



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2020- 2021

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudio de la capacidad de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales inmortalizadas cultivadas en dos tipos de biomateriales

Diego Miranda Balbuena

22 de Junio del 2021

Trabajo fin de Máster dirigido por las Doctoras:
Silvia M• Díaz Prado y Ana Rey Rico.

Declaración

El presente Trabajo de Fin de Máster, de título “Estudio de la capacidad de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales inmortalizadas cultivadas en dos tipos de biomateriales” se ha realizado en un marco colaborativo entre el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y el Centro de Investigación Avanzadas de A Coruña (CICA) de la Universidade da Coruña (UDC).

Ambas directoras, Silvia M^a Díaz Prado y Ana Rey Rico, autorizan a la presentación de este trabajo de fin de máster por Diego Miranda Balbuena para ser defendido el día 2 de julio de 2021 ante el tribunal calificador correspondiente.

Índice

Listado de abreviaturas	I
Índice de figuras y tablas.....	III
Resumen	V
Resumo	VI
Abstract.....	VII
1 Introducción.....	1
1.1 El cartílago articular.....	1
1.1.1 Composición y estructura	1
1.1.2 Función.....	2
1.1.3 Integridad del cartílago	3
1.2 La artrosis	4
1.2.1 Prevalencia.....	4
1.2.2 Tratamientos.....	5
1.3 Terapia celular e ingeniería tisular	5
1.3.1 Terapia celular	5
1.3.2 Ingeniería tisular	6
1.4 Biomateriales	6
1.4.1 Criogeles de ácido hialurónico.....	7
1.4.2 Esponjas de colágeno	8
1.5 Células madre mesenquimales	8
1.6 Células madre mesenquimales inmortalizadas	9
2 Objetivos	11
3 Material y métodos	12
3.1 Líneas celulares	12
3.1.1 Línea 127TT <i>iMSCs</i>	12
3.2 Cultivo celular.....	12

3.2.1	Descongelación 127TT <i>iMSCs</i>	12
3.2.2	Proliferación y subcultivo de 127TT <i>iMSCs</i>	13
3.2.3	Obtención del <i>pellet</i> seco	14
3.2.4	Congelación de las células	14
3.3	Obtención de los biomateriales	14
3.3.1	Criogeles de ácido hialurónico.....	14
3.3.2	Esponjas de colágeno	15
3.4	Obtención de los medios de diferenciación condrogénico	15
3.4.1	Medio de preparación propia	15
3.4.2	Medio comercial de Lonza.....	15
3.5	Cultivo celular sobre biomateriales	15
3.5.1	Criogel de ácido hialurónico	15
3.5.2	Esponjas de colágeno	17
3.6	Caracterización histomorfológica	18
3.6.1	Safranina–O	18
3.6.2	Tricrómico de Masson	18
3.6.3	Observación de las tinciones histológicas al microscopio óptico..	18
3.7	Caracterización molecular.....	18
3.7.1	Extracción de ARN	18
3.7.2	Cuantificación del ARN.....	19
3.7.3	Obtención del ADNc	20
3.7.4	Análisis de la expresión génica mediante <i>PCR</i> en tiempo real....	20
3.8	Análisis estadístico.....	21
4	Resultados	22
4.1	Observación del cultivo celular.....	22
4.2	Observación del cultivo sobre los biomateriales	22
4.2.1	Criogeles de ácido hialurónico.....	22

4.2.2	Esponjas de colágeno	23
4.3	Análisis histomorfológico de los cortes de biomateriales	24
4.3.1	Criogel de ácido hialurónico	24
4.3.2	Esponja de colágeno	24
4.4	Análisis de la expresión génica	25
4.4.1	Concentraciones de ARN obtenidas.....	25
4.4.2	Análisis de los niveles relativos de expresión.....	26
5	Discusión.....	28
6	Conclusiones.....	32
7	Perspectivas futuras.....	32
8	Agradecimientos	33
9	Bibliografía	34
10	Anexos	42
10.1	Anexo I.....	42
10.2	Anexo II.....	44
10.3	Anexo III.....	46

Listado de abreviaturas

°C: Grados centígrados.

127TT *iMSC*: 127TT *Immortalized Mesenchymal Stem Cells*, células madre mesenquimales inmortalizadas.

Abs: Absorbancia.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario.

APS: *Ammonium Persulfate*, persulfato de amonio.

ARN: Ácido Ribonucleico.

CICA-INIBIC: Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas - Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña.

CP: *Crossing Point*.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

***hTERT*:** *Human Telomerase Reverse Transcriptase*, transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

***iMSCs*:** *Immortalized Mesenchymal Stem Cells*, células madre mesenquimales inmortalizadas.

MB: Medio Basal.

MEC: Matriz Extracelular.

min: Minutos.

ML: Medio Lonza.

ml: Mililitros.

mm: Milímetros.

MPP: Medio Preparación Propia.

***MSCs*:** *Mesenchymal Stem Cells*, células madre mesenquimales.

Mssn: Tricrómico de Masson.

ng: Nanogramos

OA: *Osteoarthritis*, artrosis.

PCR: *Polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

s: Segundos.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SO: Safranina-O.

t0: tiempo 0. Biomateriales mantenidos 0 días en medio de cultivo.

t21: tiempo 21. Biomateriales mantenidos 21 días en medio de cultivo.

t5: tiempo 5. Biomateriales mantenidos 5 días en medio de cultivo.

TCMR: Grupo de investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa.

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina

TGF- β 3: *Transforming growth factor beta 3*, factor de crecimiento transformante beta 3.

μ l: Microlitros.

Índice de figuras y tablas

Figuras

- Figura 1.** Cartílago de cabeza distal de fémur. (A) La superficie del cartílago es blanca, lisa y brillante. (B) Corte histológico (x40) teñido con Safranina-O, permitiendo observar la distribución de los condrocitos en cada capa del cartílago. Se puede observar cómo las células se alojan en pequeñas cavidades, denominadas condromas o condrones. Recuperado y modificado de (1)..... 1
- Figura 2.** Vista frontal de la articulación de rodilla. Recuperado y modificado de (10)..... 3
- Figura 3.** Esquema de los procedimientos referentes a la descongelación de células, cambio de medio y subcultivo celular. A) Descongelación de células; B) Cambio de medio; C) Desprendimiento de monocapa celular. Realizado desde app.biorender.com 13
- Figura 4.** Esquema referente a la siembra de cada tipo de biomaterial teniendo en cuenta el medio de siembra y tiempo empleados. Realizado desde app.biorender.com 16
- Figura 5.** Mortero empleado para la trituración de las muestras y posterior extracción de ARN. A) Mortero; B) Estado de la esponja de colágeno sembrada tras la trituración..... 19
- Figura 6.** Evolución del cultivo celular de 127TT iMSCs en placa. 1) al 40% confluencia 2) al 50% confluencia 3) al 75% confluencia. El valor de la escala de la imagen es de 100 μm 22
- Figura 7.** Evolución de los criogeles de ácido hialurónico durante el cultivo de estos a diferentes tiempos y con diferentes medios de diferenciación condrogénica..... 23
- Figura 8.** Esponjas de colágeno con diferentes medios y tras 21 días en cultivo. Se pueden apreciar las micromasas celulares y la presencia de MEC en las esponjas t21 MPP y t21 ML..... 23
- Figura 9.** Fotografías con objetivo 10x de los cortes en microtomo del criogel de ácido hialurónico tras su siembra y cultivo a diferentes tiempos en diferentes medios de diferenciación condrogénica y con dos tinciones diferentes: Tricrómico de Masson (Mssn) y Safranina-O (S-O). Escala de 100 μm 24

Figura 10. Fotografías con objetivo 10x de los cortes en microtomo de la esponja de colágeno tras su siembra y cultivo a diferentes tiempos en diferentes medios de diferenciación condrogénica y con dos tinciones diferentes: Tricrómico de Masson (Mssn) y Safranina-O (S-O). Escala de 100 μ m. 25

Figura 11. Niveles relativos de expresión de los genes COL2A1, SOX9 y ACAN frente al gen housekeeping YWHAZ. 27

Tablas

Tabla I. Cebadores empleados en el análisis de la qPCR: Homo sapiens Tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase (YWHAZ), Homo sapiens SRY-box transcription factor 9 (SOX9), Homo sapiens collagen type II alpha 1 chain (COL2A1) y Homo sapiens aggrecan (ACAN). 21

Tabla II. Valores correspondientes a las concentraciones y relaciones de absorbancia obtenidas de las muestras trituradas con mortero. 25

Tabla III. Valores correspondientes a las concentraciones y relaciones de absorbancia obtenidas de las muestras trituradas con molino mezclador MM200. 26

Resumen

Este estudio se ha centrado en evaluar la capacidad condrogénica de una línea celular inmortalizada tras ser cultivada en dos tipos diferentes de biomateriales (criogel de ácido hialurónico y esponja de colágeno) en presencia de diferentes medios de diferenciación condrogénica.

