondrogenic differentiation and cartilage regeneration», *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 15(5), pp. 1005-1017. doi: 10.1166/jbn.2019.2748.

Johnstone, B. *et al.* (1998) «In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells», *Experimental Cell Research*, 238(1), pp. 265-272. doi: 10.1006/excr.1997.3858.

JTEC (2019) *JACC, Japan Tissue Engineering*. Disponible en: <http://www.jp-te.co.jp/english/news/index.html>.

Juneja, P. y Hubbard, J. B. (2019) *Anatomy, Joints, StatPearls*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939670>.

- Kalkreuth, R. H. *et al.* (2014) «Fibronectin stimulates migration and proliferation, but not chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells», *Regenerative Medicine*, 9(6), pp. 759-773. doi: 10.2217/rme.14.40.
- Kambe, Y. *et al.* (2010) «Effects of RGDS sequence genetically interfused in the silk fibroin light chain protein on chondrocyte adhesion and cartilage synthesis», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 31(29), pp. 7503-7511. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.045.
- Kanchanawong, P. *et al.* (2010) «Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions.», *Nature*, 468(7323), pp. 580-4. doi: 10.1038/nature09621.
- Kang, S.-S. (2008) «Regulation of Early Steps of Chondrogenesis in the Developing Limb», *Animal Cells and Systems*, 12(1), pp. 1-9. doi: 10.1080/19768354.2008.9647147.
- Kaur, G. y Dufour, J. M. (2012) «Cell lines», *Spermatogenesis*, 2(1), pp. 1-5. doi: 10.4161/spmg.19885.
- Kazemnejad, S. *et al.* (2017) «Current State of Cartilage Tissue Engineering using Nanofibrous Scaffolds and Stem Cells.», *Avicenna journal of medical biotechnology*, 9(2), pp. 50-65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28496944>.
- Keating, A. (2012) «Mesenchymal stromal cells: New directions», *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 10(6), pp. 709-716. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.015.
- Keenan, A. M. *et al.* (2006) «Impact of multiple joint problems on daily living tasks in people in the community over age fifty-five», *Arthritis Care and Research*, 55(5), pp. 757-764. doi: 10.1002/art.22239.
- Kern, S. *et al.* (2006) «Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue», *Stem Cells*, 24(5), pp. 1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- Khan, I. M. *et al.* (2008) «Cartilage integration: Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review», *European Cells and Materials*, 16(0), pp. 26-39. doi: 10.22203/ecm.v016a04.
- Kim, I. G. *et al.* (2016) «Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue engineering», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 85, pp. 18-29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.048.
- Knight, E. y Przyborski, S. (2015) «Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro», *Journal of Anatomy*, 227(6), pp. 746-756. doi: 10.1111/joa.12257.
- Koh, Y.-G. *et al.* (2019) «Optimal mechanical properties of a scaffold for cartilage regeneration using finite element analysis», *Journal of Tissue Engineering*, 10. doi: 10.1177/2041731419832133.
- Krych, A. J. *et al.* (2016) «Bone Marrow Concentrate Improves Early Cartilage Phase Maturation of a Scaffold Plug in the Knee», *American Journal of Sports Medicine*, 44(1), pp. 91-98. doi: 10.1177/0363546515609597.
- Kundu, J. *et al.* (2015) «An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering.», *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(11), pp. 1286-97. doi: 10.1002/term.1682.
- Kuo, Y. C. y Wang, C. C. (2011) «Surface modification with peptide for enhancing chondrocyte adhesion and cartilage regeneration in porous scaffolds», *Colloids and Surfaces B:*

- Biointerfaces*. Elsevier B.V., 84(1), pp. 63-70. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.021.
- Kuo, Y. C. y Wang, C. C. (2012) «Cartilage regeneration by culturing chondrocytes in scaffolds grafted with TATVHL peptide», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 93, pp. 235-240. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.012.
- Kurtis, M. S. *et al.* (2001) «Mechanisms of chondrocyte adhesion to cartilage: Role of β 1-integrins, CD44, and annexin V», *Journal of Orthopaedic Research*, 19(6), pp. 1122-1130. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00051-1.
- Lagunas, A. *et al.* (2014) «Large-scale dendrimer-based uneven nanopatterns for the study of local arginine-glycine-aspartic acid (RGD) density effects on cell adhesion», *Nano Research*, 7(3), pp. 399-409. doi: 10.1007/s12274-014-0406-2.
- Lagunas, A. *et al.* (2017) «Tailoring RGD local surface density at the nanoscale toward adult stem cell chondrogenic commitment», *Nano Research*, 10(6), pp. 1959-1971. doi: 10.1007/s12274-016-1382-5.
- Laing, A. G. *et al.* (2019) «Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress», *PLoS ONE*, 14(3), pp. 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0213170.
- Laird, D. W. (2010) «The gap junction proteome and its relationship to disease», *Trends in Cell Biology*, 20(2), pp. 92-101. doi: 10.1016/j.tcb.2009.11.001.
- Lammi, M. *et al.* (2018) «Challenges in Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage with Correct Cellular Colonization and Extracellular Matrix Assembly», *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), p. 2700. doi: 10.3390/ijms19092700.
- Landínez-Parra, N. S., Garzón-Alvarado, D. A. y Vanegas-Acosta, J. C. (2012) «Mechanical Behavior of Articular Cartilage», en *Injury and Skeletal Biomechanics*. InTechOpen, pp. 197-216. doi: 10.5772/48323.
- Lee, K. B. L. *et al.* (2012) «A novel, minimally-invasive technique of cartilage repair in the human knee using arthroscopic microfracture and injections of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid-a prospective comparative study on safety and short-term efficacy», *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, 41(11), pp. 511-517.
- Lee, Y., Choi, J. y Hwang, N. S. (2018) «Regulation of lubricin for functional cartilage tissue regeneration: A review», *Biomaterials Research*. Biomaterials Research, 22(1), pp. 1-10. doi: 10.1186/s40824-018-0118-x.
- Lefebvre, V., Angelozzi, M. y Haseeb, A. (2019) «SOX9 in cartilage development and disease», *Current Opinion in Cell Biology*, 61, pp. 39-47. doi: 10.1016/j.ceb.2019.07.008.
- Lefebvre, V. y Dvir-Ginzberg, M. (2017) «SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage», *Connective Tissue Research*, 58(1), pp. 2-14. doi: 10.1080/03008207.2016.1183667.
- Legate, K. R., Wickström, S. A. y Fässler, R. (2009) «Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling», *Genes and Development*, 23(4), pp. 397-418. doi: 10.1101/gad.1758709.
- Levorson, E. J. *et al.* (2014) «Cell-derived polymer/extracellular matrix composite scaffolds for cartilage regeneration, part 2: Construct devitalization and determination of chondroinductive capacity», *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 20(4), pp. 358-372. doi: 10.1089/ten.tec.2013.0288.
- Li, J. y Dong, S. (2016) «The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and

Hypertrophic Differentiation», *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, pp. 1-12. doi: 10.1155/2016/2470351.

Li, J. yi *et al.* (2018) «Transplantation of mesenchymal stem cells modulated Cx43 and Cx45 expression in rats with myocardial infarction», *Cytotechnology*. Springer Netherlands, 70(1), pp. 225-234. doi: 10.1007/s10616-017-0136-x.

Li, M. H. *et al.* (2017) «Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis», *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(10), pp. 1577-1587. doi: 10.1016/j.joca.2017.07.004.

Li, X. *et al.* (2015) «Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds coated with PhaP-RGD fusion protein promotes the proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro», *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(3), pp. 1169-1175. doi: 10.1002/jbm.a.35265.

Lim, J. Y. *et al.* (2016) «Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis», *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(January), pp. 1-13. doi: 10.1038/srep26851.

Lippert (2003) *Anatomía: Estructura y Morfología del cuerpo humano*. 4ª Edición. Marban.

Liu, Q. *et al.* (2018) «Suppressing mesenchymal stem cell hypertrophy and endochondral ossification in 3D cartilage regeneration with nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffold and matrilin-3», *Acta Biomaterialia*, 76, pp. 29-38. doi: 10.1016/j.actbio.2018.06.027.

Liverani, L., Killian, M. S. y Boccaccini, A. R. (2019) «Fibronectin functionalized electrospun fibers by using benign solvents: Best way to achieve effective functionalization», *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(APR), pp. 1-12. doi: 10.3389/fbioe.2019.00068.

Loeser, R. F. (2014) «Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage», *Matrix Biology*. Elsevier B.V., 39, pp. 11-16. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.007.

Loh, Q. L. y Choong, C. (2013) «Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size», *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), pp. 485-502. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437.

Di Luca, A. *et al.* (2016) «Influencing chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in scaffolds displaying a structural gradient in pore size», *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 36, pp. 210-219. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.014.

Luo, Y. *et al.* (2017) «The minor collagens in articular cartilage», *Protein and Cell*, 8(8), pp. 560-572. doi: 10.1007/s13238-017-0377-7.

Malikmammadov, E. *et al.* (2018) «PCL and PCL-based materials in biomedical applications», *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. Taylor & Francis, 29(7-9), pp. 863-893. doi: 10.1080/09205063.2017.1394711.

Mao, Y. *et al.* (2018) «An Innovative Laboratory Procedure to Expand Chondrocytes with Reduced Dedifferentiation», *Cartilage*, 9(2), pp. 202-211. doi: 10.1177/1947603517746724.

Maqsood, M. I. *et al.* (2013) «Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment», *Cell Biology International*, 37(10), pp. 1038-1045. doi: 10.1002/cbin.10137.

Marcacci, M., Filardo, G. y Kon, E. (2013) «Treatment of cartilage lesions: What works and why?», *Injury*. Elsevier Ltd, 44(SUPPL.1), pp. S11-S15. doi: 10.1016/S0020-1383(13)70004-4.

Marín-Peña, O. *et al.* (2016) «Anatomía y función de la articulación coxofemoral. Anatomía

artroscópica de la cadera», *Revista Española de Artroscopia y Cirugía Articular*, 23(1), pp. 3-10. doi: 10.1016/j.reaca.2016.02.001.

Masaeli, R., Zandsalimi, K. y Tayebi, L. (2019) «Biomaterials Evaluation: Conceptual Refinements and Practical Reforms», *Therapeutic Innovation and Regulatory Science*, 53(1), pp. 120-127. doi: 10.1177/2168479018774320.

Mayan, M. D. *et al.* (2013) «Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: Differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage», *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 182(4), pp. 1337-1346. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.018.

Medvedeva, E. *et al.* (2018) «Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions», *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), p. 2366. doi: 10.3390/ijms19082366.

MFDS (2016) *Biological products. CARTISTEM*, Ministry of food and drug safety. Disponible en: https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=69798.

Middleton, J. C. y Tipton, A. J. (2000) «Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices», *Biomaterials*, 21(23), pp. 2335-2346. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00101-0.

Mintz, B. R. y Cooper, J. A. (2014) «Hybrid hyaluronic acid hydrogel/poly(ϵ -caprolactone) scaffold provides mechanically favorable platform for cartilage tissue engineering studies.», *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(9), pp. 2918-26. doi: 10.1002/jbm.a.34957.

Mithoefer, K. *et al.* (2005) «The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee: A prospective cohort study», *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 87(9 I), pp. 1911-1920. doi: 10.2106/JBJS.D.02846.

Mwale, F. *et al.* (2011) «The constitutive expression of type X collagen in mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients is reproduced in a rabbit model of osteoarthritis», *Journal of Tissue Engineering*, 2(1), pp. 1-10. doi: 10.4061/2011/587547.

Nair, L. S. y Laurencin, C. T. (2007) «Biodegradable polymers as biomaterials», *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(8-9), pp. 762-798. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

Narayanan, G. *et al.* (2016) «Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering Graphical abstract HHS Public Access», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, pp. 247-276. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.015.

Nava, M. M. *et al.* (2016) «The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering», *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 14(3), pp. e223-9. doi: 10.5301/jabfm.5000302.

Negoro, T. *et al.* (2018) «Trends in clinical trials for articular cartilage repair by cell therapy», *npj Regenerative Medicine*. Springer US, 3(1), p. 17. doi: 10.1038/s41536-018-0055-2.

NIBIB (2020) *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.

Niemeyer, P. *et al.* (2016) «Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU)», *Knee*. Elsevier B.V., 23(3), pp. 426-435. doi: 10.1016/j.knee.2016.02.001.

Nikolaou, V. S. y Giannoudis, P. V. (2017) «History of osteochondral allograft transplantation», *Injury*, 48(7), pp. 1283-1286. doi: 10.1016/j.injury.2017.05.005.

Obinata, M. (2007) «The immortalized cell lines with differentiation potentials: Their establishment and possible application», *Cancer Science*, 98(3), pp. 275-283. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00399.x.

Oh, S. K. *et al.* (2015) «Pannexin 3 is required for normal progression of skeletal development in vertebrates», *FASEB Journal*, 29(11), pp. 4473-4484. doi: 10.1096/fj.15-273722.

OpenStax (2013) *Anatomy and physiology: Chapter 9. Joints*, Rice University. Disponible en: <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/9-4-synovial-joints/>.

Ossendorf, C. *et al.* (2011) «Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the treatment of large and complex cartilage lesions of the knee», *Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation, Therapy and Technology*, 3(1), pp. 1-5. doi: 10.1186/1758-2555-3-11.

Ossila (2020) *Spin Coating: Complete guide to theory and techniques*. Disponible en: <https://www.ossila.com/pages/spin-coating>.

Pan, C. *et al.* (2009) «Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions», *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(3), pp. 443-450. doi: 10.1074/mcp.M800258-MCP200.

Pankov, R. (2002) «Fibronectin at a glance», *Journal of Cell Science*, 115(20), pp. 3861-3863. doi: 10.1242/jcs.00059.

Parida, P., Behera, A. y Chandra Mishra, S. (2012) «Classification of Biomaterials used in Medicine», *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 1(3), pp. 31-35. doi: 10.11591/ijaas.v1i3.882.

Park, Y.-B. *et al.* (2017) «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 Translational Medicine*, 6(2), pp. 613-621. doi: 10.5966/sctm.2016-0157.

Patel, J. M. *et al.* (2019) «Bioactive factors for cartilage repair and regeneration: Improving delivery, retention, and activity», *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 93, pp. 222-238. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.061.

Pelekanos, R. A. *et al.* (2016) «Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue», *Journal of Visualized Experiments*, (112), p. e54204. doi: 10.3791/54204.

Pelttari, K., Steck, E. y Richter, W. (2008) «The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis», *Injury*, 39(1 SUPPL.), pp. 58-65. doi: 10.1016/j.injury.2008.01.038.

Pfeifer, C. G. *et al.* (2019) «TGF- β signalling is suppressed under pro-hypertrophic conditions in MSC chondrogenesis due to TGF- β receptor downregulation», *International Journal of Stem Cells*, 12(1), pp. 139-150. doi: 10.15283/ijsc18088.

Pittenger, M. F. *et al.* (1999) «Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.», *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), pp. 143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143.

Pizard, A. *et al.* (2005) «Connexin 40, a Target of Transcription Factor Tbx5, Patterns Wrist, Digits, and Sternum», *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), pp. 5073-5083. doi: 10.1128/mcb.25.12.5073-5083.2005.