Para ello, se descongelaron células madre mesenquimales inmortalizadas provenientes de una línea celular generada en previos estudios del grupo (127TT *iMSCs*), se cultivaron, expandieron y se sembraron sobre los biomateriales con dos medios de diferenciación condrogénica diferentes. Al cabo de 21 días se realizaron análisis histomorfológicos y de expresión génica para verificar el crecimiento y diferenciación condrogénica de las células.

Los resultados del análisis histomorfológico de las esponjas de colágeno revelaron una adherencia de la línea 127TT *iMSC* a la superficie del biomaterial, proliferación y cierto grado de diferenciación condrogénica y síntesis de matriz extracelular. Sin embargo, los resultados del análisis de la expresión génica no fueron tan esclarecedores.

Se puede concluir que el tamaño de poro y / o composición del criogel de ácido hialurónico no permitió la adherencia de la línea 127TT *iMSC* a la superficie del biomaterial. La esponja de colágeno sí lo permitió, pero futuros estudios y optimizaciones de protocolo serán necesarios para la determinación mediante análisis de la expresión génica de la existencia de una diferenciación condrogénica y síntesis de matriz extracelular.

Resumo

Este estudo centrouse na avaliación da capacidade condroxénica dunha liña celular inmortalizada despois de ser cultivada en dous tipos diferentes de biomateriais (crioxel de ácido hialurónico e esponxa de coláxeno) en presenza de diferentes medios de diferenciación condroxénicos.

Para iso, as células nai mesenquimais inmortalizadas a partir dunha liña celular xerada en estudos previos do grupo (127TT *iMSC*) foron desconxeladas, cultivadas, expandidas e sementadas nos biomateriais con dous medios de diferenciación condroxénicos diferentes. Despois de 21 días, realizáronse análises histomorfolóxicas e de expresión xénica para verificar o crecemento e a diferenciación condroxénica das células.

Os resultados da análise histomorfolóxica das esponxas de coláxeno revelaron unha adherencia da liña 127TT *iMSC* á superficie do biomaterial, proliferación e un certo grao de diferenciación condroxénica e síntese de matriz extracelular. Porén, os resultados da análise da expresión xénica non foron tan iluminadores.

Pódese concluír que o tamaño dos poros e / ou a composición do crioxel do ácido hialurónico non permitiu a adherencia da liña 127TT *iMSC* á superficie do biomaterial. A esponxa de coláxeno si o permitiu, pero serán necesarios futuros estudos e optimizacións de protocolos para a determinación mediante a análise da expresión xénica da existencia de diferenciación condroxénica e síntese de matriz extracelular.

Abstract

This study has focused on evaluating the chondrogenic capacity of an immortalized cell line after being cultured in two different types of biomaterials (hyaluronic acid cryogel and collagen sponge) in the presence of different chondrogenic differentiation media.

For this, immortalized mesenchymal stem cells from a cell line generated in previous studies of the group (127TT iMSCs) were thawed, cultured, expanded and seeded on the biomaterials with two different chondrogenic differentiation media. After 21 days, histomorphological and gene expression analyses were performed to verify the growth and chondrogenic differentiation of the cells.

The results of the histomorphological analysis of the collagen sponges revealed both adherence to the surface of the biomaterial, and proliferation with a certain degree of chondrogenic differentiation and extracellular matrix synthesis of the 127TT iMSC line. However, the results of the gene expression analysis were not so revealing.

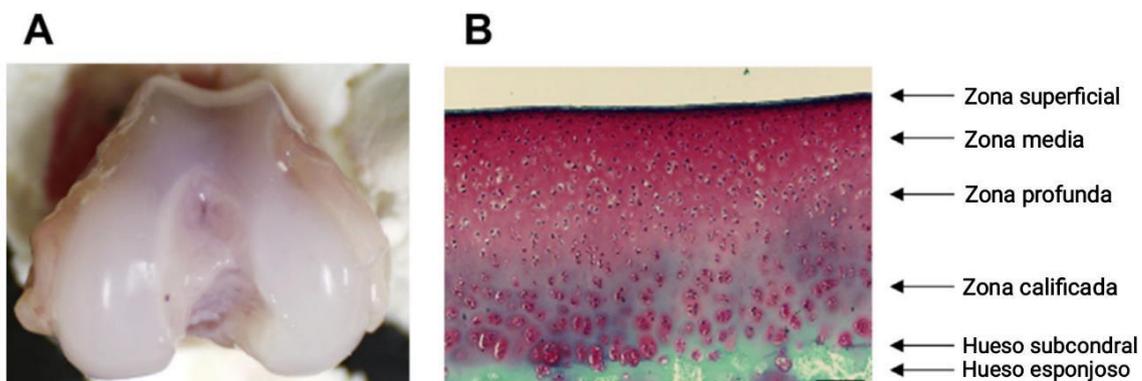
It can be concluded that the pore size and / or composition of the hyaluronic acid cryogel did not allow the adherence of the 127TT iMSC line to the surface of the biomaterial. The collagen sponge did allow it, but future studies and protocol optimizations will be necessary to conclude by gene expression analysis the existence of chondrogenic differentiation and extracellular matrix synthesis.

1 Introducción

1.1 El cartílago articular

El cartílago hialino es el tipo de cartílago más abundante en el cuerpo. En adultos se puede encontrar en los cartílagos costales, en órganos del sistema respiratorio, como en la tráquea; y cubriendo el hueso de las superficies articulares, en cuyo caso hablamos de cartílago articular. El cartílago articular sano de un mamífero adulto joven presenta una superficie lisa, brillante y de color blanco denso (Figura 1), mientras que el color del cartílago articular inmaduro es algo azulado. En animales de edad avanzada, el cartílago se vuelve amarillento (1).

El cartílago articular está formado por una matriz extracelular (MEC), responsable de aportar sus propiedades viscoelásticas, y por condrocitos, encargados de sintetizar la MEC (2). Sin embargo, observamos que la capacidad de autorrenovación de este tejido es extremadamente limitada, principalmente por características inherentes a su composición.



1.1.1 Composición y estructura

Los condrocitos son las células características del cartílago, sin embargo, sólo representan entre el 1-2% del volumen del mismo (3), correspondiendo el resto de este volumen a la MEC. La capacidad de migración y síntesis de MEC por parte de los condrocitos son limitadas. Ningún tipo de cartílago se encuentra inervado ni vascularizado, por lo que las células del tejido se nutren mediante difusión pasiva desde el líquido sinovial y el hueso subcondral (Figura 1).

En la MEC distinguimos dos fases: una fluida y otra sólida. La fase fluida está compuesta por agua (80%) e iones inorgánicos. La fase sólida es porosa y permeable, y está compuesta por diversas moléculas que proporcionan al cartílago resistencia a la tracción y contribuyen a las propiedades físicas de la matriz madura (4–6). Entre estas moléculas, el colágeno y el agregano, son los componentes mayoritarios (6), seguidas de otros constituyentes como glucoproteínas (2). El colágeno le confiere al cartílago sus propiedades viscoelásticas al situarse sus fibras perpendicularmente con respecto a la posición del resto de capas o zonas (Figura 1). El tipo de colágeno más abundante que encontramos en el cartílago de una articulación sinovial es colágeno tipo II. Los proteoglicanos proporcionan elasticidad al cartílago gracias a su capacidad de retener agua por su naturaleza hidrofílica, además de formar agregados con moléculas del ácido hialurónico, un glucosaminoglucano.

El cartílago articular presenta una estructura altamente organizada, la cual se divide en 4 zonas: zona superficial o tangencial, zona media o de transición, zona profunda o radial y zona calcificada (Figura 1) (1). Algunas características varían según la zona. Por ejemplo, la relación colágeno/proteoglicanos es mayor en las zonas superficiales que en las medias o profundas. La distribución y forma de los condrocitos, los cuáles se encuentran alojados en cavidades denominadas condromas o condrones, también difieren según la capa.

1.1.2 Función

El cartílago articular tiene como función principal el proporcionar una superficie lisa y lubricada, que genera una baja fricción y facilita la transmisión de cargas al hueso subcondral subyacente. La superficie del cartílago presenta estas propiedades gracias a los sinoviocitos ubicados en la membrana sinovial. Esto le permite a la articulación soportar fuerzas de contacto elevadas, y dispersar las tensiones de compresión.

Diversos mecanismos de lubricación entran en funcionamiento durante el tiempo de articulación, lo que mantiene la tensión, la fricción y el desgaste bajos cuando las superficies articulares se deslizan unas sobre otras (Figura 2) (1).

1.1.3 Integridad del cartílago

Existen diferentes vías de señalización y biomoléculas, como citoquinas y factores de crecimiento y transcripción, que regulan la función de los condrocitos, mantienen la integridad de la MEC y median la formación de cartílago y hueso, además de conservar constantes las condiciones del medio (homeostasis) (1). Cualquier lesión o proceso degenerativo que perturbe este equilibrio homeostático puede resultar en la detención del crecimiento de los condrocitos y la expresión de genes proinflamatorios y catabólicos (7), haciendo que estos daños sean difíciles de enmendar. Otros factores, como la baja actividad metabólica del tejido o la dificultad de migración de los condrocitos hacia la lesión debida a la presencia de la MEC, explican también su baja capacidad de reparación.

El proceso de reparación natural conduce a la formación de tejido fibrocartilaginoso. Debido a su composición bioquímica (por ejemplo, la presencia de colágeno tipo I en lugar de tipo II), el tejido fibrocartilaginoso no tiene la resistencia y capacidad de deformación bajo cargas, típicas del cartílago hialino (8).

Dada la baja capacidad de regeneración del cartílago existen multitud de estudios clínicos y de investigación enfocados a la reparación de daños en el mismo, ocasionados por lesiones o por patologías como la artrosis (9).

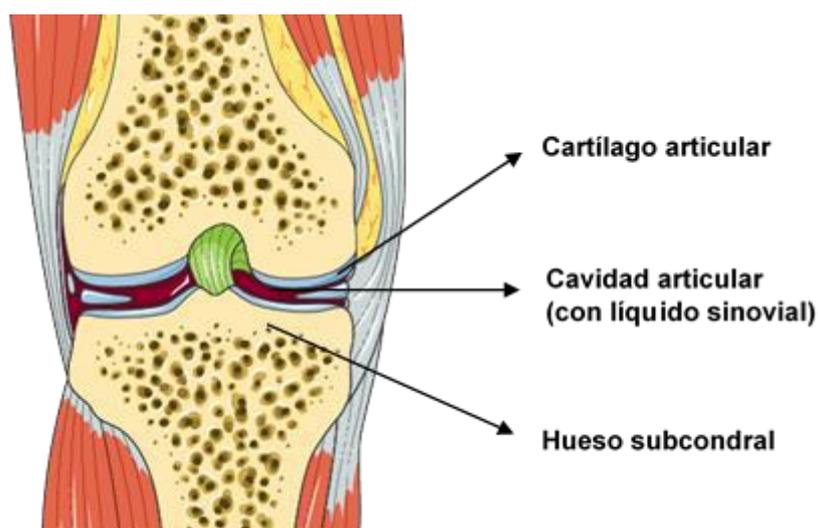


Figura 2. Vista frontal de la articulación de rodilla. Recuperado y modificado de (10).

1.2 La artrosis

La artrosis (OA, *osteoarthritis*) es una enfermedad multifactorial caracterizada por la degradación de la MEC y por la generación de situaciones de estrés en los condrocitos, todo ello originado por lesiones que inducen respuestas de reparación inespecíficas, como son las vías proinflamatorias de la inmunidad innata (11). Se trata de una de las principales causas de discapacidad y disfunción en la población geriátrica (12). En etapas avanzadas de la enfermedad, las características clínicas incluyen varios grados de dolor articular, rigidez, disfunción y deformidad, así como estrechamiento del espacio articular, esclerosis subcondral o endurecimiento de este tejido y formación de osteofitos, es decir, protuberancias óseas producto de calcificación ósea (13).

La OA involucra todas las estructuras de la articulación (Figura 2). Los principales lugares de cambio durante el progreso de la enfermedad se dan en el hueso subcondral, en el líquido sinovial y en la membrana sinovial, todo ello originado por la degradación y pérdida del cartílago. De esta manera, se producen cambios óseos hipertróficos con formación de osteofitos, remodelación del hueso subcondral y, en muchos casos, inflamación crónica de la membrana sinovial (13).

1.2.1 Prevalencia

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes para la aparición y el desarrollo de la OA (7). Sin embargo, la incidencia de lesiones de cartílago también está aumentando en la población más joven debido a la importancia creciente del ejercicio físico en nuestra sociedad (14).

Está documentado que la incidencia y prevalencia de la enfermedad aumenta de 2 a 10 veces al pasar de los 30 a los 65 años y sigue aumentando a partir de ese punto. Hasta los 50 años, la prevalencia de OA en la mayoría de las articulaciones es mayor en los hombres que en las mujeres; sin embargo, después de la edad de 50 años, las mujeres se ven afectadas con mayor frecuencia que los hombres. Se estima que la prevalencia de dolor de rodilla relacionado con la OA en la población adulta española (edad superior a 20 años) es del 10,2% (15).

1.2.2 Tratamientos

Las lesiones del cartílago articular que no afectan a la integridad del hueso subcondral no se reparan espontáneamente. El carácter asintomático de estas lesiones propicia la progresiva degeneración articular y el desarrollo de un proceso artrósico.

Actualmente se sabe que ciertos tratamientos pueden aliviar síntomas como el dolor a corto plazo, por ejemplo, la inyección de esteroides intraarticulares. Otros medicamentos pueden ayudar a frenar la progresión de la OA en etapas tempranas como los inhibidores de catepsina K, los inhibidores de las vías de señalización Wnt, o los factores de crecimiento anabólico, entre otros. Sin embargo, el reemplazo total de la articulación es una de las opciones más viables en las personas con síntomas avanzados y con presencia de daño estructural (16).

Para evitar la necesidad de reemplazo protésico, se han desarrollado distintos tratamientos celulares con el objetivo de formar un tejido de reparación con estructura, composición bioquímica y comportamiento funcional iguales que los del cartílago articular natural (17).

1.3 Terapia celular e ingeniería tisular

1.3.1 Terapia celular

Las terapias celulares tienen como objetivo la regeneración o reparación de un tejido a través del tratamiento con células. Para la reparación del cartílago articular existen diversas opciones, basadas tanto en el implante de condrocitos como de células madre mesenquimales (*MSCs, mesenchymal stem cells*).

1.3.1.1 Empleo de condrocitos en terapia celular

Actualmente, existen diferentes opciones para reparar lesiones del cartílago articular empleando condrocitos, como son el implante de condrocitos autólogos o la mosaicoplastia (18–21). Sin embargo, ambas técnicas implican la escisión de cartílago sano, ya sea para obtener una cantidad suficiente de condrocitos o para extraer los cilindros osteocondrales empleados en la mosaicoplastia. Además, el autotrasplante de condrocitos se encuentra limitado por la edad del paciente (recomendable sólo en pacientes menores de 55 años) (17).

1.3.1.2 Empleo de MSCs en terapia celular

Las MSCs son células no especializadas, primordiales e indiferenciadas con capacidad de auto-renovación a través de la división celular continua y de diferenciación a células del linaje mesodérmico (condrocitos, osteoblastos, adipocitos) (22).

La terapia celular con MSCs se ha convertido en una herramienta de gran interés en diversas aplicaciones de medicina regenerativa (22), en gran parte por propiedades como las descritas en el apartado anterior.

Constituyen una herramienta prometedora de reparación del cartílago cuya aplicación en el ámbito clínico aún es muy reciente. Aunque las estrategias actuales de terapia celular producen mejoras clínicas y funcionales, todavía no es posible generar un tejido de regeneración resistente a la degeneración y con las características del cartílago nativo de la articular (17).

1.3.2 Ingeniería tisular

El campo de la ingeniería tisular tiene como objetivo el reparar o reemplazar tejidos y órganos funcionales dañados por determinadas lesiones o enfermedades. Esta rama de la bioingeniería podría transformar la medicina clínica en los años venideros (23). Dentro de este ámbito, los nuevos enfoques se centran en el uso de andamios biodegradables en combinación con condrocitos o MSCs derivadas de la médula ósea para inducir la regeneración del tejido dañado (24).

Gracias a las aportaciones de campos relacionados, como la ciencia y tecnología de materiales, la nanotecnología, la biología celular y la biología del desarrollo, la ingeniería tisular ha experimentado una evolución considerable en las últimas dos décadas (23). Su desarrollo ha contribuido a generar nuevos biomateriales que se puedan utilizar en la reconstrucción del cartílago y sean degradados posteriormente sin presentar citotoxicidad.

1.4 Biomateriales

La necesidad de replicar la estructura y función de la MEC ante la presencia de diferentes lesiones o patologías ha llevado al desarrollo de biomateriales, componentes críticos de muchas de las estrategias actuales de ingeniería tisular

que permiten recuperar cierta funcionalidad en regiones donde previamente se había perdido.

El mejor biomaterial para un tejido debería ser la propia MEC del tejido objetivo en su estado nativo. Sin embargo, debido a las múltiples funciones, la composición compleja y la naturaleza dinámica de las MECs en tejidos nativos hacen que sea difícil de replicar a la perfección. Se define como andamio al material sobre el que pueden crecer células, diferenciarse, sintetizar matriz y posteriormente ser degradado. Por ello, la función primordial de un andamio en ingeniería de tejidos es imitar las funciones de la MEC nativa (25).

Avances recientes en el diseño de biomateriales incluyen la síntesis de andamios capaces de responder a señales presentes en el entorno local donde se implantan. Entre ellos se encuentran los conocidos como biomateriales inteligentes, que pueden responder a una gran variedad de señales físicas, químicas y biológicas; como temperatura, luz, humedad, potencial redox, pH y/o actividad enzimática (23).