- Plotkin, L. I. y Stains, J. P. (2015) «Connexins and pannexins in the skeleton: Gap junctions, hemichannels and more», *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel, 72(15), pp. 2853-2867. doi: 10.1007/s00018-015-1963-6.
- Pogoda, K. *et al.* (2019) «Connexins in the control of vasomotor function.», *Acta physiologica (Oxford, England)*, 225(1), p. e13108. doi: 10.1111/apha.13108.
- Pogoda, K. y Kameritsch, P. (2019) «Molecular regulation of myoendothelial gap junctions.», *Current opinion in pharmacology*, 45, pp. 16-22. doi: 10.1016/j.coph.2019.03.006.
- Pohl, U. (2020) «Connexins: Key Players in the Control of Vascular Plasticity and Function.», *Physiological reviews*, 100(2), pp. 525-572. doi: 10.1152/physrev.00010.2019.
- Pouryazdanpanah, N. *et al.* (2018) «Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells : Growth Factor-Free Isolation , Molecular Characterization and Differentiation», *Iranian Journal of Pathology*, 13(4), pp. 461-466.
- Prein, C. y Beier, F. (2019) *ECM signaling in cartilage development and endochondral ossification*. 1.^a ed, *Current Topics in Developmental Biology*. 1.^a ed. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ctdb.2018.11.003.
- Puetzer, J. L., Petite, J. N. y Lobo, E. G. (2010) «Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue», *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 16(4), pp. 435-444. doi: 10.1089/ten.teb.2009.0705.
- Pulai, J. I., Del Carlo, M. y Loeser, R. F. (2002) «The $\alpha 5\beta 1$ integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro», *Arthritis and Rheumatism*, 46(6), pp. 1528-1535. doi: 10.1002/art.10334.
- Puppi, D. *et al.* (2010) «Polymeric materials for bone and cartilage repair», *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd, 35(4), pp. 403-440. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006.
- Rai, V. *et al.* (2017) «Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering», *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 105(8), pp. 2343-2354. doi: 10.1002/jbm.a.36087.
- Rangkasenee, N. *et al.* (2013) «Genome-wide association identifies TBX5 as candidate gene for osteochondrosis providing a functional link to cartilage perfusion as initial factor», *Frontiers in Genetics*, 4(MAY), pp. 1-13. doi: 10.3389/fgene.2013.00078.
- Ratner, B. D. (2016) «A pore way to heal and regenerate: 21st century thinking on biocompatibility», *Regenerative Biomaterials*, 3(2), pp. 107-110. doi: 10.1093/RB/RBW006.
- Re'em, T., Tsur-Gang, O. y Cohen, S. (2010) «The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGF β 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 31(26), pp. 6746-6755. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.025.
- Reinders, M. E. y Hoogduijn, M. J. (2014) «NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation», *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 4(2), pp. 1-9. doi: 10.4172/2157-7633.1000166.
- Reis, M. *et al.* (2018) «Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function», *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), pp. 1-14. doi: 10.3389/fimmu.2018.02538.
- Richardson, R. *et al.* (2004) «Expression of Gja1 correlates with the phenotype observed in

- oculodentodigital syndrome/type III syndactyly.», *Journal of medical genetics*, 41(1), pp. 60-7. doi: 10.1136/jmg.2003.012005.
- Rodríguez-Camacho, D. F. y Correa-Mesa, J. F. (2018) «Biomecánica del cartílago articular y sus respuestas ante la aplicación de las fuerzas», *Medicas UIS*, 31(3), pp. 47-56. doi: 10.18273/revmed.v31n3-2018005.
- Ross, M. H. y Pawlina, W. (2007) *Histología*. 5ª Edición. Editorial Panamericana.
- Rossy, W. y Strauss, E. (2017) «Cell-Based Treatment for the Management of Articular Cartilage Injuries Where Are We?», *Bulletin of the Hospital for Joint Disease (2013)*, 75(1), pp. 64-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28214464>.
- Roughley, P. J. (2006) «The structure and function of cartilage proteoglycans», *European Cells and Materials*, 12, pp. 92-101. doi: 10.22203/eCM.v012a11.
- Ryan, J. M. et al. (2005) «Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection», *Journal of Inflammation*, 2, pp. 1-11. doi: 10.1186/1476-9255-2-8.
- Sani, M. et al. (2017) «Differentiation Potential of Breast Milk-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells», *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, 14(5), pp. 587-593. doi: 10.1007/s13770-017-0066-x.
- Sanjurjo-Rodríguez, C. et al. (2017) «Ovine mesenchymal stromal cells: Morphologic, phenotypic and functional characterization for osteochondral tissue engineering», *PLoS ONE*, 12(1), pp. 1-26. doi: 10.1371/journal.pone.0171231.
- Schagemann, J. C. et al. (2010) «Poly-epsilon-caprolactone/gel hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering.», *Journal of biomedical materials research. Part A*, 93(2), pp. 454-63. doi: 10.1002/jbm.a.32521.
- Scott, M. A. et al. (2011) «Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells», *Stem Cells and Development*, 20(10), pp. 1793-1804. doi: 10.1089/scd.2011.0040.
- Shao, Z. et al. (2012) «Polycaprolactone electrospun mesh conjugated with an MSC affinity peptide for MSC homing in vivo», *Biomaterials*, 33(12), pp. 3375-3387. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.033.
- Simon, T. M. y Jackson, D. W. (2006) «Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options», *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 14, pp. 146-154. doi: 10.1097/JSA.0000000000000182.
- Singh, P. y Schwarzbauer, J. E. (2012) «Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis», *Journal of Cell Science*, 125(16), pp. 3703-3712. doi: 10.1242/jcs.095786.
- Singh, P. y Schwarzbauer, J. E. (2014) «Fibronectin matrix assembly is essential for cell condensation during chondrogenesis», *Journal of Cell Science*, 127(20), pp. 4420-4428. doi: 10.1242/jcs.150276.
- Sliogeryte, K. et al. (2016) «Chondrocyte dedifferentiation increases cell stiffness by strengthening membrane-actin adhesion», *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd, 24(5), pp. 912-920. doi: 10.1016/j.joca.2015.12.007.
- Somoza, R. A. et al. (2014) «Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Challenges and unfulfilled expectations», *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 20(6), pp. 596-608. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0771.

- Song, E. K. y Park, T. J. (2014) «Integrin signaling in cartilage development», *Animal Cells and Systems*. Taylor & Francis, 18(6), pp. 365-371. doi: 10.1080/19768354.2014.987319.
- Spitzhorn, L. et al. (2017) «Isolation and Molecular Characterization of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Obtained from Caesarean Sections», *Stem Cells International*. Hindawi, 2017, pp. 1-15. doi: 10.1155/2017/5932706.
- Strioga, M. et al. (2012) «Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells», *Stem Cells and Development*, 21(14), pp. 2724-2752. doi: 10.1089/scd.2011.0722.
- Tamay, D. G. et al. (2019) «3D and 4D Printing of Polymers for Tissue Engineering Applications», *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUL), pp. 1-22. doi: 10.3389/fbioe.2019.00164.
- Tao, T. et al. (2018) «Fibronectin enhances cartilage repair by activating progenitor cells through integrin $\alpha 5\beta 1$ Receptor», *Tissue Engineering - Part A*, 24(13-14), pp. 1112-1124. doi: 10.1089/ten.tea.2017.0322.
- Tian, J., Zhang, F. J. y Lei, G. H. (2015) «Role of integrins and their ligands in osteoarthritic cartilage», *Rheumatology International*, 35(5), pp. 787-798. doi: 10.1007/s00296-014-3137-5.
- Tsang, K. Y., Chan, D. y Cheah, K. S. E. (2015) «Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension?», *Development Growth and Differentiation*, 57(2), pp. 179-192. doi: 10.1111/dgd.12203.
- Ulrich, A. B. y Pour, P. M. (2001) «Cell Lines», en *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 310-311. doi: 10.1006/rwgn.2001.0173.
- Ushida, T. et al. (2002) «Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds», *Cell Transplantation*, 11(5), pp. 489-494. doi: 10.3727/000000002783985611.
- Valenti, M., Dalle Carbonare, L. y Mottes, M. (2016) «Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions», *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), p. 41. doi: 10.3390/ijms18010041.
- Valiunas, V. et al. (2004) «Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions», *Journal of Physiology*, 555(3), pp. 617-626. doi: 10.1113/jphysiol.2003.058719.
- Valiunas, V., Brink, P. R. y White, T. W. (2019) «Lens connexin channels have differential permeability to the second messenger cAMP», *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 60(12), pp. 3821-3829. doi: 10.1167/iovs.19-27302.
- Vanlauwe, J. et al. (2011) «Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters», *American Journal of Sports Medicine*, 39(12), pp. 2566-2574. doi: 10.1177/0363546511422220.
- Varaa, N. et al. (2019) «Wharton ' s Jelly Mesenchymal Stem Cell : Various Protocols for Isolation and Differentiation of Hepatocyte-Like Cells ; Narrative Review», *Iranian Journal of Medical Sciences*, 44(6), pp. 437-448. doi: 10.30476/IJMS.2019.44952.
- Veevers-Lowe, J. et al. (2011) «Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- and potentiation of growth factor signals», *Journal of Cell Science*, 124(8), pp. 1288-1300. doi: 10.1242/jcs.076935.
- Vidal, M. A. et al. (2008) «Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal

- stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow.», *Veterinary surgery : VS*, 37(8), pp. 713-24. doi: 10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x.
- Vinatier, C. *et al.* (2009) «Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors», *Trends in Biotechnology*, 27(5), pp. 307-314. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005.
- Wang, C.-Y. *et al.* (2010) «Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: effect of serum and medium supplements.», *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15(4), pp. 439-49. doi: 10.1007/s10495-009-0431-x.
- Wang, X., Ye, K., *et al.* (2013) «Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanospacings», *Organogenesis*, 9(4), pp. 280-286. doi: 10.4161/org.26080.
- Wang, X., Yan, C., *et al.* (2013) «Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells», *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 34(12), pp. 2865-2874. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.021.
- Weeks, S. *et al.* (2012) «The effects of chemokine, adhesion and extracellular matrix molecules on binding of mesenchymal stromal cells to poly(l-lactic acid)», *Cytotherapy*. Elsevier, 14(9), pp. 1080-1088. doi: 10.3109/14653249.2012.700704.
- Wongin, S. *et al.* (2017) «Chondrogenesis and hypertrophy in response to aggregate behaviors of human mesenchymal stem cells on a dendrimer-immobilized surface», *Biotechnology Letters*. Springer Netherlands, 39(8), pp. 1253-1261. doi: 10.1007/s10529-017-2339-9.
- Wongin, S. *et al.* (2018) «Maintenance of human chondrogenic phenotype on a dendrimer-immobilized surface for an application of cell sheet engineering», *BMC Biotechnology*. BMC Biotechnology, 18(1), pp. 1-11. doi: 10.1186/s12896-018-0426-1.
- Wu, C. (2007) «Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine.», *Cell adhesion & migration*, 1(1), pp. 13-18. doi: 10.4161/cam.4081.
- Wu, Y. *et al.* (2017) «Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile», *Stem Cells International*. Hindawi, 2017, pp. 1-7. doi: 10.1155/2017/4960831.
- Yamato, M. y Okano, T. (2004) «Cell sheet engineering», *Materials Today*. Elsevier Ltd, 7(5), pp. 42-47. doi: 10.1016/S1369-7021(04)00234-2.
- Yasui, T. *et al.* (2017) «Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential», *Inflammation and Regeneration*. Inflammation and Regeneration, 37(1), p. 8. doi: 10.1186/s41232-017-0039-4.
- Ye, Y. *et al.* (2019) «Identification and preliminary functional analysis of two novel congenital cataract associated mutations of Cx46 and Cx50.», *Ophthalmic genetics*, 40(5), pp. 428-435. doi: 10.1080/13816810.2019.1675179.
- Yilmaz, B., Tahmasebifar, A. y Baran, E. T. (2019) «Bioprinting Technologies in Tissue Engineering», en *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology*. Springer, Cham, pp. 279-319. doi: 10.1007/10_2019_108.
- Yu, Y. L. *et al.* (2011) «EZH2 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through PIP5K1C-dependent calcium signaling», *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp. 9657-9667. doi: 10.1074/jbc.M110.185124.
- Zaccaria, S. *et al.* (2018) «Antimicrobial peptide modification of biomaterials using supramolecular additives», *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 56(17), pp. 1926-1934. doi: 10.1002/pola.29078.

- Zeltinger, J. *et al.* (2001) «Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition.», *Tissue engineering*, 7(5), pp. 557-72. doi: 10.1089/107632701753213183.
- Zhang, L., Hu, J. y Athanasiou, K. A. (2009) «The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration.», *Critical reviews in biomedical engineering*, 37(1-2), pp. 1-57. doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v37.i1-2.10.
- Zhang, W., Green, C. y Stott, N. S. (2002) «Bone morphogenetic protein-2 modulation of chondrogenic differentiation in vitro involves gap junction-mediated intercellular communication», *Journal of Cellular Physiology*, 193(2), pp. 233-243. doi: 10.1002/jcp.10168.
- Zhang, Y. D. *et al.* (2017) «Cx43-and Smad-Mediated TGF- β /BMP Signaling Pathway Promotes Cartilage Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Inhibits Osteoblast Differentiation», *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(4), pp. 1277-1293. doi: 10.1159/000478957.
- Zimmermann, B. (1984) «Assembly and disassembly of gap junctions during mesenchymal cell condensation and early chondrogenesis in limb buds of mouse embryos», *Journal of Anatomy*, 138(2), pp. 351-363.

Tailoring RGD local surface density at the nanoscale toward adult stem cell chondrogenic commitment

Anna Lagunas^{1,2} (✉), Iro Tsintzou², Yolanda Vida^{3,4}, Daniel Collado^{3,4}, Ezequiel Pérez-Inestrosa^{3,4}, Cristina Rodríguez Pereira⁵, Joana Magalhaes^{1,5}, José A. Andrades^{6,1}, and Josep Samitier^{2,1,7}

¹ Networking Biomedical Research Center (CIBER), C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11 Planta 0, Madrid 28029, Spain

² Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Baldiri-Reixac 10-12, Barcelona 08028, Spain

³ Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Department of Organic Chemistry, Universidad de Málaga (UMA), Málaga 29071, Spain

⁴ Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology-BIONAND, Parque Tecnológico de Andalucía, Málaga 29590, Spain

⁵ Unidad de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC), Grupo de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), As Xubias, 84, Coruña 15006 A, Spain

⁶ Cell Biology, Genetics and Physiology Department, University de Málaga (UMA), Campus Teatinos, Málaga 29071, Spain

⁷ Department of Engineering Electronics, University of Barcelona (UB), Martí i Franquès 1-11, Barcelona 08028, Spain

Received: 14 June 2016

Revised: 17 November 2016

Accepted: 21 November 2016

© Tsinghua University Press and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

KEYWORDS

dendrimer,
arginine-glycine-aspartic acid (RGD),
nanopattern,
human mesenchymal stem cells (hMSCs),
chondrogenesis

ABSTRACT

Arginine-glycine-aspartic acid (RGD) dendrimer-based nanopatterns on poly(L-lactic acid) were used as bioactive substrates to evaluate the impact of the RGD local surface density on the chondrogenic induction of adult human mesenchymal stem cells. During chondrogenic commitment, active extracellular matrix (ECM) remodeling takes place, playing an instructive role in the differentiation process. Although three-dimensional environments such as pellet or micromass cultures are commonly used for *in vitro* chondrogenic differentiation, these cultures are rather limited with respect to their ability to interrogate cells in cell-ECM interactions. In the present study, the nanopatterns of the tunable RGD surface density were obtained as a function of the initial dendrimer concentration. The local RGD surface density was quantified through probability contour plots for the minimum interparticle distance, constructed from the corresponding atomic force microscopy images, and correlated with the cell adhesion and differentiation response. The results revealed that the local RGD surface density at the nanoscale acts as a regulator of chondrogenic commitment, and that intermediate adhesiveness of cells to the substrates favors mesenchymal cell condensation and early chondrogenic differentiation.

Address correspondence to alagunas@ibecbarcelona.eu

1 Introduction

Experimental evidence of the extracellular matrix (ECM) organization at the nanoscale [1–3] has driven the production of synthetic nanopatterned surfaces directed towards identifying the geometric cues that initiate and guide cell adhesion [4, 5]. Nanopatterning of ECM motifs for the study of cell–surface interactions at the nanoscale has highlighted the relevance of ECM ligand presentation to cells. Experiments using micellar lithography-based arginine-glycine-aspartic acid (RGD) nanopatterns have shown that RGD nanospacing plays a crucial role in cell adhesion, revealing a threshold value of around 70 nm, above which the cell adhesion process is significantly delayed [6–9].

Since nanospacing influences cell adhesion, it follows that nanopatterns of different nanospacings might influence the lineage commitments of stem cells. For instance, the nanopatterns of RGD spaced at 68 nm regulate cell adhesion locally and reduce population heterogeneity in β -type Ti-40Nb alloys by maintaining the typical phenotype of non-committed stem cells [10]. Micellar lithography combined with transfer lithography has been used to evaluate the lineage commitment of mesenchymal stem cells (MSCs) in response to RGD nanospacing. Large nanospacings (95–150 nm) of RGD were found to enhance the differentiation of MSCs [11–14]. In addition to lithography-based techniques, self-assembling nanostructures modified with signaling components have proven to be promising tools to direct cell commitment by exerting nanoscale architectural control of the signaling molecules [15]. In this regard, dendrimeric molecules presenting a highly branched and easily tunable size and chemical structure have emerged as ideal nanostructures for cell studies. Dendrimers that are modified through their peripheral groups for specific cell interactions [16–18] and grafted onto surfaces have been applied to the study of cell adhesion [19, 20], cell morphology [21, 22], and cell migration events [23, 24]. Our group recently reported the application of dendrimer-based uneven nanopatterns to evaluate the local RGD surface density effects on cell adhesion. Nanopatterned substrates with higher heterogeneity in the RGD surface density resulted in a higher percentage of adhered cells with a higher

degree of maturation of the focal adhesions (FAs) compared to substrates with homogeneous RGD coverage [25].

Among the possible cell commitments of MSCs, chondrogenesis is the process that can provide deeper insights into the functions of the ECM. In chondrogenesis, the ECM undergoes continuous remodeling during the differentiation process, which plays an instructive role in directing cells through the different stages of cartilage formation [26]. Although three-dimensional environments such as pellet or micromass cultures are commonly used for *in vitro* chondrogenic differentiation studies, two-dimensional cultures have recently become useful models to interrogate cells in cell–ECM interactions [27]. Herein, we report the effects of the local RGD surface density on the chondrogenic commitment of adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) using dendrimer-based uneven RGD nanopatterns. Different dendrimer nanopattern configurations on biocompatible poly-(L-lactic acid) (PLLA) flat surfaces, characterized by atomic force microscopy (AFM), were obtained from a range of initial dendrimer concentrations, and used as substrates for the chondrogenic induction of hMSCs. Mesenchymal cell condensation and early chondrogenic differentiation events were assessed according to the nanopatterns, revealing the effects of RGD local surface density, through the cell adhesion process, in cell commitment.

2 Experimental

2.1 Dendrimer nanopatterning on PLLA substrates

Deionized water (18 M Ω -cm Milli-Q, Millipore) was used to prepare all solutions and for rinsing samples. A 95/5 L-lactide/DL-lactide copolymer (Corbion) 2% m/v solution in dry 1,4-dioxane (Panreac) was spin-coated at 3,000 rpm for 30 s on 1.25 \times 1.25-cm Corning[®] glass microslides (Sigma-Aldrich).

The surface roughness of PLLA spin-coated onto the glass microslides was calculated from AFM measurements performed on a Dimension 3100 AFM instrument (Veeco Instruments) operated in tapping mode at room temperature in air. Silicon AFM probes (Budget Sensors) with a spring constant $k = 40$ N/m

and a resonant frequency $\nu = 300$ kHz were used. Topographic images obtained from the scanning of 20×20 - μm rastered areas were used for root-mean-square (RMS) calculations performed with WSxM software (Nanotec Electronica) [28]; see Fig. S1 in the Electronic Supplementary Material (ESM). At least four areas per substrate of three independent substrates were analyzed.

Surface nanopatterning was conducted as previously described [25] by immersing the spin-coated PLLA substrates in aqueous solutions of the RGD-tailored dendrimer RGD-Cys-D1 for 16 h (pH = 5.6, $T = 293$ K). All solutions were sonicated and filtered through a Millex RB sterile syringe filter (Merk Millipore) prior to use. The dendrimer stock solution was used within 6 months of preparation. The RGD-Cys-D1 nanopatterning was followed by copious rinsing with water and drying with nitrogen.

Water contact angles (CAs) were measured on the nanopatterned substrates by the sessile-drop method at three different positions on three independent substrates with an OCA system (Dataphysics, Germany). Images of the liquid droplets of 1 μL deionized water in contact with the surface were recorded immediately after droplet stabilization, and the droplet profile was fitted with SCA20 software (Dataphysics, Germany) using an elliptic fitting method (Fig. S2 in the ESM).

Nanopatterned substrates were imaged by AFM operated in tapping mode at room temperature in air. Silicon AFM probes with a spring constant $k = 40$ N/m and a resonant frequency $\nu = 300$ kHz were used. At least three images of $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ were taken per substrate of three independent substrates per condition (initial dendrimer concentration in solution). The AFM height images processed with WSxM 4.0 software were used for calculation (Fig. S3 in the ESM). Corresponding image thresholds were obtained manually and processed with ImageJ 1.50g freeware (<http://imagej.nih.gov/ij>). The resulting particle positions were used to obtain the minimum interparticle distances (d_{min}) using a custom-generated MATLAB code (The MATHWORKS, Inc.), and the corresponding probability contour plots for d_{min} were constructed using an adapted MATLAB code from <http://www.eng.cam.ac.uk/help/tpl/programs/Matlab/matlabbyexample/>[25]. At least three images from independent samples were

computed. Threshold AFM images were superimposed to the d_{min} probability contour plots for clarity. Quantification of the percentage of the area with a d_{min} threshold below 70 nm in the d_{min} probability contour plots was performed by manually selecting the regions and processing them with ImageJ (Fig. S4 in the ESM). Dendrimer aggregates were considered as areas with d_{min} values below 70 nm.

For scanning tunneling microscope (STM) visualization (Fig. S5 in the ESM), patterning was conducted in flame-annealed 1.4×1.1 -cm Au(111) on mica substrates (Spi Supplies). The STM measurements in air were carried out on a PicoSPM microscope (Molecular Imaging) controlled by Dulcinea electronics (Nanotec Electronica) using WSxM 4.0 software. Etched Pt0.8:Ir0.2 probes with a diameter of 0.25 μm were used (Agilent Technologies).

2.2 Chondrogenic induction of hMSCs and fluorescent staining

All steps, including cell culture, were performed in a sterile laminar flow hood, and only sterile materials, solutions, and techniques were used. Normal, human adipose-derived MSCs (ATCC[®] PCS-500-011[™]) were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in Mesenchymal Stem Cell Basal Medium for adipose MSCs (ATCC[®] PCS-500-030[™]) supplemented with Mesenchymal Stem Cell Growth Kit for Adipose-derived MSCs-Low Serum (ATCC[®] PCS-500-040[™]). Passaging was carried out when the cells reached 70%–80% confluence. Cells from passages 4–5 were used in the subsequent chondrogenic induction experiments. Nanopatterned and control surfaces were incubated in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Thermo Fisher Scientific) for 15 min prior to use. The positive control was obtained by incubating spin-coated PLLA substrates with fibronectin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from bovine plasma-solution (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature (PLLA+Fn). After trypsinization, the cells were resuspended in Chondrocyte Differentiation Tool (ATCC[®] PCS-500-051[™]) supplemented with 0.1% v/v penicillin-streptomycin (Invitrogen S. A.), and seeded at a cell density of 3,000 cells/cm² on the substrates. The cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, and the cell media were replaced every second day.

After the indicated incubation periods, non-adherent cells were removed by a gentle wash with DPBS, and the remaining cells were fixed with 10% neutral-buffered formalin solution (Sigma-Aldrich) for 20 min and then washed with DPBS. The free aldehyde groups were blocked with 50 mM ammonium chloride (Merck Sharp and Dohme) in DPBS for 20 min at room temperature. Afterward, the samples were washed with DPBS, and the cells were permeabilized with a solution of 0.1% saponin (Fluka) in 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) in DPBS for 10 min at room temperature.

To visualize FAs and cell cytoskeleton actin fibers after 1 day of chondrogenic induction, fixed samples were treated for 1 h at room temperature with rabbit monoclonal [Y113] anti-paxillin antibody diluted 1:200 and CytoPainter Phalloidin-iFluor 488 Reagent (Abcam) diluted 1:100 in 1% BSA in DPBS. The cells were then washed again with DPBS and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor® 568-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (2 mg/mL) and with Hoechst (10 mg/mL) for cell nuclei staining (Invitrogen S. A.) diluted 1:1,000 in 1% BSA in DPBS.

To visualize cartilage-specific collagen type II, alpha 1 (COL2A1), fixed cells after 5 days of chondrogenic induction were treated for 1 h at room temperature with mouse monoclonal [1F5] anti-collagen alpha-1 XX chain (Acris Antibodies) diluted 1:400 in 1% BSA in DPBS. The cells were then washed with DPBS and incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody (2 mg/mL) and with Hoechst (10 mg/mL) for cell nuclei staining (Invitrogen S. A.) diluted 1:1,000 in 1% BSA in DPBS.

Samples were mounted with Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich).

2.3 Cell imaging and data analysis

ImageJ 1.50g freeware image analysis was used for quantification. The area of the cell condensates at days 1 and 5 of chondrogenic induction were identified by observation of the stained cell nuclei. Samples were imaged by fluorescence microscopy on a Nikon Eclipse E1000 Upright Microscope (Nikon) equipped

with a charge-coupled device camera with an ultraviolet emission filter. Immunostained samples for FAs, cytoskeleton actin fibers, and COL2A1 were imaged on a Leica SPE Upright Confocal Microscope (Leica Microsystems) with 40×/1.15 NA and 63×/1.3 NA ACS APO objectives (sections were collected at 1- μ m intervals). The paxillin-stained areas from the basal zone of cell condensates were quantified, and are expressed as the corresponding percentage of area in the image divided by the number of cell nuclei. For COL2A1 quantification, confocal z-projections were used (maximum COL2A1 area per sample). The obtained area value was normalized against the area of the corresponding condensate.

Each image was converted to an 8-bit file, the background was removed, and the resulting image was converted to binary by setting empirically determined threshold values (Fig. S6 in the ESM). A minimum of three cell condensates per condition in independent samples were analyzed.

2.4 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis

Bone marrow-derived hMSCs were cultured for 3 days under chondrogenic induction onto the nanopatterns and control samples. Conventional pellet cultures were also examined for comparison [29]. Isolated total RNA (1 μ g) was pulverized in a Mikro-Dismembrator (Retsch MM200), using the Trizol L.S. reagent method (Invitrogen). The obtained RNA samples were treated with DNase and converted into cDNA using the SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen). Gene expression was measured by qRT-PCR, conducted in a LightCycler 480 Instrument (Roche) using the LightCycler 480 Probes Master protocol. Amplification was performed using custom-made primers shown in Table 1. Beta-2-microglobulin (*B2M*) and ribosomal protein L13a (*RPL13a*) were used as housekeeping genes.

The amplification program consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s, and an extension at 72 °C for 1 s. Relative expression levels were calculated by the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Data were normalized against the values obtained for the negative

Table 1 List of primers used for qRT-PCR

Genes	Forward	Reverse	Probe	GenBank accession n°.
<i>SOX9</i>	GTACCCGCACTTGCAACAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	61	NM_000346.3
<i>B2M</i>	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	42	NM_004048.2
<i>RPL13a</i>	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATACTC	28	NM_012423.2

control (PLLA), which was assigned the value of 1, and were measured as relative expression levels.

2.5 Statistical analysis

Significant differences were judged using the Student *t*-test with a *p*-value of less than 0.05 considered statistically significant.

3 Results and discussion

3.1 Nanopatterning of RGD-Cys-D1 dendrimers on PLLA

Water-soluble polyamidoamine (PAMAM) G1 dendrimers were chosen to construct nanoscale cell adhesion sites. The use of low-generation PAMAM dendrimers (less than G5) is preferred since they have proven to be more biocompatible and less immunogenic than high-generation dendrimers [30].

The early steps of cell-surface interactions in adherent cells are mediated mainly by integrins. Integrins recognize, and become activated by certain amino

acid sequences present in the ECM proteins [31]. Therefore, to make dendrimers that are compatible for applications in cell-based experiments to trigger cell adhesion, the primary amine surface groups on the outermost layer of the PAMAM dendrimers were functionalized with the cell adhesion linear RGD polypeptide (Fig. 1(a)) [25]. Flat PLLA substrates (RMS = 0.8 ± 0.4 nm; Fig. S1 in the ESM) obtained by spin-coating of a 2% m/v PLLA solution in dioxane on glass microslides were used for dendrimer nanopatterning. Dendrimers were patterned onto the PLLA substrates by immersion in aqueous solutions of RGD-Cys-D1 of various concentrations ($4 \times 10^{-9}\%$ – $10^{-2}\%$ w/w) for 16 h (pH = 5.6, and $T = 293$ K).

Since surface wettability is known to affect cell adhesion and can be varied by introducing modifications of the surface composition, we measured the water CA on the different nanopatterned substrates [32]. No significant variations in the measured CA values appeared to be introduced by the different nanopattern configurations that could influence cell adhesion (Fig. S2 in the ESM).

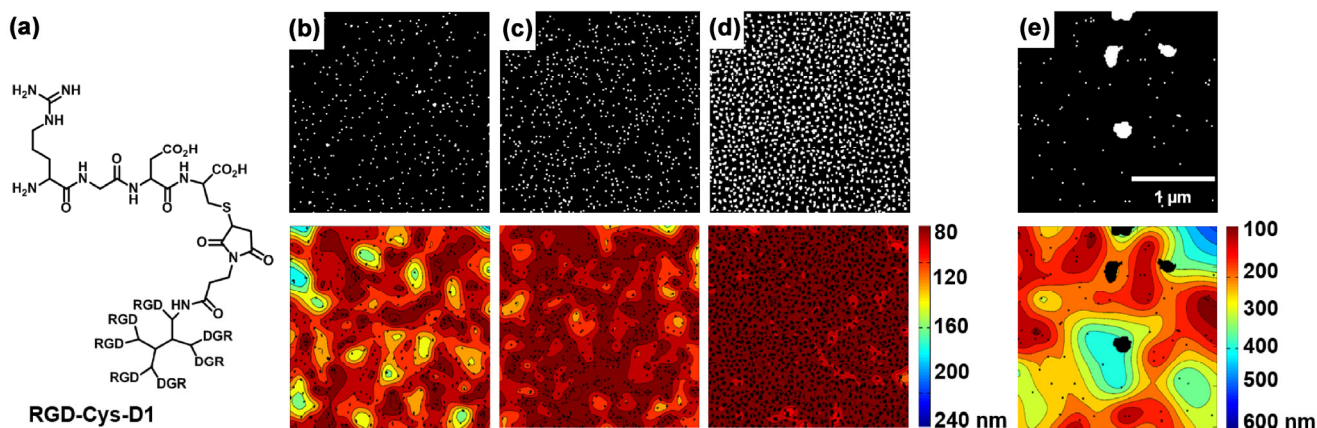


Figure 1 Dendrimer nanopatterning of (a) PAMAM G1-derived dendrimers containing the cell-adhesive moiety of RGD (RGD-Cys-D1). (b)–(e) Representative AFM image thresholds of the nanopatterns on PLLA obtained from initial aqueous solutions of various concentrations, $4 \times 10^{-9}\%$, $10^{-8}\%$, $2.5 \times 10^{-8}\%$, and $10^{-2}\%$ w/w, respectively, and the corresponding minimum interparticle distance probability contour plots, showing high-density RGD regions in dark red (dendrimers and dendrimer aggregates are plotted in black).

Dendrimer nanopattern surface configurations were imaged by AFM in air. For low bulk concentrations, up to $10^{-8}\%$ w/w, isolated dendrimers of 4–5 nm in diameter were obtained (Figs. 1(b) and 1(c), upper row and Figs. S3 and S5(a) in the ESM), whereas patterning from solutions of higher bulk concentrations ($2.5 \times 10^{-8}\%$ – $10^{-2}\%$ w/w) resulted in progressive dendrimer aggregation (Figs. 1(d) and 1(e), upper row and Figs. S3 and S5(b) in the ESM).