Hay muchos factores importantes que deben tenerse en cuenta al diseñar un biomaterial. Uno de los más importantes es que el sistema sea biodegradable para que el tejido en crecimiento pueda reemplazarlo a medida que se degrada. Otros factores que deben tenerse en cuenta incluyen las propiedades mecánicas, la morfología y la porosidad del biomaterial. Las propiedades también varían según el sitio en el que se vayan a implantar (26).

En el caso de daños articulares, una alternativa prometedora consiste en el empleo de biomateriales porosos, como hidrogeles, criogeles o esponjas de colágeno, que sirvan como andamiaje para que los condrocitos sinteticen una MEC similar a la nativa.

1.4.1 Criogeles de ácido hialurónico

Los hidrogeles son un vehículo de administración de células muy utilizado en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, por características como su elevada capacidad de retención de agua o su alta biocompatibilidad (27). Sin embargo, su reducido tamaño de poro (nanométrico) puede causar limitaciones espaciales que alteren las actividades celulares (28). Una forma de soslayar este

inconveniente implica el uso de criogeles, que debido a su mayor tamaño de poro podrían proporcionar un ambiente más adecuado para el crecimiento celular.

El proceso de fabricación de los criogeles es lo que les aporta su estructura macroporosa y permite un control efectivo sobre el tamaño de los poros, ya que este viene determinado por el tamaño de los cristales de hielo durante su fabricación. Así, los criogeles son sintetizados por criopolimerización, durante la cual se mezcla una solución de polímero con un agente de reticulación y se somete a congelación (29).

Los criogeles de ácido hialurónico son biomateriales con gran potencial para la reparación de cartílago, ya que además de tratarse de uno de los componentes fundamentales de la MEC del cartílago, el ácido hialurónico puede facilitar la adhesión y la migración celular al biomaterial. Tanto condrocitos como *MSCs* pueden encapsularse en el biomaterial resultante (28).

1.4.2 Esponjas de colágeno

Las esponjas de colágeno son un tipo de biomaterial altamente biocompatible y poroso que permite la retención de las células en el mismo, ya que los poros son de menor tamaño que en el caso de los criogeles. De este modo, las esponjas de colágeno constituyen matrices susceptibles a una posterior degradación para la inserción y diferenciación condrogénica (30).

El bajo coste comercial, alta biodegradabilidad y facilidad de retención celular, bajo tamaño de poro y composición rica en colágeno, convierten a las esponjas de colágeno en una herramienta muy práctica para su empleo tanto en clínica como en prácticas experimentales.

1.5 Células madre mesenquimales

Existen diversos criterios para definir qué poblaciones celulares pueden considerarse *MSCs* según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society of Cellular Therapy, ISCT*)(31). Las *MSCs* deben:

- Adherirse al plástico de los frascos de cultivo cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar.

- Expresar marcadores como CD105, CD73 y CD90, y carecer de la expresión de otras moléculas de superficie como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alpha o CD19 y HLA-DR.
- Diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*.

Las terapias celulares basadas en el uso de *MSCs* son opciones terapéuticas atractivas para mejorar la reparación del cartílago, ya que tienen un alto potencial de expansión y de diferenciación a otros linajes celulares. Además, a diferencia del trasplante de condrocitos ya diferenciados, el trasplante de *MSCs* no requiere métodos tan invasivos para su extracción y genera un mejor tejido de reparación (32).

1.6 Células madre mesenquimales inmortalizadas

Las *MSCs* pueden ser transfectadas con diversos genes que induzcan diferentes respuestas como evitar la senescencia (envejecimiento celular), aumentar la velocidad de proliferación celular e incrementar el potencial de diferenciación. A este proceso se le llama inmortalización y a las *MSCs* obtenidas a través de esta técnica se les denomina células madre mesenquimales inmortalizadas (*iMSCs*, *immortalized mesenchymal stem cells*). Son una herramienta muy práctica para las labores de investigación, debido a las características ya mencionadas e inherentes a las propias células.

Las líneas de *iMSCs* pueden obtenerse mediante la represión de las rutas de síntesis de las proteínas p53- y Rb-, ambas involucradas en la supresión de tumores. Este hecho permite mantener la estructura de los telómeros y suprimir así la senescencia y se consigue mediante la transferencia de ciertos genes como: SV40LT, que altera la estructura de las proteínas anteriormente mencionadas; el antígeno E6/E7 del virus del papiloma humano, que promueven la progresión del ciclo celular, y la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (*hTERT*, *human telomerase reverse transcriptase*), la cual previene el acortamiento de los telómeros, ayudando a suprimir la senescencia (33).

Su gran capacidad de diferenciación a diversos linajes celulares las convierte en una herramienta útil para ser empleadas en modelos de síntesis de cartílago o para testear diferentes biomateriales que puedan emplearse en distintos tipos de lesiones.

Durante este trabajo se evaluó el potencial de diferenciación condrogénica y de síntesis de MEC por parte de este tipo de *MSCs* en diferentes biomateriales y condiciones de diferenciación.

2 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la capacidad condrogénica de la línea 127TT *iMSC* y su capacidad de síntesis de MEC cuando es cultivada sobre criogeles de ácido hialurónico y esponjas de colágeno en presencia de diferentes medios de diferenciación condrogénico.

Objetivos específicos

- Evaluar la utilidad de los criogeles de ácido hialurónico y las esponjas de colágeno para ser utilizados como soporte para el crecimiento y diferenciación de *iMSCs*.
- Evaluar la capacidad de diferenciación condrogénica de las *iMSCs* en los diferentes medios de diferenciación condrogénico testados.

3 Material y métodos

El presente estudio cuenta con el informe favorable del Comité de Ética de Investigación de A Coruña-Ferrol (Código de registro: 2016/588 de fecha 22/12/2016 y sus dos posteriores enmiendas de fecha 23/10/2018 y 25/05/2020) (Anexos I, II y III).

3.1 Líneas celulares

3.1.1 Línea 127TT *iMSCs*

La línea 127TT *iMSCs* se obtuvo de estudios previos realizados por el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidade da Coruña (33). Esta línea se generó mediante la represión de proteínas, como p53- y Rb-, y la transfección de genes, como SV40LT, el antígeno E6/E7 y la transcriptasa inversa de la telomerasa humana, en *MSCs* de médula ósea humana.

3.2 Cultivo celular

Las técnicas relacionadas con este apartado se llevaron a cabo en el área de Cultivo Celular del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). La siembra y manipulación se llevó a cabo bajo condiciones estériles en una cámara de flujo laminar.

3.2.1 Descongelación 127TT *iMSCs*

La línea celular empleada se mantuvo congelada a -80°C . Para su descongelación y pase a placas Petri adherentes de 100 mm (P100, Fisher Scientific, España), se centrifugó (Allegra x-22r centrifuge, Beckman Coulter, España) a 1500 rpm durante 5 min, para posteriormente decantar el sobrenadante sin perder el *pellet*. El precipitado se resuspendió en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco™, España) suplementado al 20% con suero bovino fetal (SBF; Gibco™, España), denominado medio DMEM 20%, para ser sembrado en placa (Figura 3, A). Las *iMSCs* plaqueadas se encontraban en el pase 60 después de la inmortalización (127TT (+60)). Las placas se mantuvieron en un incubador a 37°C , en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 (Figura 3).

3.2.2 Proliferación y subcultivo de 127TT *i*MSCs

El medio DMEM 20% se cambió 3 veces por semana para asegurarse de que nunca hubiese demasiada escasez de nutrientes que limitase el crecimiento celular (Figura 3, B). Cuando la confluencia de las células comenzó a ser elevada (superior al 80%), se realizaron subcultivos para así evitar que la escasez de espacio limitase también el crecimiento. Para ello, se retiró el medio DMEM 20% de la placa, se lavaron las células con suero salino y se incubaron con 1 ml de tripsina 0,25% (*Sigma Aldrich Química S.A.*, España) a 37°C. Con el fin de asegurarse de que las células no estaban adheridas a la base de la placa éstas fueron visualizadas al microscopio invertido Eclipse ts100 (*Nikon*, España). A continuación, se añadieron 2 ml de DMEM 20% para inhibir la acción de la tripsina, se trasvasaron las células a un tubo Falcon de 50 ml (*Corning Inc.*, España) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Una vez descartado el sobrenadante, se añadió medio de cultivo fresco y se sembraron las células en nuevas placas (Figura 3, C). Para el recuento celular se empleó una cámara Neubauer (Marienfeld, Alemania).