The diameter of integrins in the cell membrane is around 10 nm. Therefore, each dendrimer of 4–5 nm in diameter—although providing up to eight copies of the cell-adhesive RGD ligand—resulted in a single site for integrin binding. In this sense, the nanopattern configuration of the dendrimers should be taken as the available RGD distribution for cell adhesion [25]. Since dendrimers are not homogeneously distributed on the surface, the mean inter-dendrimer spacing is not suitable to describe the local RGD density [33]. Instead, the different local RGD density regions on the surface can be visualized if the minimum interparticle distance (d_{\min}), obtained for each particle position in the AFM image thresholds, is plotted in the zeta-direction (Figs. 1(b)–1(e), lower row). Quantification of the obtained d_{\min} probability contour plots revealed that slight variations in the mean interparticle spacing caused an abrupt increase of the surface regions where d_{\min} is below the 70-nm threshold (Table 2) [6–9].

The percentage of dense areas increased from 18%, for surfaces derived from a solution with a $4 \times 10^{-9}\%$ w/w bulk concentration, to 90%, for surfaces derived from a solution with a $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w bulk concentration. However, for the same samples, the mean interligand spacing d only varied from 71 to 58 nm, respectively. In the case of the $10^{-2}\%$ w/w initial bulk concentration, dendrimer aggregation produced highly

heterogeneous samples in terms of ligand distribution; only a small percentage of the surface area included d_{\min} values below the 70-nm threshold, although the maximum RGD density was achieved in some of these regions due to the presence of highly packed dendrimer aggregates (Fig. S5(b) in the ESM).

3.2 Mesenchymal condensation on RGD-Cys-D1 nanopatterns

The maintenance of stem cell populations *in vivo*, as well as their controlled proliferation and the differentiation of their progeny into multiple cellular lineages are affected by signals from the ECM within the stem cell niche [34, 35]. During embryogenesis, prechondrogenic mesenchymal cells that reside within the ECM of the limb bud rearrange into condensed cell aggregates. Cell condensation is a multistep process required for chondrogenic differentiation, which involves cell recruitment to form dense cell condensates, establishment of cell-to-cell communication, and concomitant changes in cell shape [36]. We examined the cell condensation process in adult hMSCs cultured for 1 and 5 days under chondrogenic induction on the RGD-Cys-D1 nanopatterned surfaces (Fig. 2). Pristine PLLA substrates were used as the negative control; without any surface treatment, PLLA shows poor interfacing with living cells [37]. Consequently, cell interactions with nanopatterned surfaces can be attributed solely to the effects of RGD-Cys-D1 without any passivation step that can mask the specific influence of the patterns on cell guidance [38]. PLLA+Fn non-patterned substrates were used as the positive control [26].

Cell condensates could be found from day 1 of chondrogenic induction in all of the substrates, although for PLLA+Fn, the majority of cells appeared as a monolayer culture. Cells in the monolayer evolved to form discrete cell aggregates at day 5, with only some of them already presenting a three-dimensional compacted configuration at this time point (Fig. 2(a) and Fig. S7 in the ESM).

Quantification of the area of the cell condensates showed an increase in size from day 1 to day 5 of chondrogenic induction for all of the substrates, with the largest cell condensates obtained on the nanopatterned surfaces derived from the $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w

Table 2 Mean interparticle spacing versus the percentage of area with d_{\min} values below 70 nm

RGD-Cys-D1 (% w/w)	Mean interparticle spacing d (nm)	Area ($< d_{\min} = 70$ nm) (%)
10^{-2}	133 ± 10	2 ± 2
2.5×10^{-8}	58 ± 1	90 ± 2
10^{-8}	63 ± 8	45 ± 7
4×10^{-9}	71 ± 5	18 ± 11

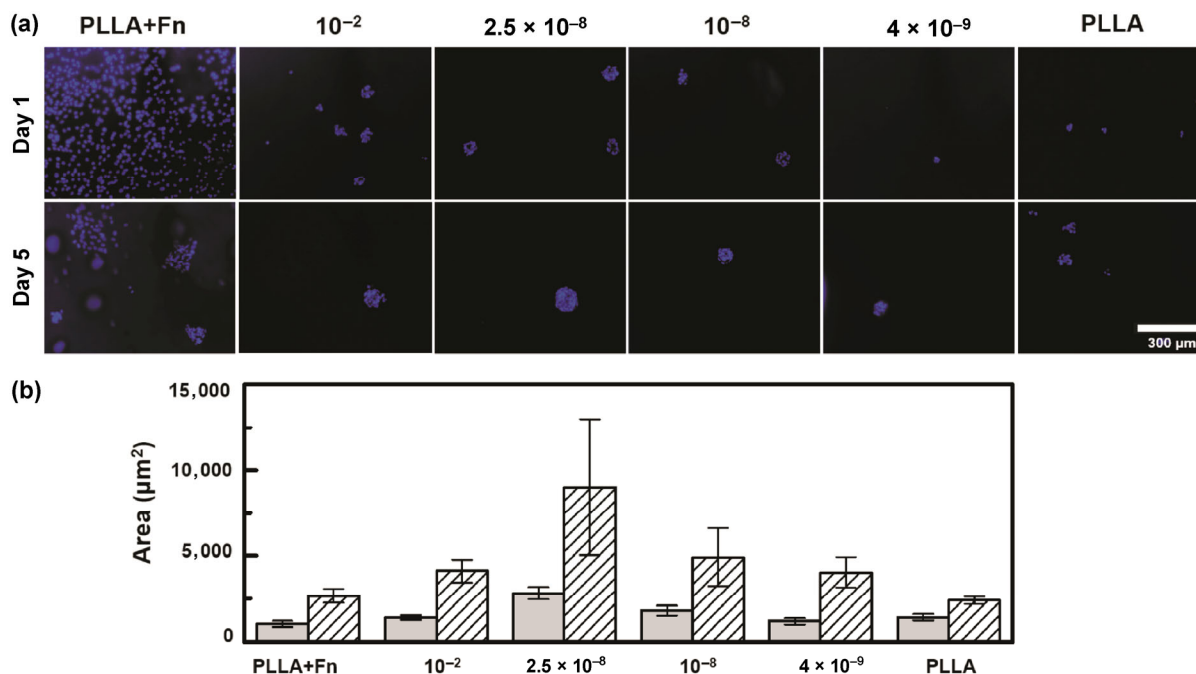


Figure 2 Condensation of adult hMSCs cultured onto RGD-Cys-D1 nanopatterns at days 1 and 5 of chondrogenic induction. Fibronectin-coated (PLLA+Fn) and pristine PLLA are the positive and negative controls, respectively. (a) Representative fluorescent microscopy images of stained cell nuclei (Hoechst) at days 1 and 5, respectively. (b) Area of cell aggregates at day 1 (solid bars) and at day 5 (dashed bars). Values are given as the mean with the standard error.

initial dendrimer concentration (Fig. 2(b)). At both time points, 1 and 5 days of chondrogenic induction, the size of cell condensates progressively increased with a dendrimer concentration up to the maximum at $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w. For the $10^{-2}\%$ w/w concentration with PLLA+Fn substrates, the cell condensate size decreased again.

This clear effect of the substrate on cellular condensation highlights the influence of cell–cell matrix interactions at the early stages of chondrogenic differentiation [39–41]. Cell condensation in chondrogenesis results from active cell movement that causes a local increase of cell density without a corresponding increase in cell proliferation (see Movie S1 in the ESM) [42]. This cell movement will be favored when sufficiently stable adhesions with the substrate are formed to permit traction forces to move the cell body, allowing for the cell to release from the substrate during movement [43]. To test the influence of the local RGD surface density on the adhesion of hMSCs in chondrogenesis, we analyzed the formation of FAs (through paxillin staining) in cells cultured for 1 day under chondrogenic induction on the RGD-Cys-D1

nanopatterned surfaces (Fig. 3 and Fig. S9 in the ESM).

Cells in the PLLA+Fn samples showed spread with well-defined FAs localized at the cell periphery. Paxillin staining from the basal zone of the cell condensates, which contain the cells in direct contact with the substrate, was analyzed for the remaining samples (Fig. 3(a)). In addition, the corresponding three-dimensional surface plots showed that the highest intensity levels for paxillin staining were preferentially allocated on the perimeter limits of the condensates with the increasing dendrimer concentration. The percentage of area stained for paxillin per cell was quantified and compared with the percentage of surface area in the nanopatterns with a d_{min} below the 70-nm threshold (Fig. 3(b)). Arbitrary values of 100% and 0% were assigned to the PLLA+Fn and PLLA control samples. A good correlation was observed with the increase of local RGD surface density up to a $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w initial dendrimer concentration. With only a slight variation in the mean interparticle distance (see Table 2), samples from $4 \times 10^{-9}\%$ w/w to $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w exhibited a significant increase in the percentage of the paxillin-stained area per cell with

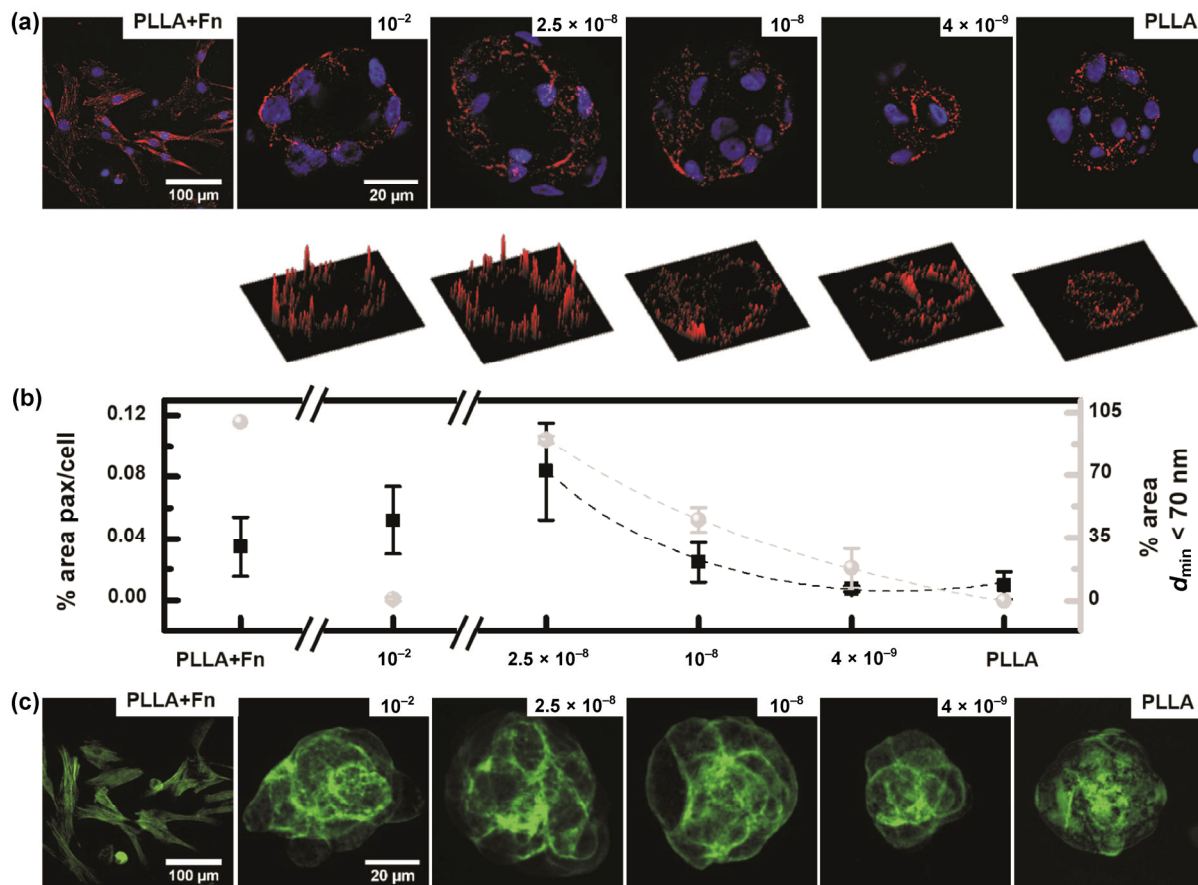


Figure 3 Adhesion of adult hMSCs on the RGD-Cys-D1 nanopatterns evaluated at day 1 of chondrogenic induction. (a) Representative fluorescent microscopy images of spread cells in the PLLA+Fn monolayers and of the basal zone of cell condensates stained for cell nuclei (Hoechst, blue) and FAs (paxillin, red). Below the cell condensates, the corresponding three-dimensional surface plots for paxillin staining highlight the highest intensity values in each image. (b) Plot of the quantification of the percentage of area stained for paxillin per cell compared with the obtained percentage of surface area in the nanopatterns containing d_{min} values below the 70-nm threshold, at each initial dendrimer concentration. Values of 100 and 0 were assigned for the controls PLLA+Fn and PLLA, respectively. (c) Representative confocal z-projections showing the actin (phalloidin, green) cortical organization in the cell condensates obtained on the nanopatterned surfaces.

the increase in local RGD surface density. For the $10^{-2}\%$ w/w initial dendrimer concentration and homogeneously coated PLLA+Fn samples, the obtained percentage of paxillin-stained area per cell decreased and the correlation was lost. In the $10^{-2}\%$ w/w-derived nanopatterns, with only 2% of the surface covered with d_{min} values below 70 nm, the cell condensates were mostly formed at day 1 of chondrogenic induction with 0.05% of the area stained for paxillin per cell. Conversely, homogeneously coated surfaces showed restrained initial cell condensation, and cell monolayers were preferentially formed with 0.03% of the area stained for paxillin per cell. Both cases represent the highest RGD local surface density, either because of

dendrimer aggregation or as a result of the homogeneous coating, thereby promoting a higher degree of maturation of the FAs formed [25]. This should cause impairment of cell recruitment during condensation, as seen for the homogeneously coated PLLA+Fn surfaces. Surprisingly, the $10^{-2}\%$ w/w nanopatterned surfaces permitted cell recruitment to take place during cell condensation. This can be explained in terms of the adhesion site heterogeneity found on the nanopatterned surfaces. This finding is in agreement with the results of Calvalcanti-Adam et al. [9], who showed that different to nanopatterns, homogeneously coated surfaces reinforce the individual molecular interactions in the adhesion patch, which become

mechanically interlinked, so that they behave as a more stable adhesive element. This more stable adhesion with the substrate compared to that obtained in non-homogeneous nanopatterned surfaces could be responsible for the restricted cell recruitment observed on the PLLA+Fn surfaces.

The cytoskeletal morphology in cell monolayers and in the cell condensates was assessed with phalloidin staining (Fig. 3(c)). The confocal z-projections in Fig. 3(c) show that no stress fibers were formed in any of the cell condensates compared with the PLLA+Fn-coated surfaces, and that actin adopted a punctate staining pattern with the cortical configuration typical of chondrogenesis [44].

3.3 Chondrogenic induction of hMSCs on the nanopatterns

Prechondrogenic condensates provide the unique environment for chondrogenic differentiation to proceed. In the condensates, the cells adopt a more rounded morphology and start the synthesis of cartilage-specific ECM molecules such as collagen type II [45]. Staining of COL2A1 after 5 days of chondrogenic induction was positive for all the cell condensates, while the cells in monolayers in the PLLA+Fn samples were negative for COL2A1 immunostaining (Fig. 4(a), left). This result agreed with the concept that cell condensation is a prerequisite for chondrogenic differentiation. Cells and collagen distribution in the cell condensates resembled the zonal organization of articular hyaline cartilage (Fig. 4(b)) [36], with the cells allocated in the superficial zone appearing elongated and positioned with their long axes parallel to the substrate. Thin collagen-stained layers were situated parallel to the long axis of these cells (white arrows in the dashed rectangles of Fig. 4(b)). In the inner zone, the collagen-stained areas were thicker in diameter and sparsely allocated.