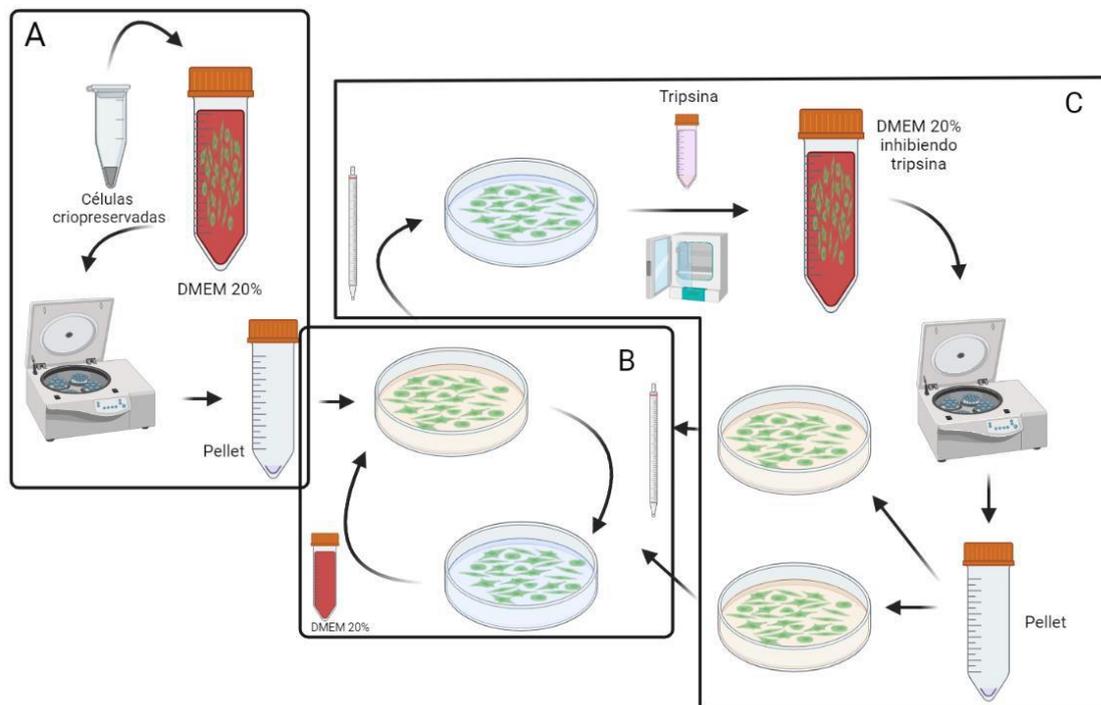


Figura 3. Esquema de los procedimientos referentes a la descongelación de células, cambio de medio y subcultivo celular. A) Descongelación de células; B) Cambio de medio; C) Desprendimiento de monocapa celular. Realizado desde [app.biorender.com](https://www.biorender.com)

3.2.3 Obtención del *pellet* seco

Para la realización de las diferentes técnicas del presente trabajo, como la extracción de ácidos nucleicos, es necesario que las células del cultivo se encuentren lo más libres posible de agentes externos que puedan alterar el proceso o dar lugar a una menor pureza de las muestras. La realización de *pellets* secos es una buena estrategia para este fin. Para ello, se despegaron las células con tripsina y se inhibieron con DMEM 20%. Luego, se contaron con una cámara Neubauer (antes o después de la centrifugación), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en suero salino para repartirlas en tubos Eppendorf (*Eppendorf®*, España). A continuación, se centrifugaron nuevamente a 2000 rpm durante 10 min; se decantó el sobrenadante conservando los *pellets* y se dejaron secar los tubos Eppendorf boca abajo durante unos minutos. Finalmente, los *pellets* celulares se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.2.4 Congelación de las células

Las células fueron desadheridas de forma similar al protocolo de subcultivo celular, contadas y centrifugadas a 1500rpm durante 5 min. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y se conservó el *pellet* resultante. A continuación, se añadió poco a poco la cantidad necesaria del medio de congelación, en función del número de células a congelar y de los viales que se querían preparar. Se repartió el contenido en crioviales (1 ml/vial) y se conservaron las muestras a -80°C.

3.3 Obtención de los biomateriales

3.3.1 Criogeles de ácido hialurónico

El criogel de ácido hialurónico fue elaborado por el Grupo de investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) de la agrupación estratégica CICA-INIBIC (34).

Los criogeles se prepararon por metacrilación de ácido hialurónico (*Hyaluronic acid sodium salt from Streptococcus equi*, *Sigma-Aldrich*, EE. UU.) y posterior polimerización radicalaria a bajas temperaturas. Para iniciar la polimerización se añadieron persulfato de amonio (*APS*, *Sigma-Aldrich*, EE. UU.) y N, N, N', N'-

Tetrametiletilendiamina (*TEMED*, *Sigma-Aldrich*, EE. UU.), para a continuación mantener la muestra a -20°C en un molde de silicona durante 20 horas.

3.3.2 Esponjas de colágeno

Las esponjas de colágeno tipo I fueron facilitadas por la empresa Opocrin S.P.A (Modena, Italia). Estas esponjas fueron diseñadas a partir de colágeno tipo I obtenido de tendón de Aquiles equino (35).

3.4 Obtención de los medios de diferenciación condrogénico

3.4.1 Medio de preparación propia

El medio de preparación propia (MPP), se trata de un medio de diferenciación condrogénico elaborado por el Grupo de investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa (TCMR) de la agrupación estratégica CICA-INIBIC.

Este medio consiste en DMEM 10% suplementado con 10 µl/ml de penicilina-estreptomicina, 1 µl/ml de dexametasona, 2,5 µl/ml de ácido ascórbico, 10 µl/ml de piruvato de sodio, 10 µl/ml de insulina-transferrina-selenio A y 0,1 µl/ml del factor de crecimiento transformante β -3 (*TGF β -3*) (100 µg/ml). A este medio lo denominaremos medio Lonza (ML).

3.4.2 Medio comercial de Lonza

El medio de diferenciación condrogénico comercial utilizado fue el Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Basal Medium (Lonza, Biowhittaker, Bélgica), suplementado con 1 µl/ml de *TGF β -3* (10 µg/ml) (Stemcell Technologies, España).

3.5 Cultivo celular sobre biomateriales

3.5.1 Criogel de ácido hialurónico

3.5.1.1 Agrupación de las 127TT *iMSCs*

Se desprendieron las monocapas de 127TT *iMSCs* con tripsina en el pase número 71, obteniendo un total aproximado de 13 millones de células y queriendo sembrar un millón por biomaterial. El millón de células sobrantes se empleó para la obtención de un *pellet* seco.

3.5.1.2 Siembra y cultivo de biomateriales

En una placa de cultivo de doce pocillos (Falcon) se depositaron las doce unidades del criogel de ácido hialurónico, de aproximadamente 1,25 cm² de

superficie y ≈ 1 mm de espesor, lo que dio lugar a tres réplicas de cada una de las siguientes condiciones: biomateriales con células sembradas en DMEM 10% (medio basal, MB) a tiempo 0 (t0); biomateriales con células mantenidos en cultivo durante 21 días en DMEM 10% para evitar que las *iMSCs* se diferenciasesen a condrocitos (t21 MB); biomateriales con células mantenidos en cultivo durante 21 días con el medio MPP (t21 MPP), y biomateriales con células mantenidos en cultivo durante 21 días en ML (Figura 4). Los biomateriales a t21 fueron fotografiados durante la duración del experimento para observar los posibles cambios de morfología de los criogeles en cultivo.

Una vez depositados los biomateriales sobre los pocillos de la placa de cultivo, se procedió a la siembra de las células a razón de un millón de 127TT *iMSCs* por cada unidad de material. A los biomateriales que se seleccionaron para las condiciones t0 y t21 MB se les añadieron 2 ml de medio DMEM 10%. A los materiales que se seleccionaron para la condición t21 MPP se les añadieron 2ml de MPP. Por último, a los biomateriales que se seleccionaron para la condición t21 ML se les añadieron 2ml de ML. Un volumen de 2 ml de medio de cultivo fue suficiente para que los biomateriales quedasen cubiertos por completo. Los medios de cultivo fueron reemplazados cada dos días en cada uno de los pocillos.

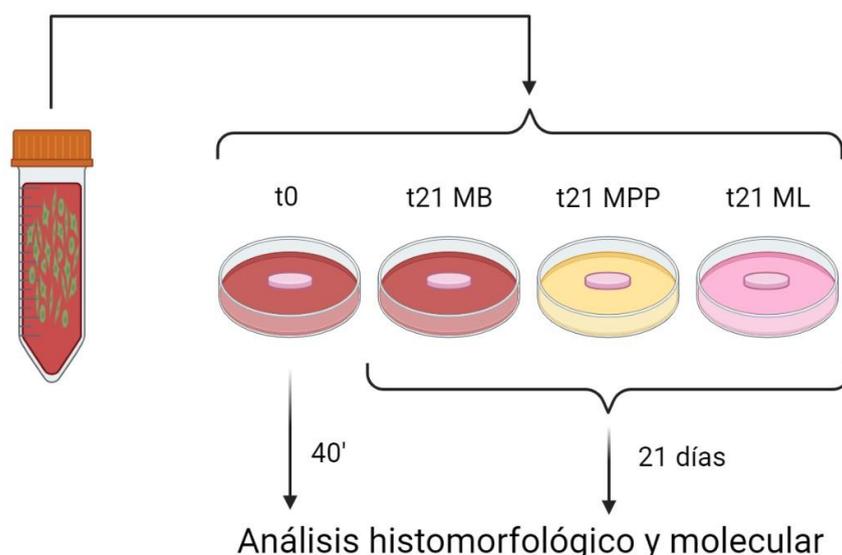


Figura 4. Esquema referente a la siembra de cada tipo de biomaterial teniendo en cuenta el medio de siembra y tiempo empleados. Realizado desde app.biorender.com

Para los biomateriales a t0, las células se sembraron sobre los criogeles de ácido hialurónico y se dejaron adherir durante 3 horas, añadiendo MB en caso de que se observase que los criogeles quedasen secos. Tras la adhesión se retiraron los biomateriales y se procesaron para el análisis morfológico y molecular. Para los biomateriales a t21 (MB, MPP y ML), las células se sembraron sobre los andamios y éstos se dejaron en cultivo hasta los 21 días. Transcurrido este tiempo se retiraron y se procesaron para el análisis morfológico y molecular.