Accordingly, the substrates favoring the formation of cell condensates showed higher levels of COL2A1 staining (Fig. 4(c)). Quantification of the percentage of the COL2A1-stained area in the confocal z-projections showed a good correlation with previous mesenchymal cell condensation results on the different substrates: COL2A1 deposition progressively increased to reach a maximum for the $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w-derived nanopatterns,

and was then reduced again for the $10^{-2}\%$ w/w and PLLA+Fn samples. Previous studies on uniformly patterned substrates showed that large nanospacing led to a reduced spreading area and higher chondrogenic induction [13]. Our experiments using dendrimer-based unevenly distributed RGD nanopatterns demonstrate that some degree of flexibility in terms of adhesion should be provided to allow the cells to adhere, as well as to migrate and form the cell condensations from which the differentiation process can proceed [46, 47]. This is in agreement with the proposal that the intermediate cell adhesion state is an adaptive condition for cells undergoing morphogenesis or responding to injury [48].

The accumulation of collagen type II in chondrogenesis is preceded by the appearance of the transcription factor SOX9 [36, 42]. Examination of the SOX9 relative mRNA expression level in 3-day chondrogenic induction cultures of hMSCs on the RGD-Cys-D1 nanopatterns showed that the nanopatterns from the $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w initial dendrimer concentration presented the highest levels of SOX9 mRNA expression (Fig. 4(d)). No significant differences were found in the SOX9 mRNA expression levels for lower dendrimer concentrations and the PLLA control, while nanopatterns derived from the $10^{-2}\%$ w/w initial dendrimer concentration and PLLA+Fn substrates showed expression levels that were significantly below that of the negative control. Furthermore, when the SOX9 mRNA expression level from a conventional pellet system (0.31 ± 0.07) was compared with those obtained on the different nanopatterns, SOX9 was only significantly downregulated in the $10^{-2}\%$ w/w-derived patterns (Fig. S10 in the ESM). Crombrugge and coworkers defined two critical steps of the chondrocyte differentiation pathway sensitive to *Sox9* expression: during the condensation step, and later, preceding the transition of chondrocytes into hypertrophic chondrocytes, in which *Sox9* can function to maintain the chondrocyte phenotype by inhibiting hypertrophic chondrocyte differentiation [49]. Therefore, nanopatterns derived from the $10^{-2}\%$ w/w initial dendrimer concentration, although permitting mesenchymal condensation, will not sustain the chondrogenic hyaline-like phenotype for which SOX9 expression is required [50].

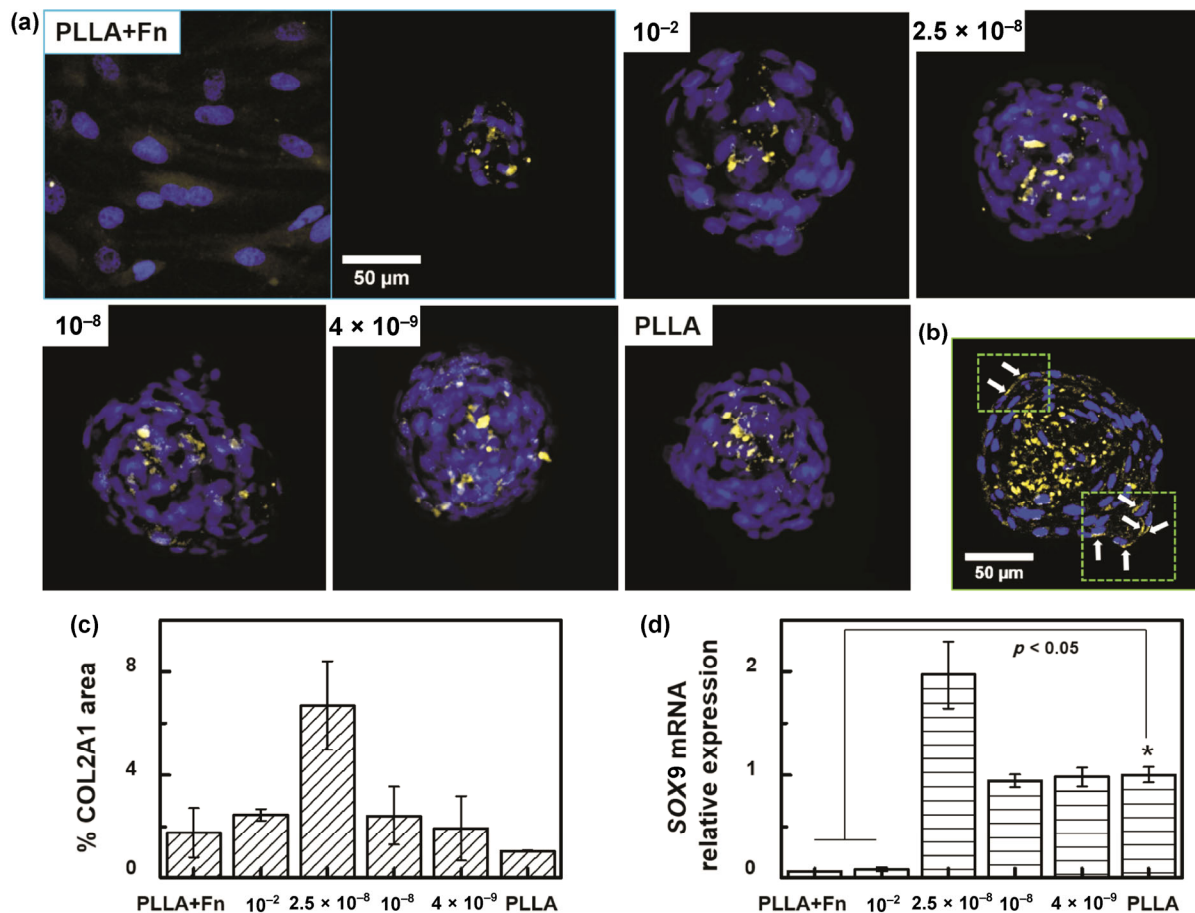


Figure 4 Evaluation of the chondrogenic markers COL2A1 and *SOX9*. (a) Representative confocal z-projections of COL2A1 immunostaining after 5 days of chondrogenic induction, showing COL2A1 (yellow) and cell nuclei (Hoechst, blue). (b) Representative immunofluorescence confocal slice of a cell condensate showing the zonal distribution of COL2A1 immunostaining. Dashed rectangles indicate visible stained thin collagen layers in the superficial zone, while sparsely located thicker collagen areas can be observed in the inner part of the condensates. (c) Plot of the quantification of the percentage of COL2A1-stained areas (normalized against the area of the cell condensate) in the corresponding confocal z-projections of the cell condensates after 5 days of chondrogenic induction. (d) *SOX9* mRNA expression levels (relative to that of PLLA samples) after 3 days of chondrogenic induction. Values are given as the mean with the standard deviation in (c) and (d).

4 Conclusions

Dendrimer nanopatterning has been applied for the study of RGD local density effects in the chondrogenic differentiation of hMSCs on PLLA surfaces. The AFM analysis revealed that the RGD-tailored dendrimers were unevenly distributed on the surface, and tunable local RGD densities were obtained as a function of the initial dendrimer concentration. Probability contour plots for d_{\min} constructed from AFM height images allowed for the quantification of the area percentage containing d_{\min} values below the 70-nm threshold for efficient cell adhesion. Cell experiments demonstrated

that dendrimer-based nanopatterns sustained the mesenchymal condensation and early chondrogenic differentiation of adult hMSCs. The local RGD density, through the cell adhesion process, affected initial cell condensation, thereby conditioning for further differentiation events. The results showed that flexibility in terms of adhesion requires substrates that can provide a sufficiently adherent surface for cell anchorage, but at the same time allow for the facile release for cell migration, favoring condensation and chondrogenic differentiation. In our experiments, an initial dendrimer concentration of $2.5 \times 10^{-8}\%$ w/w, leading to nanopatterns in which 90% of the surface contained d_{\min}

values below 70 nm, resulted in larger cell condensates and enhanced chondrogenic differentiation.

The results obtained herein are relevant for cartilage regeneration, where the direct implantation of stem cells to the injured area commonly leads to fibrogenesis, calcification, and heterotopic tissue formation. Dendrimer-based nanopatterns in biocompatible PLLA, with the appropriate dendrimer configuration described, can serve as efficient cell carriers for stem cell preconditioning before implantation [51].

Acknowledgements

Authors acknowledge Prof. Pau Gorostiza for its help in STM experiments, Albert G. Castaño for his help in d_{\min} quantification, and Dr. David Caballero for his support in microscopy video recording. This work was supported by Networking Biomedical Research Center (CIBER), Spain. CIBER is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008-2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and the Instituto de Salud Carlos III, with the support of the European Regional Development Fund. This work has been financially supported by the Commission for Universities and Research of the Department of Innovation, Universities, and Enterprise of the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1442). This work was funded by the project OLIGOCODES (No. MAT2012-38573-C02) and by the project CTQ2013-41339-P, awarded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. C. R. P. acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness grant (No. IFI15/00151).

Electronic Supplementary Material: Supplementary material (PLLA roughness analysis, water CA measurements, cross sections and height distributions of representative AFM images of the nanopatterns, percentage of d_{\min} values below 70 nm quantification from d_{\min} probability contour plots, STM measurements, confocal image analysis, cell condensation in PLLA+Fn controls, condensate migration movie, confocal z projections for paxillin staining and further details on SOX9 expression analysis) is available in the online version of this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s12274-016-1382-5>.

References

- [1] Jiang, F.; Hörber, H.; Howard, J.; Müller, D. J. Assembly of collagen into microribbons: Effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* **2004**, *148*, 268–278.
- [2] Smith, M. L.; Gourdon, D.; Little, W. C.; Kubow, K. E.; Eguiluz, R. A.; Luna-Morris, S.; Vogel, V. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e268.
- [3] Little, W. C.; Smith, M. L.; Ebnetter, U.; Vogel, V. Assay to mechanically tune and optically probe fibrillar fibronectin conformations from fully relaxed to breakage. *Matrix Biol.* **2008**, *27*, 451–461.
- [4] Christman, K. L.; Enriquez-Rios, V. D.; Maynard, H. D. Nanopatterning proteins and peptides. *Soft Matter* **2006**, *2*, 928–939.
- [5] Falconnet, D.; Csucs, G.; Grandin, H. M.; Textor, M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3044–3063.
- [6] Arnold, M.; Cavalcanti-Adam, E. A.; Glass, R.; Blümmel, J.; Eck, W.; Kantele, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383–388.
- [7] Cavalcanti-Adam, E. A.; Micoulet, A.; Blümmel, J.; Auernheimer, J.; Kessler, H.; Spatz, J. P. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur. J. Cell. Biol.* **2006**, *85*, 219–224.
- [8] Arnold, M.; Schwieder, M.; Blümmel, J.; Cavalcanti-Adam, E. A.; López-García, M.; Kessler, H.; Geiger, B.; Spatz, J. P. Cell interactions with hierarchically structured nano-patterned adhesive surfaces. *Soft Matter* **2009**, *5*, 72–77.
- [9] Cavalcanti-Adam, E. A.; Volberg, T.; Micoulet, A.; Kessler, H.; Geiger, B.; Spatz, J. P. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2964–2974.
- [10] Medda, R.; Helth, A.; Herre, P.; Pohl, D.; Rellinghaus, B.; Perschmann, N.; Neubauer, S.; Kessler, H.; Oswald, S.; Eckert, J. et al. Investigation of early cell–surface interactions of human mesenchymal stem cells on nanopatterned β -type titanium-niobium alloy surfaces. *Interface Focus* **2014**, *4*, 20130046.
- [11] Wang, X.; Yan, C.; Ye, K.; He, Y.; Li, Z. H.; Ding, J. D. Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2865–2874.
- [12] Wang, X.; Ye, K.; Li, Z. H.; Yan, C.; Ding, J. D. Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanospacings. *Organogenesis* **2013**, *9*, 280–286.
- [13] Li, Z. H.; Cao, B.; Wang, X.; Ye, K.; Li, S. Y.; Ding, J. D. Effects of RGD nanospacing on chondrogenic differentiation

- of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5197–5209.
- [14] Wang, X.; Li, S. Y.; Yan, C.; Liu, P.; Ding, J. D. Fabrication of RGD micro/nanopattern and corresponding study of stem cell differentiation. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 1457–1467.
- [15] Stephanopoulos, N.; Freeman, R.; North, H. A.; Sur, S.; Jeong, S. J.; Tatakitti, F.; Kessler, J. A.; Stupp, S. I. Bioactive DNA-peptide nanotubes enhance the differentiation of neural stem cells into neurons. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 603–609.
- [16] Rolland, O.; Turrin, C. O.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. Dendrimers and nanomedicine: Multivalency in action. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1809–1824.
- [17] Saovapakhiran, A.; D'Emanuele, A.; Attwood, D.; Penny, J. Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 693–701.
- [18] Albertazzi, L.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Peripheral functionalization of dendrimers regulates internalization and intracellular trafficking in living cells. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1059–1068.
- [19] Mikhail, A. S.; Jones, K. S.; Sheardown, H. Dendrimer-grafted cell adhesion peptide-modified PDMS. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 938–944.
- [20] Kino-oka, M.; Kim, J.; Kurisaka, K.; Kim, M. H. Preferential growth of skeletal myoblasts and fibroblasts in co-culture on a dendrimer-immobilized surface. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115*, 96–99.
- [21] Lomba, M.; Oriol, L.; Sánchez-Somolinos, C.; Grazú, V.; Moros, M.; Serrano, J. L.; Martínez De la Fuente, J. Cell adhesion on surface patterns generated by the photocrosslinking of hyperbranched polyesters with a trisdiazonium salt. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 499–507.
- [22] Kim, M. H.; Kino-oka, M.; Morinaga, Y.; Sawada, Y.; Kawase, M.; Yagi, K.; Taya, M. Morphological regulation and aggregate formation of rabbit chondrocytes on dendrimer-immobilized surfaces with D-glucose display. *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *107*, 196–205.
- [23] Kim, M. H.; Kino-oka, M.; Kawase, M.; Yagi, K.; Taya, M. Synergistic effect of D-glucose and epidermal growth factor display on dynamic behaviors of human epithelial cells. *J. Biosci. Bioeng.* **2007**, *104*, 428–431.
- [24] Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677–1686.
- [25] Lagunas, A.; Castaño, A. G.; Artés, J. M.; Vida, Y.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Gorostiza, P.; Claros, S.; Andrades, J. A.; Samitier, J. Large-scale dendrimer-based uneven nanopatterns for the study of local arginine-glycine-aspartic acid (RGD) density effects on cell adhesion. *Nano Res.* **2014**, *7*, 399–409.
- [26] Singh, P.; Schwarzbauer, J. E. Fibronectin and stem cell differentiation—Lessons from chondrogenesis. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3703–3712.
- [27] Griffin, M. F.; Butler, P. E.; Seifalian, A. M.; Kalaskar, D. M. Control of stem cell fate by engineering their micro and nanoenvironment. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 37–50.
- [28] Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J. M.; Colchero, J.; Gómez-Herrero, J.; Baro, A. M. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 13705–13713.
- [29] Magalhães, J.; Lebourg, M.; Deplaine, H.; Gómez-Ribelles, J. L.; Blanco, F. J. Effect of the physicochemical properties of pure or chitosan-coated poly(L-lactic acid) scaffolds on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 716–728.
- [30] Boas, U.; Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63.
- [31] Mager, D. M.; LaPointe, V.; Stevens, M. M. Exploring and exploiting chemistry at the cell surface. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 582–589.
- [32] Zelzer, M.; Majani, R.; Bradley, J. W.; Rose, F. R. A. J.; Davies, M. C.; Alexander, M. R. Investigation of cell–surface interactions using chemical gradients formed from plasma polymers. *Biomaterials* **2008**, *29*, 172–184.
- [33] Huang, J. H.; Gräter, S. V.; Corbellini, F.; Rinck, S.; Bock, E.; Kemkemer, R.; Kessler, H.; Ding, J. D.; Spatz, J. P. Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1111–1116.
- [34] Chen, S.; Lewallen, M.; Xie, T. Adhesion in the stem cell niche: Biological roles and regulation. *Development* **2013**, *140*, 255–265.
- [35] Rojas-Ríos, P.; González-Reyes, A. The plasticity of stem cell niches: A general property behind tissue homeostasis and repair. *Stem Cells* **2014**, *32*, 852–859.
- [36] Bobick, B. E.; Chen, F. H.; Le, A. M.; Tuan, R. S. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res. C Embryo Today* **2009**, *87*, 351–371.
- [37] Zhu, Y. B.; Gao, C. Y.; Liu, X. Y.; He, T.; Shen, J. C. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 53–61.
- [38] Takiewicz, W. I.; Seras-Franzoso, J.; García-Fruitós, E.; Vazquez, E.; Ventosa, N.; Peebo, K.; Ratera, I.; Villaverde, A.; Veciana, J. Two-dimensional microscale engineering of protein-based nanoparticles for cell guidance. *ACS Nano* **2013**, *7*, 4774–4784.
- [39] Healy, C.; Uwanogho, D.; Sharpe, P. T. Regulation and role of *Sox9* in cartilage formation. *Dev. Dyn.* **1999**, *215*, 69–78.

- [40] Kumar, D.; Lassar, A. B. The transcriptional activity of *Sox9* in chondrocytes is regulated by RhoA signaling and actin polymerization. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4262–4273.
- [41] Bang, O. S.; Kim, E. J.; Chung, J. G.; Lee, S. R.; Park, T. K.; Kang, S. S. Association of focal adhesion kinase with fibronectin and paxillin is required for precartilaginous condensation of chick mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *278*, 522–529.
- [42] DeLise, A. M.; Fisher, L.; Tuan, R. S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* **2000**, *8*, 309–334.
- [43] Palecek, S. P.; Loftus, J. C.; Ginsberg, M. H.; Lauffenburger, D. A.; Horwitz, A. F. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **1997**, *385*, 537–540.
- [44] Woods, A.; Wang, G. Y.; Beier, F. RhoA/ROCK signaling regulates *Sox9* expression and actin organization during chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11626–11634.
- [45] Kosher, R. A.; Kulyk, W. M.; Gay, S. W. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 1151–1156.
- [46] Lim, Y. B.; Kang, S. S.; Park, T. K.; Lee, Y. S.; Chun, J. S.; Sonn, J. K. Disruption of actin cytoskeleton induces chondrogenesis of mesenchymal cells by activating protein kinase C- α signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 609–613.
- [47] Lim, Y. B.; Kang, S. S.; An, W. G.; Lee, Y. S.; Chun, J. S.; Sonn, J. K. Chondrogenesis induced by actin cytoskeleton disruption is regulated via protein kinase C-dependent p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 713–718.
- [48] Murphy-Ulrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 785–790.
- [49] Bi, W. M.; Huang, W. D.; Whitworth, D. J.; Deng, J. M.; Zhang, Z. P.; Behringer, R. R.; de Crombrughe, B. Haploinsufficiency of *Sox9* results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6698–6703.
- [50] Chen, S.; Fu, P. L.; Cong, R. J.; Wu, H. S.; Pei, M. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis.* **2015**, *2*, 76–95.
- [51] Chen, W.-H.; Lai, M.-T.; Wu, A. T. H.; Wu, C.-C.; Gelovani, J. G.; Lin, C.-T.; Hung, S.-C.; Chiu, W.-T.; Deng, W.-P. *In vitro* stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 450–459.

Video Article

Dendrimer-based Uneven Nanopatterns to Locally Control Surface Adhesiveness: A Method to Direct Chondrogenic Differentiation

Ignasi Casanellas^{1,2}, Anna Lagunas^{3,1}, Iro Tsintzou¹, Yolanda Vida^{4,5}, Daniel Collado^{4,5}, Ezequiel Pérez-Inestrosa^{4,5}, Cristina Rodríguez-Pereira⁶, Joana Magalhaes^{3,6}, Pau Gorostiza^{1,3,7}, José A. Andrades^{8,3}, José Becerra^{8,3,5}, Josep Samitier^{1,3,2}

¹Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST)

²Department of Engineering Electronics, University of Barcelona (UB)

³Networking Biomedical Research Center (CIBER)

⁴Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Department of Organic Chemistry, Universidad de Málaga (UMA)

⁵Andalusian Centre for Nanomedicine and Biotechnology-BIONAND

⁶Unidad de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC), Grupo de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC)

⁷Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)

⁸Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Department of Cell Biology, Genetics and Physiology, Universidad de Málaga (UMA)

Correspondence to: Anna Lagunas at alagunas@ibecbarcelona.eu

URL: <https://www.jove.com/video/56347>

DOI: [doi:10.3791/56347](https://doi.org/10.3791/56347)

Keywords: Bioengineering, Issue 131, Dendrimer, Nanopattern, Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD), Atomic Force Microscopy (AFM), Cell Adhesion, Mesenchymal Stem Cells (Mscs), Chondrogenesis

Date Published: 1/20/2018

Citation: Casanellas, I., Lagunas, A., Tsintzou, I., Vida, Y., Collado, D., Pérez-Inestrosa, E., Rodríguez-Pereira, C., Magalhaes, J., Gorostiza, P., Andrades, J.A., Becerra, J., Samitier, J. Dendrimer-based Uneven Nanopatterns to Locally Control Surface Adhesiveness: A Method to Direct Chondrogenic Differentiation. *J. Vis. Exp.* (131), e56347, doi:10.3791/56347 (2018).

Abstract

Cellular adhesion and differentiation is conditioned by the nanoscale disposition of the extracellular matrix (ECM) components, with local concentrations having a major effect. Here we present a method to obtain large-scale uneven nanopatterns of arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-functionalized dendrimers that permit the nanoscale control of local RGD surface density. Nanopatterns are formed by surface adsorption of dendrimers from solutions at different initial concentrations and are characterized by water contact angle (CA), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and scanning probe microscopy techniques such as scanning tunneling microscopy (STM) and atomic force microscopy (AFM). The local surface density of RGD is measured using AFM images by means of probability contour maps of minimum interparticle distances and then correlated with cell adhesion response and differentiation. The nanopatterning method presented here is a simple procedure that can be scaled up in a straightforward manner to large surface areas. It is thus fully compatible with cell culture protocols and can be applied to other ligands that exert concentration-dependent effects on cells.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/56347/>

Introduction

Here we describe a simple and versatile dendrimer-based nanopatterning procedure to obtain cell culture surfaces that allow the control of local adhesiveness at the nanoscale. Nanoscale details of ECM organization have been reported,^{1,2,3} and the nanopatterning of cell adhesion surfaces has provided deep insights into the cellular requirements related to adhesion^{4,5}. Experiments using micellar lithography-based nanopatterns revealed a threshold value of around 70 nm for RGD peptide nanospacing, cell adhesion being significantly delayed above this value^{6,7,8,9}. These studies also highlighted the greater influence of local than global ligand density on cell adhesion^{9,10,11}.

During morphogenesis, cell interactions with the surrounding environment trigger the first differentiation events, which continue until final complex tissue structures have been formed. Within this framework, nanopatterned surfaces have been used to tackle the influence of the initial cell-surface interactions on morphogenesis. Lithography-based RGD nanopatterns with a lateral spacing of 68 nm in β -type Ti-40Nb alloys help to maintain the undifferentiated phenotype of non-committed stem cells¹², while RGD nanospacings of between 95 and 150 nm enhance the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) towards adipogenic/osteogenic^{13,14,15} and chondrogenic fates¹⁶. Also, self-assembling macromolecules modified with signaling components have been shown to direct cell adhesion and differentiation by providing nanoscale architectural regulation of the signaling cues¹⁷. In this regard, the deposition of dendrimers with cell-interacting moieties in their outer sphere^{18,19,20} onto surfaces has been used to study cell adhesion^{21,22}, morphology^{23,24}, and migration events^{25,26}. Nevertheless, the lack of surface characterization in these studies makes it difficult to establish any correlation between dendrimer surface configuration and cell response.

Dendrimer nanopatterns with liquid-like order and defined spacing can be obtained when dendrimers adsorb to low-charged surfaces from solutions with low ionic strengths.²⁷ On the basis of this property, here we present a method to obtain large-scale uneven nanopatterns of RGD-functionalized dendrimers on low-charged surfaces that permit the nanoscale control of local RGD surface density. Water contact angle (CA), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning probe microscopy techniques (STM and AFM nanopatterns) show that local ligand densities can be adjusted modifying the initial dendrimer concentration in solution. The local RGD surface density is quantified from AFM images by probability contour maps of minimum interparticle distances and then correlated with cell experiments. Compared with other nanopatterning techniques⁴, dendrimer-based nanopatterning is straightforward and can be easily scaled up to large surface areas, thus being fully compatible with cell culture applications. Nanopatterns are used as bioactive substrates to evaluate the effect of the local RGD surface density on cell adhesion²⁸ and on the chondrogenic induction of adult human MSCs²⁹. Our results show that RGD dendrimer-based nanopatterns sustain cell growth and that cell adhesion is reinforced by high local RGD surface densities. In the differentiation experiments, intermediate adhesiveness of cells to the substrates favored MSC condensation and early chondrogenic differentiation. Due to the ease with which dendrimer peripheral groups can be modified, the method described here can be further extended to other ECM ligands that exert concentration-dependent effects on cells.

Protocol

1. Substrate Preparation

1. Annealing 1.4 x 1.1 cm Au(111) on Mica Substrates.

1. Place the Au(111) substrate on a glass-ceramic hob and anneal it with a butane flame for 3 min. Allow the substrate to cool under an argon atmosphere. Repeat this step for each Au(111) substrate.
NOTE: Au(111) substrates should be used immediately after annealing.

2. Preparation of Poly(L-Lactic Acid) (PLLA)-Coated Glass Substrates.

1. Cut and wash the glass slides.
 1. Cut microscopy slides into 18 slides of 1.25 cm x 1.25 cm with a diamond-tip cutter. Make a small indentation on the lower side of each slide, so that the upper and lower sides can be later distinguished.
 2. Wash the slides thoroughly with deionized water followed by 96% ethanol. Allow them to air-dry.
2. Prepare the 2% PLLA solution.
 1. Add 200 mg of PLLA to 10 mL of 1,4-dioxane in a pressure tube. Add a stir bar and close the tube tightly.
 2. Place the pressure tube into a glycerin bath on a hot plate at 60 °C under gentle stirring for 24 h, and then transfer the solution to a 15-mL glass vial.
3. Coating the glass slides with the PLLA solution.
 1. Place the glass slides and the vial with the PLLA solution on a clean hot plate at 60 °C. Make sure to place the slides facing upward and allow them to remain for at least 10 min to reach the necessary temperature.
 2. Prepare the spin coater and set the program specified in **Table 1**.
 3. Place one of the slides face up on the spin coater, using a vacuum system. With a Pasteur pipette, apply 0.25 mL of the PLLA solution to the slide, making sure that the whole surface is covered. Run the coating program. Repeat this step for each slide.

2. Dendrimer Nanopatterning

1. Preparation of RGD-Functionalized Dendrimer (RGD-Cys-D1)²⁸ Solutions.

1. Dissolve 5 mg of the dendrimer in 6.494 mL of deionized water. This is solution A.
NOTE: Use dendrimer stock solution within 6 months of preparation.
2. Sonicate solution A for 10 min and prepare solutions B and C following **Table 2**.
3. Sonicate solution C for 10 min and prepare solutions D, E and F following **Table 2**.
4. Store solutions B, C, D, E and F at 4 °C until use. Solution A can be stored at -20 °C for later use.

2. Nanopatterning of RGD-Cys-D1 Dendrimers on the Substrates

1. In a tissue culture hood, sterilize the substrates by irradiating them with UV light for 13 min.
NOTE: This step is only necessary when nanopatterned substrates are going to be used as cell culture substrates. In this case, maintain the sterile conditions (tissue culture hood, sterile materials, solutions and techniques) for the following steps.
2. Place each substrate face up in the wells of a plate, handling them carefully with tweezers.
3. Sonicate solutions B, C, D, E and F for 10 min.
4. Pass the RGD-Cys-D1 dendrimer solutions through a 0.22- μ m diameter filter using a syringe directly in the wells containing the substrates (2 mL/well). At least three replicas per dendrimer concentration are recommended. Close and seal the plate and leave it at room temperature (RT) for 16 h.
5. Remove and discard the solutions. Wash the substrates with sterile deionized water and dry. Store substrates at 4 °C.
NOTE: The protocol can be paused here.

3. Preparation of Control Substrates

Note: All steps were performed in a sterile tissue culture hood, and only sterile materials, solutions and techniques were used. At least, six control substrates were used (three replicas of the positive control and three replicas of the negative control).

1. In a tissue culture hood, sterilize the substrates by irradiating them with UV light for 13 min.
2. **Control Substrates for Fibroblast Adhesion Experiment.**
 1. Use flame-annealed Au(111) substrates as the negative control. Gold has a well-known protein-denaturation effect that confers anti-cell adhesive properties²⁸. Sonicate all solutions and filter prior to substrate incubation.
 2. For the positive controls, immerse flame-annealed Au(111) substrates in a solution of RGD-modified PEG thiol, Ac-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Asp-NH-ethylene glycol mono-11-mercaptoundecanamide (RGD-PEG-SH)³⁰ and triethylene glycol mono-11-mercaptoundecyl ether (PEG-SH) at a 1:100 molar ratio in 96% ethanol for 16 h at RT.
 3. Wash substrates thoroughly in ethanol and dry them with argon. Store substrates at 4 °C.
3. **Control Substrates for Chondrogenesis.**
 1. Use pristine PLLA substrates as the negative control. Without any surface treatment, PLLA shows poor interfacing with living cells.³¹
 2. For the positive controls, prepare 5 mL of 0.1 mg/mL fibronectin in phosphate-buffered saline (PBS) and incubate each PLLA substrate with 1.6 mL of the fibronectin solution for 1 h at RT.
 3. Remove and discard the fibronectin solution, and wash the substrates with PBS. Store substrates at 4 °C.

4. Surface Characterization

1. **AFM Imaging**
 1. Perform AFM imaging of PLLA substrates for a roughness analysis. Since dendrimers have a diameter of 4-5 nm, roughness values of 1 nm should be obtained for the proper visualization of the nanopatterns. Also, perform AFM imaging of the nanopatterns. In both cases, perform AFM in tapping mode in air.
 2. Select a silicon cantilever with a spring constant $k = 40$ N/m and a resonant frequency $\nu = 300$ kHz and mount it onto the AFM equipment.
 3. Mount the sample on the stage of the atomic force microscope. Depending on the set-up of the apparatus, tuning and imaging specifications may vary. Consult the manufacturer's handbook.
 4. Approach the sample with the tip of the microscope until contact.
 5. To image PLLA for roughness analysis, select at least four representative areas of 20x20 μm per substrate from three independent substrates. To image dendrimer nanopatterns, choose at least three representative images of 5x5 μm per substrate from three independent substrates per condition (initial dendrimer concentration in solution). To avoid damaging the dendrimer layer while imaging, adjust the set point to keep the force at a minimum.
NOTE: The choice of the imaging area also depends on the working range of the piezoelectric scanner. Please consult the instrument manual in this regard.
 6. Process the AFM height images by fitting each scan line to polynomial leveling functions using the proprietary software of the manufacturer of the AFM apparatus, and analyze those from PLLA to calculate surface roughness. Root-mean square (RMS) analysis may provide a suitable option.
2. **Local RGD Surface Density Measurement.**
 1. Obtain the image thresholds of the processed AFM height images to select the dendrimers on the surface.
 2. Determine the particle positions using an image processing software and use them to obtain the minimum interparticle distances (d_{min}).
 3. Plot d_{min} values in z to the corresponding particle positions to obtain the probability contour maps for d_{min} . Adjust the color scale of the plot to visualize the regions of highest local RGD surface density ($d_{\text{min}} < 70$ nm).
 4. Quantify the area of the regions with the highest local RGD surface density using an image processing software. Include the areas of dendrimer aggregates in the calculation.
3. **STM Imaging.**
Note: STM imaging can be performed only for nanopatterns on conductive Au(111) substrates. Measurements are done in air.
 1. Place the nanopatterned substrate in the sample holder of the STM equipment. Check the electrical connection between sample and holder with a tester.
 2. Etch a tip of the selected probe material (*i.e.* Pt 0.8: Ir 0.2) with a diameter that ensures proper fitting on the head of the STM equipment. Etching can be performed either by manual cutting or by electrochemical etching.³²
NOTE: Electrochemical etching renders more symmetric tips.
 3. Mount the tip in the head of the STM equipment and connect the sample.
 4. Set "current" in the feedback channel (in this type of measurement, current will be constant by feedback tuning). Adjust the bias voltage and current set point and scan size to obtain a well resolved image once the tip is engaged.
NOTE: The choice of the imaging area also depends on the working range of the piezoelectric scanner. Please consult the instrument manual in this regard.
 5. Process the STM topographical images by fitting each scan line to polynomial leveling functions using the proprietary software of the manufacturer of the STM apparatus.
4. **CA Measurements.**
 1. Measure CA on the nanopatterned substrates by the sessile-drop method at three different positions on three independent substrates per condition (initial dendrimer concentration in solution) with an optical CA system.
 2. Fill the microsyringe with deionized water and set the parameters in the CA software to produce drops of 1 μL .