3.5.2 Esponjas de colágeno

3.5.2.1 *Agrupación de las 127TT iMSCs*

Se realizó el desprendimiento de la monocapa de la línea de 127TT *iMSCs* con tripsina obteniendo un total aproximado de 8 millones de 127TT *iMSCs*. Las células se resuspendieron en el volumen adecuado para sembrar medio millón por biomaterial.

3.5.2.2 *Siembra y cultivo de biomateriales*

En una placa de doce pocillos (Falcon, España) se depositaron nueve unidades del biomaterial ($\approx 0,5 \text{ cm}^2$ de superficie y $\approx 0,5 \text{ mm}$ de espesor) sujeto a estudio, los nueve biomateriales fueron cultivados durante 21 días (t21). Tres réplicas se cultivaron en DMEM 10% para evitar que se diferenciases a condrocitos (t21MB), tres en MPP (t21 MPP) y otras tres en ML (t21 ML) (Figura 4).

Una vez depositados los biomateriales sobre los pocillos, se sembró medio millón de células por biomaterial. En los biomateriales t21 MB se añadió 1 ml de medio DMEM10%, en los soportes t21 MPP se añadió 1 ml de MPP y en los andamios t21 ML se añadió 1 ml de ML. La cantidad de 1 ml de medio fue suficiente para que los biomateriales de colágeno quedasen cubiertos por completo. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días.

En los soportes a t0, las células se cultivaron con DMEM10% en los biomateriales durante 40 min para permitir su adhesión. Transcurrido este tiempo los biomateriales se retiraron y se procesaron para el análisis histomorfológico y molecular. En los soportes a t21, las células se cultivaron sobre los soportes 21

días, transcurrido este tiempo, los biomateriales se procesaron para el análisis histomorfológico y molecular.

3.6 Caracterización histomorfológica

La caracterización histomorfológica se realizó en los Servicios Centrales de Histomorfolología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Se realizó la inclusión en parafina y cortes en microtomo de los biomateriales para obtener capas transversales de 4 μm de grosor de los biomateriales y realizar posteriormente las tinciones Safranina-O (SO) y Tricrómico de Masson (Mssn).

3.6.1 Safranina–O

La tinción de Safranina-O se empleó con la finalidad de detectar la presencia de proteoglicanos, ya que este colorante los tiñe de un color rojo característico. De esta forma se puede verificar si las células adheridas al biomaterial han sintetizado una MEC rica en proteoglicanos.

3.6.2 Tricrómico de Masson

El Tricrómico de Masson se utilizó para detectar principalmente la presencia de fibras de colágeno, teñidas de un color azulado, en los cortes. De esta forma se puede comprobar si las células han sintetizado una MEC rica en colágeno.

3.6.3 Observación de las tinciones histológicas al microscopio óptico

Las tinciones histológicas se observaron en un microscopio Olympus BX61 (*Olympus*, España) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (*Olympus*, España).

3.7 Caracterización molecular

Este procedimiento se realizó únicamente en las esponjas de colágeno, debido a la escasa presencia de células detectada en las tinciones correspondientes al criogel de ácido hialurónico.

3.7.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN (ácido ribonucleico) se realizó un primer paso de troceado de los biomateriales y la reducción a fragmentos aún más pequeños aplicando dos métodos diferentes:

- Trituración de las esponjas con un mortero (Figura 5).
- Ejerciendo fricción con bolas de circonio en tres ciclos de 5 min en un molino mezclador MM200 (*Retsch*, España).

Para ambos protocolos la muestra se congeló en N₂ líquido, con la finalidad de evitar la degradación del ARN en el proceso y facilitar la trituración.

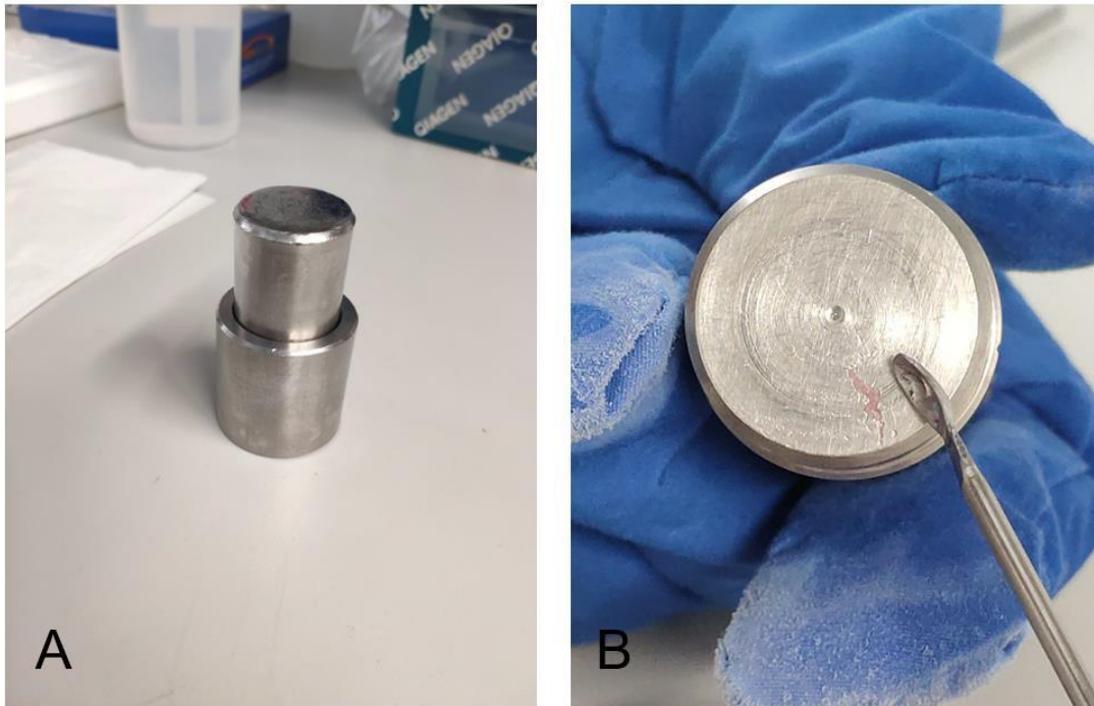


Figura 5. Mortero empleado para la trituración de las muestras y posterior extracción de ARN. A) Mortero; B) Estado de la esponja de colágeno sembrada tras la trituración.

A continuación, se aisló el ARN de estos agregados célula-biomaterial empleando Reactivo TRIzol (*Thermo Fisher Scientific*, España) y cloroformo (*Sigma-Aldrich Química*, España), precipitando con isopropanol (*Sigma-Aldrich Química*, España) y guanidina (*Sigma-Aldrich Química*, España) y, finalmente, lavando con etanol (*Sigma-Aldrich Química*, España).

3.7.2 Cuantificación del ARN

Para determinar la concentración y pureza del ARN de las muestras obtenidas se hicieron mediciones de la absorbancia (Abs) a 280 nm, 260 nm y 230 nm en el espectrofotómetro *NanoDrop* (*ND-1000*, *Thermo Scientific*, España). Los resultados de concentración, Abs 260/280 y Abs 260/230 se obtuvieron con el programa informático *Nanodrop 1000* 3.7.1. Estas relaciones de absorbancias se emplearon para determinar la posible contaminación de las muestras con

proteínas y/o solutos orgánicos, teniendo en cuenta que el valor óptimo en el ARN para la relación 260/280 es 1,8 y para la 260/230 es 1,8-2,2.

3.7.3 Obtención del ADNc

Se empleó una *RT-PCR* (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) con la finalidad de retrotranscribir el ARN de la muestra en ADNc (Ácido Desoxirribonucleico Complementario) mediante una retrotranscriptasa para amplificar posteriormente este ADNc resultante.

La síntesis de ADNc se realizó en un termociclador (*GeneAmp PCRSystem 9700*, *Applied Biosystems*, España) con el *kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen*), utilizando como cebadores OligodTs y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.7.4 Análisis de la expresión génica mediante *PCR* en tiempo real

La *qPCR* o *PCR* en tiempo real es una técnica empleada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto (amplicón) obtenido a lo largo del tiempo. Además, permite comprobar mediante la comparación de las *T_m* (*melting temperature*, temperatura de *melting*) la naturaleza del producto amplificado.