3. Place the sample on the stage so that the surface of the sample is clearly visible on the computer for imaging.
4. Move the syringe with the micromanipulator until it gets close to the surface and dispense the drop onto the surface. Record the image immediately after droplet stabilization.
NOTE: In CA measurements, it is very important to control humidity in order to achieve reproducible results.
5. Analyze the CAs measured with the proprietary software of the manufacturer of the CA apparatus. The fitting method can be adjusted to user requirements. The elliptic fitting method can be an option.

5. Cell Culture

NOTE: All steps were performed in a tissue culture hood, and only sterile materials, solutions and techniques were used.

1. Fibroblast Adhesion Experiment.

1. Culture NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts from early passages (< 10) at 37 °C and 4.6% CO₂ atmosphere in basal medium with high glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin and 1% sodium pyruvate (growth medium). T75 flasks for a total seeding of 500,000 cells per flask in 10 mL of growth medium are recommended.
2. Remove old medium with a 10 mL pipette every 2 days and replace with 10 mL of freshly prepared growth medium.
3. Culture cells in the growth medium until they reach around 80% confluence, then remove the medium and add 5 mL of trypsin per flask. To ensure proper cell detachment from the bottom of the flask, maintain the trypsin solution in contact with the cells for 5 min at 37 °C.
4. Add 5 mL of growth medium per flask and collect the cells in a centrifuge tube. Centrifuge the cells at 470 x g for 5 min. Remove the supernatant and resuspend the cell pellet in 10 mL of growth medium. Determine the concentration of cells using a hemocytometer.
5. Transfer the substrates to well plates not treated for tissue culture (non-adherent).
6. Seed the cells on the substrates at a density of 4,000 cells/cm² in growth medium and incubate them for 4.5 h at 37 °C and 10% CO₂ atmosphere.

2. Chondrogenic Induction of MSCs.

1. Culture human MSCs from early passages (<5) at 37 °C and 4.6% CO₂ atmosphere in MSC growth medium. T75 flasks for a total seeding of 500,000 cells per flask in 10 mL of growth medium are recommended.
2. Change medium every 3 days (as described in 5.1.2).
3. Trypsinize cells before 80% confluence is reached, and centrifuge and resuspend them in MSC growth medium (as described in 5.1.3). Determine the concentration of cells using a hemocytometer.
4. Centrifuge the cells again and resuspend them in 10 mL of chondrogenesis-inducing medium.
5. Transfer the substrates from the plates to new well plates not treated for tissue culture (non-adherent). Seed the cells on the substrates at a density of 3,000 cells/cm².
6. Change the chondrogenic medium every 3 days (as described in 5.1.2).

6. Cell Fixation and Immunostaining

NOTE: The following steps can be performed in non-sterile conditions.

1. Remove the media and wash the cells gently with PBS. Fix them by adding a 10% formalin solution for 20 min at RT.
2. Remove the formalin and wash the cells with PBS.
3. Block the free aldehyde groups by adding a 50 mM solution of ammonium chloride (NH₄Cl) in PBS. Leave the cells for 20 min at RT. Remove NH₄Cl solution and wash the cells with PBS.
NOTE: The protocol can be paused here. Store samples in PBS at 4 °C.
4. Remove PBS and permeabilize the cells by adding a 0.1% solution of saponin in the blocking solution (1% albumin in PBS) for 10 min at RT. Wash the cells with PBS and transfer samples to a new well plate.
5. Incubate the cells with a solution of primary antibodies in the blocking solution (**Table 3**) for 1 h at RT. Then, remove the primary antibody solution and wash the cells with PBS.
6. Incubate the cells with secondary antibodies in the blocking solution (**Table 3**) for 1 h at RT.
NOTE: Avoid light exposure.
7. Remove the secondary antibody solution and wash the cells with PBS and dry.
NOTE: The protocol can be paused here. Store the samples in PBS at 4 °C in the dark.
8. Sample mounting for microscope observation: Using a diamond-tip cutter, cut coverslips into 1.25 cm x 1.25 cm. Apply 50 µL of microscopy mounting medium onto the samples and cover them gently with the cut coverslips.
9. Transfer the samples to a convenient recipient, cover it with aluminum foil and store in the dark at 4 °C until observation.

7. Cell Imaging and Data Analysis

NOTE: For opaque Au(111) and thick microslide-based substrates, an upright microscope must be used.

1. Fibroblast Adhesion Experiment.

1. Use an epifluorescence microscope equipped with a digital camera and low (i.e. 10X) and high (i.e. 40X) magnification objectives. Perform measurements in air.
2. Place the sample on the stage and image cell nuclei with the 10X objective using an ultraviolet excitation, longpass emission filter to visualize the Hoechst/DAPI stain.

3. Image cell cytoskeleton and focal adhesions (FAs) with the 40X objective, selecting the microscope filter that matches the corresponding antibody fluorochrome specifications.
 4. For FA quantification, use an image processing software to convert images to 8-bit files. Remove the background and convert images to binary by setting a threshold. Compute at least 30 images per sample and consider FAs from $1 \mu\text{m}^2$ for calculation.
2. **Chondrogenic Induction of MSCs.**
1. Image cell condensates at the initial stages of chondrogenic induction (< 5 days) with an upright epifluorescence microscope equipped with a digital camera and a low (*i.e.* 10X) magnification objective. Use ultraviolet excitation and longpass emission filter to visualize the Hoechst/DAPI stain.
 2. For measuring the condensate area, use an image processing software, convert images to 8-bit files, remove the background and select a threshold that highlights the aggregate contour. Calculate the area of the particles.
 3. Image immunostained samples for FAs, cytoskeleton actin fibers, and cartilage-specific collagen type II alpha 1 (COL2A1) with an upright confocal microscope at high magnification (*i.e.* 40-60X). Collect sections at a representative interval (*i.e.* 0.5–1 μm).
 4. To process the stack, use an image processing software. Convert images to 8-bit files, remove the background, and make them binary by setting a threshold. Treat a minimum of three cell condensates per condition of three independent samples.
 5. Quantify the FA protein stained areas from the basal zone of cell condensates and express them as the corresponding percentage of area divided by the number of cell nuclei in the image.
 6. To measure COL2A1 staining, use confocal z-projections and quantify the sum of the projected area (maximum COL2A1 area per sample). Normalize the area value obtained against the area of the corresponding condensate.

8. Quantitative Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis

NOTE: To prevent RNase contamination, use disposable, sterile plastic ware and wear disposable gloves while handling reagents and RNA. Always use proper microbiological aseptic techniques and use an appropriate decontamination solution to remove RNase contamination from work surfaces and non-disposable items such as centrifuges and pipettes.

1. Isolate total RNA and pulverize it in a RNA disrupter. Treat RNA samples with DNase and convert them into cDNA using a cDNA synthesis kit.
2. Conduct qRT-PCR using primers for the transcription factor SOX9. Beta-2-microglobulin (B2M) and ribosomal protein L13a (RPL13a) can be used as housekeeping genes.
3. Calculate the expression levels and normalize them against the negative control (PLLA).

Representative Results

We present a nanopatterning method that allows surface adhesiveness to be addressed at the nanoscale (**Figure 1**). The chemical structure of RGD-Cys-D1 is shown in **Figure 1A**. Dendrimers were patterned on electrical conductive Au(111) surfaces for high resolution STM characterization. Low dendrimer concentrations in solution (up to $10^{-5}\%$ w/w) rendered isolated dendrimers of 4-5 nm in diameter (**Figure 1B**), while highly packed dendrimer aggregates formed at higher concentrations (**Figure 1C**). AFM surface characterization (**Figures 1D-G**, upper row) revealed that the surface distribution of RGD-Cys-D1 dendrimers can be adjusted as a function of the initial dendrimer concentration in solution. On the probability contour maps for d_{min} , this results in different local RGD nanoscale densities on the surface (**Figures 1D-G**, lower row).

In cell culture experiments, the cell-membrane receptor integrins of around 10 nm in diameter recognized the RGD sequence on the dendrimers periphery. Although eight copies of this sequence were provided per dendrimer, only one dendrimer interacted per integrin due to its size (4-5 nm measured by STM; **Figure 1B**). That is, each dendrimer provided a single site for integrin binding, thereby allowing a direct correlation from dendrimer distribution (as seen in the AFM images) and the RGD distribution available for cell adhesion. Moreover, no significant variations were found in the CA values obtained for the different nanopattern configurations that may influence cell adhesion²⁹. These characteristics make dendrimer nanopatterns on biocompatible surfaces suitable substrates through which modulate and study cell behavior.

Cell adhesion to nanopatterned Au(111) was tested with fibroblasts within the first 24 h of culture (**Figure 2A**) and with MSCs on nanopatterned PLLA (**Figure 2B**). In both cases, the percentage of area stained for the FA protein paxillin (pax) increased progressively with dendrimer concentration, as did local RGD surface density (the percentage of nanopatterned area with d_{min} below the 70-nm threshold for efficient cell adhesion; **Table 4**). For an initial dendrimer concentration of $10^{-2}\%$ w/w and positive controls, the percentage of area stained for pax per cell decreased and the correlation with the percentage of nanopatterned area with $d_{\text{min}} < 70$ nm was lost.

The percentage of surface area occupied by $d_{\text{min}} < 70$ nm (**Figure 1D-G** lower row and **Table 4**) is a good indication of local RGD surface density for nanopatterns up to $10^{-5}\%$ w/w initial dendrimer concentration but not of those up to $10^{-2}\%$ w/w, due to dendrimer aggregation. Aggregation produced highly heterogeneous samples in terms of ligand distribution, with only a small percentage of the surface with d_{min} values below the 70-nm threshold (**Figure 1D** lower row and **Table 4**). XPS results showed that these surfaces present a global RGD density comparable to $10^{-5}\%$ w/w-derived nanopatterns²⁸. This observation indicates that maximum RGD density was achieved in the regions containing dendrimer aggregates and that the percentage of surface area occupied by $d_{\text{min}} < 70$ nm is not representative of the local RGD surface density in this case.

The observation that positive controls (homogeneous coatings) with maximum local RGD surface density did not show the expected increase in cell adhesion can be attributed to a steric hindrance effect. These results indicate that, compared to the corresponding homogeneous surfaces commonly used in cell culture, RGD nanopatterns sustain cell adhesion more efficiently. This finding thus highlights the relevance of local ligand density.

Interactions with the surrounding environment in morphogenesis trigger the first cell differentiation events and propagate them until the establishment of the final complex tissue structures. To evaluate the effects of dendrimer nanopatterns on cell adhesion and differentiation, we

used the chondrogenic induction of MSCs as a model. During chondrogenesis, there is active matrix remodeling, which plays an instructive role in directing cells through the different stages of cartilage formation.

MSCs underwent chondrogenesis on the nanopatterns (Figure 3). Chondrogenic differentiation begins with a cell condensation step, which involves cell recruitment to form dense condensates, the establishment of cell-to-cell communication, and concomitant changes in cell morphology³³. Figure 3A shows that cell condensation occurred in all the substrates and that condensates increased in area with increasing dendrimer concentrations up to 2.5×10^{-8} w/w. The condensate area then decreased again for a dendrimer concentration of 10^{-2} w/w and for the positive control. The cell condensation step in chondrogenesis occurs through active cell movement rather than through an increase in cell proliferation³⁴. This cell movement is favored by flexible adhesion with the substrate: stable adhesions should be formed to permit traction forces to move the cell body, and at the same time, these adhesions should be weak enough to allow cell release from the substrate during movement. Cell condensation is favored by an increase in local RGD surface density up to 2.5×10^{-8} w/w-derived nanopatterns, with a good balance between cell adhesion and cell movement. For 10^{-2} and the positive control, the local RGD surface density was too high, thereby impairing the condensation event.

Chondrogenic differentiation proceeds from prechondrogenic condensates: cells in condensates become more rounded and start the synthesis of cartilage specific markers such as the ECM protein COL2A1 and the transcription factor SOX9^{33,34,35}. Accordingly, substrates with an intermediate adhesiveness, favoring the formation of cell condensates, showed higher COL2A1 staining (Figure 3B) and higher levels of SOX9 mRNA expression (Figure 3C).

Our results highlight the influence of cell-cell matrix interactions during the early stages of chondrogenic differentiation. Such interactions can be easily addressed through dendrimer-based nanopatterns.

Step	Time (s)	Speed (rpm)	Acceleration (rpm/s)
1	5	500	300
2	30	3,000	1,500

Table 1: Spinner program steps used to coat the glass slides with the prepared PLLA solution. A first homogenization step was used at 500 rpm with an acceleration of 300 rpm/s for 5 s. followed by a last step at 3,000 rpm with an acceleration of 1,500 rpm/s for 30 s.

Solution	RGD-Cys-D1 (mg/mL)	RGD-Cys-D1 (mg)	MQ water (μL)
A	0.77	5	6,494
	RGD-Cys-D1 (% w/w)	Solution A (μL)	
B	10^{-2}	779	5,220
C	10^{-5}	0.78	6,000
		Solution C (μL)	
D	2.5×10^{-8}	15.0	5,985
E	10^{-8}	6.0	5,994
F	4×10^{-9}	2.4	5,998

Table 2: Details of the preparation of the RGD-Cys-D1 solutions used. A stock solution of RGD-Cys-D1 dendrimers was prepared at a final concentration of 0.77 mg/mL (solution A), from which solutions B and C were prepared at 10^{-2} and 10^{-5} w/w concentrations. Solution C with a 10^{-5} w/w concentration of RGD-Cys-D1 dendrimer was used to prepare solutions D, E and F at final concentrations of 2.5×10^{-8} , 10^{-8} and 4×10^{-9} w/w, respectively.

	Name	Volume (μL)	Blocking buffer (mL)
Primary mix	Rabbit mAb to pax	65	12.870
	Mouse mAb to COL2A1	32.5	
Secondary mix	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	13	12.961
	Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit	13	
	Hoechst solution	13	

Table 3: Antibody solution preparation. The primary antibody mixture contained monoclonal antibody against pax produced in rabbit diluted 1:200 in the blocking solution with monoclonal antibody against COL2A1 produced in mouse diluted 1:400 in the blocking solution. The secondary antibody mixture contained the cell nuclei stain Hoechst and the secondary antibodies produced in goat against mouse and rabbit respectively (labeled with Alexa Fluor 488 and 568 fluorophores, respectively).

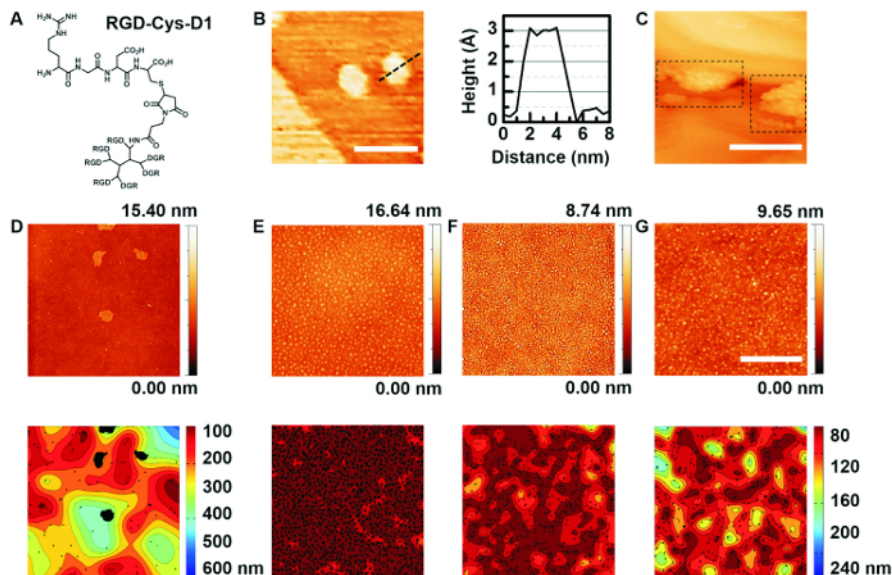


Figure 1: RGD-Cys-D1 dendrimer nanopatterning for the nanoscale control of local RGD surface density. (A) RGD-Cys-D1 dendrimer structure containing up to eight copies of the cell adhesive RGD peptide. Representative STM images (bias = 200 mV, set point = 0.5 nA) of RGD-Cys-D1 nanopatterns on Au(111) from an initial aqueous solution of $10^{-8}\%$ w/w (Scale bar = 3 nm, B) and the corresponding height-distance profile obtained on the dashed region indicated in (B), and (C) of $10^{-2}\%$ w/w showing dendrimer aggregation (Scale bar = 20 nm). (D-G) Representative AFM images of RGD-Cys-D1 nanopatterns on PLLA obtained from the corresponding dendrimer aqueous solutions of $10^{-2}\%$, $2.5 \times 10^{-3}\%$, $10^{-3}\%$ and $4 \times 10^{-3}\%$ w/w, respectively (Scale bar = 1 μm). The corresponding minimum interparticle distance (d_{min}) probability contour map is shown below each AFM image, with high density RGD regions shown in dark red ($d_{\text{min}} < 70$ nm). Dendrimers and dendrimer aggregates are depicted in black for clarity. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

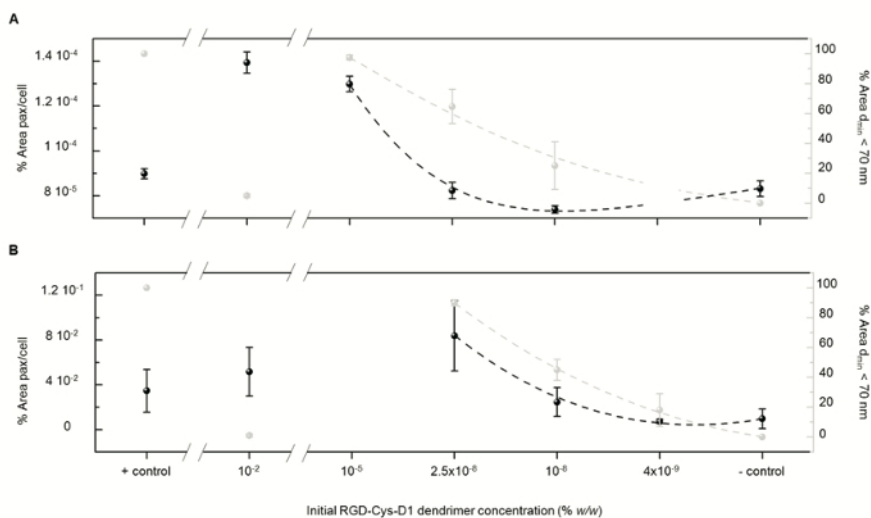


Figure 2: Cell adhesion on the RGD-Cys-D1 nanopatterns. Plot of the percentage of area stained for the FA protein pax per cell for the cells in contact with the substrate (left axis) with initial dendrimer concentration. Values are compared with the local RGD surface density (percentage of surface area in the nanopatterns containing d_{min} values below the 70 nm threshold) (right axis) with 100 and 0 percentages assigned to the positive (+ control) and negative (- control) controls, respectively. (A) Fibroblast adhesion on dendrimer nanopatterns on Au(111) after 4.5 h of culture. (B) MSC adhesion on dendrimer nanopatterns on PLLA evaluated at day 1 of chondrogenic induction. Values are given as the mean with the standard deviation. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

RGD-Cys-D1 (% w/w)	Area (< $d_{\min} = 70$ nm) (%) on Au(111)	Area (< $d_{\min} = 70$ nm) (%) on PLLA
10^{-2}	5 ± 1	2 ± 2
10^{-5}	97 ± 2	
2.5×10^{-8}	65 ± 11	90 ± 2
10^{-8}	25 ± 16	45 ± 7
4×10^{-9}		18 ± 11

Table 4: Percentage of area with d_{\min} values below 70 nm obtained for RGD-Cys-D1 dendrimer deposition on Au(111) and on PLLA surfaces as a function of the initial dendrimer concentrations used.

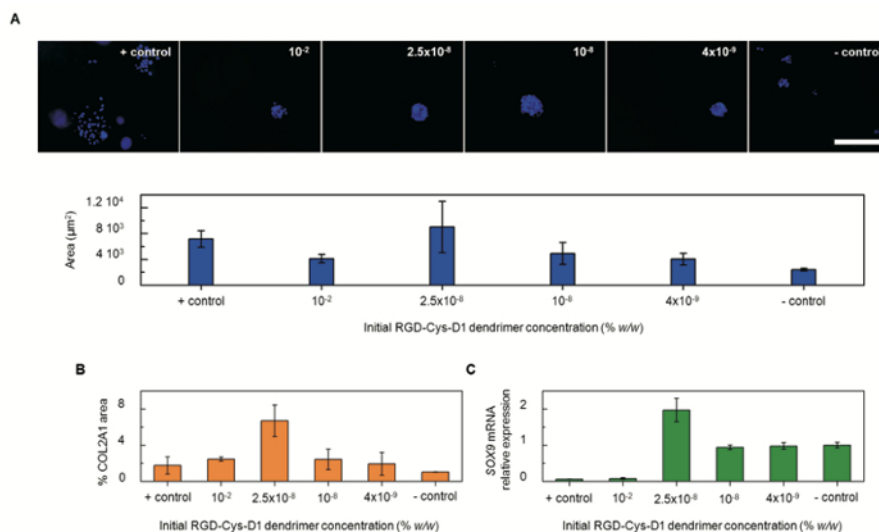


Figure 3: Chondrogenic differentiation of MSCs on the RGD-Cys-D1 nanopatterns. (A) Condensation of MSCs cultured on RGD-Cys-D1 nanopatterns on PLLA after 5 days of chondrogenic induction. Representative epifluorescence images of stained cell nuclei (Hoechst; Scale bar = 300 μm; upper row) and plot of the area of cell condensates (lower row) obtained on RGD-Cys-D1 nanopatterns from different initial dendrimer concentrations. Differentiation proceeds from cell condensation step with the expression of specific chondrogenic markers: **(B)** Percentage of the area of COL2A1 staining normalized with the area of the cell condensate from the corresponding confocal z-projections obtained after 5 days of chondrogenic induction. **(C)** Relative SOX9 mRNA expression (against negative control) after 3 days of chondrogenic induction. Values are given as the mean with the standard deviation in **(B)** and **(C)**. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

During the development of the described protocol, a number of critical steps should be considered. The first refers to nanopattern characterization with scanning probe microscopy techniques. To visualize the nanopatterns, the surface where patterning is produced must have a roughness value below the mean diameter of the dendrimers, which is around 4–5 nm as measured by STM (**Figure 1B**). Also, it should be taken into account that high resolution STM imaging is restricted to conductive substrates, in this case Au(111). Any lifting of the polymer from the corners of the slide after the spin-coating can be rectified using biocompatible glue.

Dendrimer nanopatterning is a process through which to achieve controlled local cell adhesiveness at the nanoscale. Based on the self-assembly of dendrimers on the surface by adsorption, this technique does not require any complex nanopatterning equipment, thus contrasting with previously described lithography-based methods^{36,37,38}. Dendrimer nanopatterning can be easily scaled up to large surface areas and is fully compatible with cell culture protocols.

The dendrimer nanopatterning method described here can find future applications in regenerative medicine. The control exerted by dendrimer nanopatterning on cell adhesiveness makes this technique suitable for the conditioning of biomaterials prior to implantation, thereby facilitating their integration into host tissues. Moreover, the ease with which dendrimer peripheral moieties can be modified makes dendrimer nanopatterning appropriate for other ligands that exert concentration-dependent activity on cells.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The authors acknowledge Oriol Font-Bach and Albert G. Castañó for their help in d_{\min} quantification. They also acknowledge the Advanced Digital Microscopy Unit at the Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) to let the authors record the video in their premises. This work was supported by the Networking Biomedical Research Center (CIBER), Spain. CIBER is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008-2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program, CIBER Actions, and the Instituto de Salud Carlos III, with the support of the European Regional Development Fund. This work has been supported by the Commission for Universities and Research of the Department of Innovation, Universities, and Enterprise of the Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1442). It was also funded by the projects OLIGOCODES (No. MAT2012-38573-C02) and CTQ2013-41339-P, awarded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, in addition to INTERREG V-A Spain-Portugal 2014-2020 POCTEP (0245_IBEROS_1_E). C.R.P. acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness grant (No. IF115/00151).

References

- Jiang, F., Hörber, H., Howard, J., Müller, D. J. Assembly of collagen into microribbons: Effects of pH and electrolytes. *J. Struct. Biol.* **148** (3), 268–278 (2004).
- Smith, M. L., *et al.* Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.* **5** (10), 2243–2254 (2007).
- Little, W. C., Smith, M. L., Ebnetter, U., Vogel, V. Assay to mechanically tune and optically probe fibrillar fibronectin conformations from fully relaxed to breakage. *Matrix Biol.* **27** (5), 451–461 (2008).
- Christman, K. L., Enriquez-Rios, V. D., Maynard, H. D. Nanopatterning proteins and peptides. *Soft Matter.* **2**, 928–939 (2006).
- Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H. M., Textor, M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials.* **27** (16), 3044–3063 (2006).
- Arnold, M., *et al.* Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem.* **5** (3), 383–388 (2004).
- Cavalcanti-Adam, E. A., *et al.* Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur. J. Cell. Biol.* **85** (3–4), 219–224 (2006).
- Cavalcanti-Adam, E. A., *et al.* Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* **92** (8), 2964–2974 (2007).
- Arnold, M., *et al.* Cell interactions with hierarchically structured nano-patterned adhesive surfaces. *Soft Matter.* **5** (1), 72–77 (2009).
- Malmström, J., *et al.* Large area protein patterning reveals nanoscale control of focal adhesion development. *Nano Lett.* **10** (2), 686–694 (2010).
- Deeg, J. A., *et al.* Impact of local versus global ligand density on cellular adhesion. *Nano Lett.* **11** (4), 1469–1476 (2011).
- Medda, R., *et al.* Investigation of early cell–surface interactions of human mesenchymal stem cells on nanopatterned β -type titanium-niobium alloy surfaces. *Interface Focus.* **4**, 20130046 (2014).
- Wang, X., *et al.* Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials.* **34** (12), 2865–2874 (2013).
- Wang, X.; Ye, K.; Li, Z. H.; Yan, C.; Ding, J. D. Adhesion, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells on RGD nanopatterns of varied nanospacings. *Organogenesis.* **9** (4), 280–286 (2013).
- Wang, X.; Li, S. Y.; Yan, C.; Liu, P.; Ding, J. D. Fabrication of RGD micro/nanopattern and corresponding study of stem cell differentiation. *Nano Lett.* **15** (3), 1457–1467 (2015).
- Li, Z. H., *et al.* Effects of RGD nanospacing on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B.* **3** (12), 5197–5209 (2015).
- Stephanopoulos, N., *et al.* Bioactive DNA-peptide nanotubes enhance the differentiation of neural stem cells into neurons. *Nano Lett.* **15** (1), 603–609 (2015).
- Rolland, O., Turrin, C. O., Caminade, A. M., Majoral, J. P. Dendrimers and nanomedicine: Multivalency in action. *New J. Chem.* **33**, 1809–1824 (2009).
- Saovapakhiran, A., D'Emanuele, A., Attwood, D., Penny, J. Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization. *Bioconjug. Chem.* **20** (4), 693–701 (2009).
- Albertazzi, L.; Fernandez-Villamarin, M.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Peripheral functionalization of dendrimers regulates internalization and intracellular trafficking in living cells. *Bioconjug. Chem.* **23** (5), 1059–1068 (2012).
- Mikhail, A. S.; Jones, K. S.; Sheardown, H. Dendrimer grafted cell adhesion peptide-modified PDMS. *Biotechnol. Prog.* **24** (4), 938–944 (2008).
- Kino-oka, M.; Kim, J.; Kurisaka, K.; Kim, M. H. Preferential growth of skeletal myoblasts and fibroblasts in co-culture on a dendrimer-immobilized surface. *J. Biosci. Bioeng.* **115** (1), 96–99 (2013).
- Kim, M. H., *et al.* Morphological regulation and aggregate formation of rabbit chondrocytes on dendrimer immobilized surfaces with D-glucose display. *J. Biosci. Bioeng.* **107** (2), 196–205 (2009).
- Lomba, M., *et al.* Cell adhesion on surface patterns generated by the photocrosslinking of hyperbranched polyesters with a trisdiazonium salt. *React. Funct. Polym.* **73** (3), 499–507 (2013).
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., Griffith, L. G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 10), 1677–1686 (2000).
- Kim, M. H., Kino-oka, M., Kawase, M., Yagi, K., Taya, M. Synergistic effect of D-glucose and epidermal growth factor display on dynamic behaviors of human epithelial cells. *J. Biosci. Bioeng.* **104** (5), 428–431 (2007).
- Pericet-Camara, R., Cahill, B. P., Papastavrou, G., Borkovec, M. Nano-patterning of solid substrates by adsorbed dendrimers. *Chem. Commun.* **3**, 266–268 (2007).
- Lagunas, A., *et al.* Large-scale dendrimer-based uneven nanopatterns for the study of local arginine–glycine–aspartic acid (RGD) density effects on cell adhesion. *Nano Res.* **7** (3), 399–409 (2014).
- Lagunas, A., *et al.* Tailoring RGD local surface density at the nanoscale toward adult stem cell chondrogenic commitment. *Nano Res.* (2017).
- Prats-Alfonso, E., *et al.* Effective and Versatile Strategy for the Total Solid-Phase Synthesis of Alkanethiols for Biological Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2013** (7), 1233–1239 (2013).

31. Zhu, Y. B., Gao, C. Y., Liu, X. Y., He, T., Shen, J. C. Immobilization of biomacromolecules onto aminolyzed poly(L-lactic acid) toward acceleration of endothelium regeneration. *Tissue Eng.* **10** (1-2), 53–61 (2004).
32. Güell, A., Díez-Pérez, I., Gorostiza, P., Sanz, F. Preparation of reliable probes for electrochemical tunneling spectroscopy. *Anal. Chem.* **76** (17), 5218-5222 (2004).
33. Bobick, B. E., Chen, F. H., Le, A. M., Tuan, R. S. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* **87** (4), 351–371 (2009).
34. De Lise, A. M., Fisher, L., Tuan, R. S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* **8** (5), 309–334 (2000).
35. Kosher, R. A., Kulyk, W. M., Gay, S. W. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.* **102** (4), 1151–1156 (1986).
36. Biebricher, A., Paul, A., Tinnefeld, P., Golzhauser, A., Sauer, M. Controlled three-dimensional immobilization of biomolecules on chemically patterned surfaces. *J. Biotechnol.*, **112** (1-2), 97-107 (2004).
37. Tinazli, A., Piehler, J., Beuttler, M., Guckenberger R., Tampé, R. Native protein nanolithography that can write, read and erase. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 220-225 (2007).
38. Oberhansl, S., *et al.* Facile Modification of Silica Substrates Provides a Platform for Direct-Writing Surface Click Chemistry. *Small.* **8** (4), 541-545 (2012).