Las condiciones del programa empleado consistieron en: 10 min de incubación a 95 ° C, 50 ciclos de amplificación (10 s a 95 ° C, 5 s a 60 ° C y 10 s a 70 ° C), un ciclo de fusión (5 s a 95 ° C, 1 min a 65 ° C y hasta 97 ° C a 0,03 ° C / s) y 20 s de enfriamiento a 40 ° C.

El ADNc se cargó en una placa de 96 pocillos (*Roche*, Alemania) junto con *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (*Roche*) y los cebadores específicos:

- Los genes *SOX9* (*Homo sapiens SRY-box transcription factor 9*), *COL2A1* (*Homo sapiens collagen type II alpha 1 chain*) y *ACAN* (*Homo sapiens aggrecan*) (Tabla I) fueron seleccionados como indicadores de la diferenciación a condrocitos, ya que su expresión es característica de este tipo celular y está relacionada con la síntesis de MEC.
- El gen *housekeeping YWHAZ* (*Homo sapiens Tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase*) (Tabla I) se seleccionó como gen de referencia.

Tabla 1. Cebadores empleados en el análisis de la qPCR: *Homo sapiens* Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase (YWHAZ), *Homo sapiens* SRY-box transcription factor 9 (SOX9), *Homo sapiens* collagen type II alpha 1 chain (COL2A1) y *Homo sapiens* aggrecan (ACAN).

Gen	Secuencia de referencia	Cebador forward 5'→3'	Cebador reverse 5'→3'
YWHAZ	NM_003406.3	GATCCCCAATGCTTCACAAG	TGCTTGTTGTGACTGATCGAC
SOX9	NM_000346.4	GTACCCGCACTTGCAACAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC
COL2A1	NM_033150.3	TGGTGCTAATGGCGAGAAG	CCCAGTCTCTCCACGTTACAC
ACAN	NM_001135.4	CGGTCTACCTCTACCCTAACCA	GAGAAGGAACCGCTGAAATG

3.8 Análisis estadístico

Para realizar los cálculos se empleó el programa Excel (Office 365, versión 16.49.21050901), obteniendo las medias, las desviaciones estándar y la comparación de medias (t de Student) de los niveles relativos de expresión (NRE).

Los NRE de los genes estudiados se calcularon a partir de los valores de *CP* (*crossing point*), ciclo de la qPCR en donde se comienza a detectar fluorescencia para cada una de las muestras, obtenidos y posteriormente normalizados con respecto al valor del *CP* del gen de referencia YWHAZ utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (36).

4 Resultados

4.1 Observación del cultivo celular

Al descongelar la línea 127TT *iMSCs* se observó la morfología fibroblástica con proyecciones citoplasmáticas típica de las MSCs (Figura 6).

La evolución del cultivo de las 127TT *iMSCs* transcurrió sin ningún problema grave, incrementando éstas progresivamente su confluencia hasta el momento del desprendimiento de la monocapa celular.

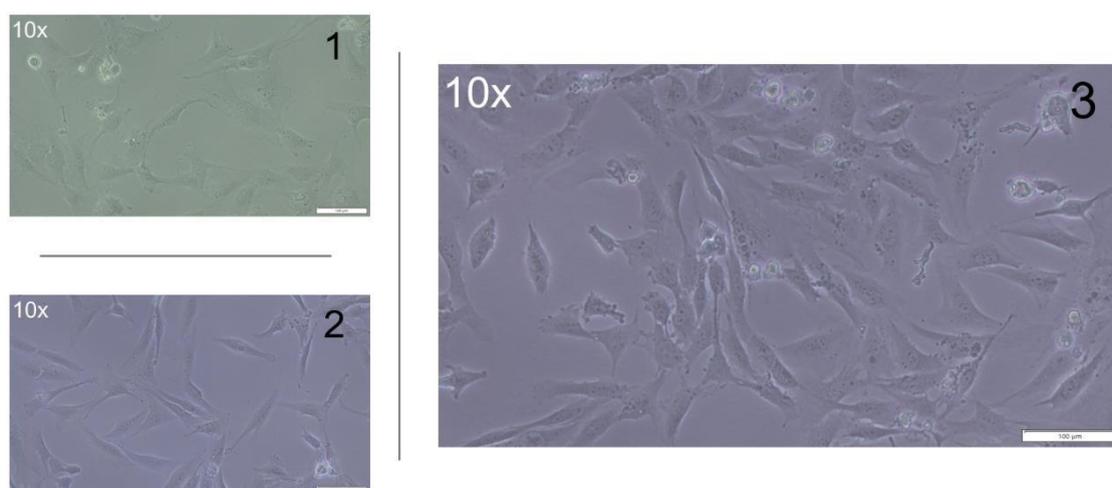


Figura 6. Evolución del cultivo celular de 127TT *iMSCs* en placa. 1) al 40% confluencia 2) al 50% confluencia 3) al 75% confluencia. El valor de la escala de la imagen es de 100 μm .

4.2 Observación del cultivo sobre los biomateriales

4.2.1 Criogel de ácido hialurónico

Con respecto al criogel de ácido hialurónico se observó un cambio sustancial en el tamaño al sembrar sobre el mismo y tras la adición de los diferentes medios en la placa (Figura 7). A lo largo de los 21 días de cultivo no se apreció ningún cambio en la textura, forma o tamaño del biomaterial (Figura 7).

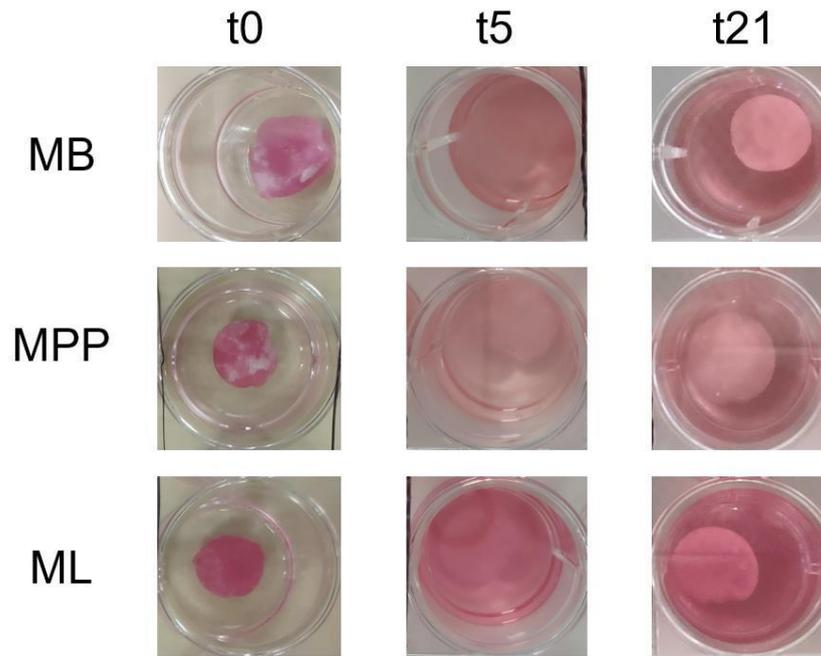


Figura 7. Evolución de los criogel de ácido hialurónico durante el cultivo de estos a diferentes tiempos y con diferentes medios de diferenciación condrogénica.

4.2.2 Esponjas de colágeno

Las esponjas de colágeno no modificaron apenas su tamaño al cultivar las 127TT *iMSCs*. Sin embargo, durante el período de cultivo sí que fueron adquiriendo una consistencia más sólida a medida que progresaban los días (Figura 8).

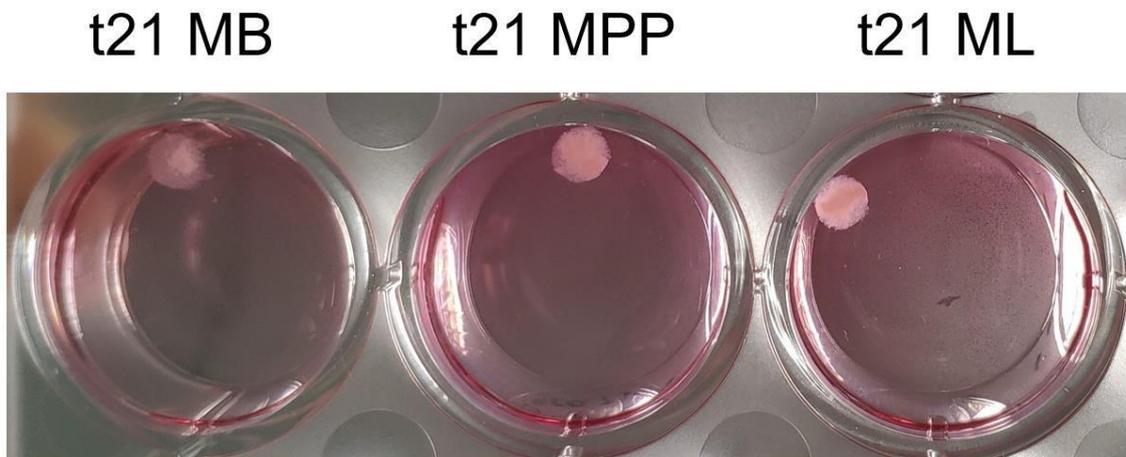


Figura 8. Esponjas de colágeno con diferentes medios y tras 21 días en cultivo. Se pueden apreciar las micromasas celulares y la presencia de MEC en las esponjas t21 MPP y t21 ML.

4.3 Análisis histomorfológico de los cortes de biomateriales

4.3.1 Criogel de ácido hialurónico

En los cortes de este biomaterial se observan fácilmente ciertas propiedades inherentes al mismo, como su alta porosidad y elevado tamaño de poro (Figura 9).

No se apreciaron diferencias entre el tiempo 0 (t0) ni entre tiempo 21 (t21) con los distintos medios de diferenciación (MB, ML y MPP).

No se observaron células retenidas en los biomateriales ni, por tanto, su diferenciación a condrocitos ni síntesis de MEC (Figura 9).

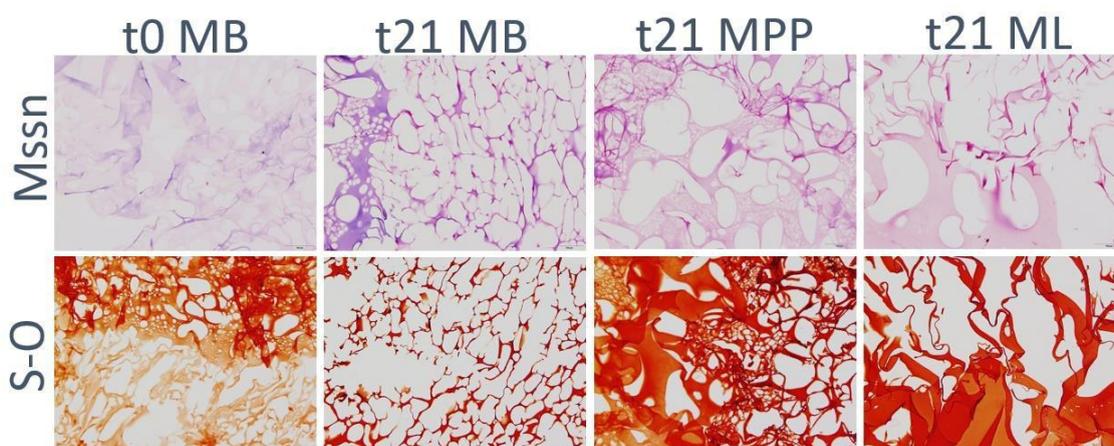


Figura 9. Fotografías con objetivo 10x de los cortes en microtomo del criogel de ácido hialurónico tras su siembra y cultivo a diferentes tiempos en diferentes medios de diferenciación condrogénica y con dos tinciones diferentes: Tricrómico de Masson (Mssn) y Safranina-O (S-O). Escala de 100 μ m.

4.3.2 Esponja de colágeno

En este biomaterial se observó que en los t0 de ambas tinciones se produjo retención celular en los poros. Aunque escasa, se apreció presencia de matriz extracelular en las muestras de biomateriales t21 MPP y t21 ML.

En las tinciones referentes al MB t21 se apreció una mayor proliferación celular que en el t0. Pero no se evidenció ni presencia de proteoglicanos (color rojo característico en la tinción de Safranina-O) ni de fibras de colágeno (tono azulado en el Tricrómico de Masson). Tampoco se constató una alta presencia de estas moléculas en la muestra MPP t21 ni en ML t21, pero sí se pudieron advertir zonas

donde el tono de la MEC fue más azulado en las tinciones de Tricrómico de Masson y más rojizo en las de Safranina-O (Figura 10).

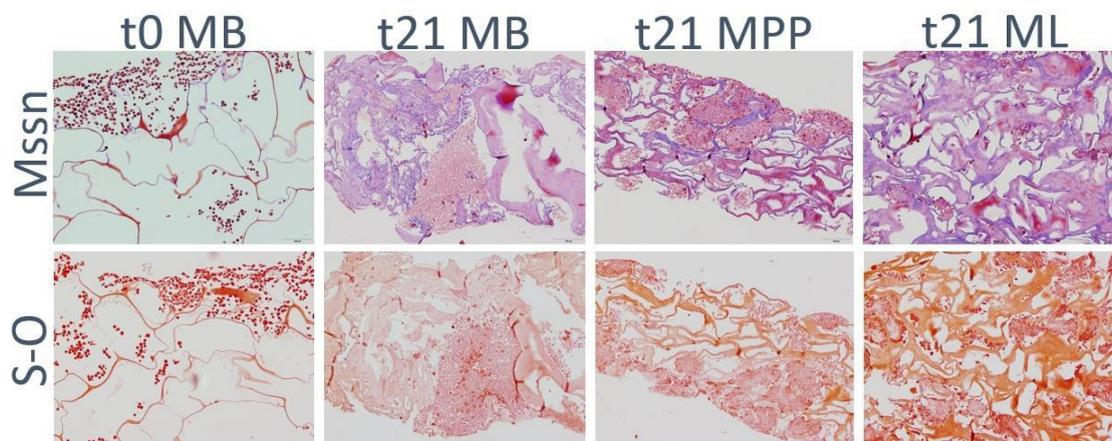


Figura 10. Fotografías con objetivo 10x de los cortes en microtomo de la esponja de colágeno tras su siembra y cultivo a diferentes tiempos en diferentes medios de diferenciación condrogénica y con dos tinciones diferentes: Tricrómico de Masson (Mssn) y Safranina-O (S-O). Escala de 100 μ m.

4.4 Análisis de la expresión génica

4.4.1 Concentraciones de ARN obtenidas

4.4.1.1 Mortero

Las concentraciones obtenidas con este método fueron más bajas de lo esperado y los resultados correspondientes a las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 distaron de sus valores óptimos, que serían 1,8 y 1,8-2,2 respectivamente (Tabla II).

Tabla II. Valores correspondientes a las concentraciones y relaciones de absorbancia obtenidas de las muestras trituradas con mortero.

	t0 MB	t21 MB	t21 MPP	t21 ML
[] (ng/ μ l)	35,3	33,0	14,4	29,3
Abs 260/280	1,59	1,59	1,78	1,88
Abs 260/230	0,58	0,32	0,75	0,72

4.4.1.2 Molino mezclador MM200

Las concentraciones obtenidas con este método fueron superiores a las obtenidas con el procedimiento que aplicaba el mortero y, a pesar de que las concentraciones 260/230 aún distan de sus valores óptimos, los resultados obtenidos con este tipo de trituración fueron mejores (Tabla III).

Tabla III. Valores correspondientes a las concentraciones y relaciones de absorbancia obtenidas de las muestras trituradas con molino mezclador MM200.

	t0 MB	t21 MB	t21 MPP	t21 ML
[] (ng/μl)	238,8	63,7	142,1	920,9
Abs 260/280	1,8	1,57	1,76	1,68
Abs 260/230	0,95	0,33	1,62	0,56

4.4.2 Análisis de los niveles relativos de expresión

Además de la expresión del gen *housekeeping* *YWHAZ* en casi todas las muestras, excepto en las referentes al t21 MB, se observó expresión del gen *SOX9* (Figura 11). Así, el único gen que mostró expresión relativa tras comparar su expresión con la del gen *housekeeping* *YWHAZ* fue el gen *SOX9*, obteniendo así para el t0 una media de la expresión relativa de $4,68 \pm 0,25$, para el t21 MPP de $0,54 \pm 0,28$, para el ML de $1,42 \pm 0,09$ y sin expresión relativa detectada para el MB.

Al comparar los valores de expresión relativa de *SOX9* en todas las muestras de t21 frente a las de t0, se obtuvo que en todos los casos hubo un detrimento significativo: de un 100% para el t21 MB ($p=0,012$), de un 88,51% para el t21 MPP ($p=0,0014$) y de un 69,64% para el t21 ML ($p=0,011$) (Figura 11). Se comprobó también que la mayor expresión relativa de *SOX9* en el t21 ML frente a la expresión relativa del t21 MPP fue significativa ($p=0,048$).

Al ser nula la expresión relativa de los genes *COL2A1* y *ACAN* se estudió la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de *SOX9* y estos genes para cada tiempo y medio empleado: así, se observó que las diferencias fueron significativas para el t0 ($p=0,012$) y para el t21 ML ($p=0,014$), mientras que para el t21 MB (el valor de la expresión relativa de *SOX9* también fue nulo) y para el t21 MPP ($p=0,11$) las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Esto pone también en duda la validez de la expresión de *SOX9* en el t21 MPP (Figura 11).

A partir de los valores obtenidos, no podemos concluir que exista diferenciación condrogénica de la línea 127TT *iMSC* ni tras el cultivo durante 21 días ni empleando diferentes medios de diferenciación condrogénica.

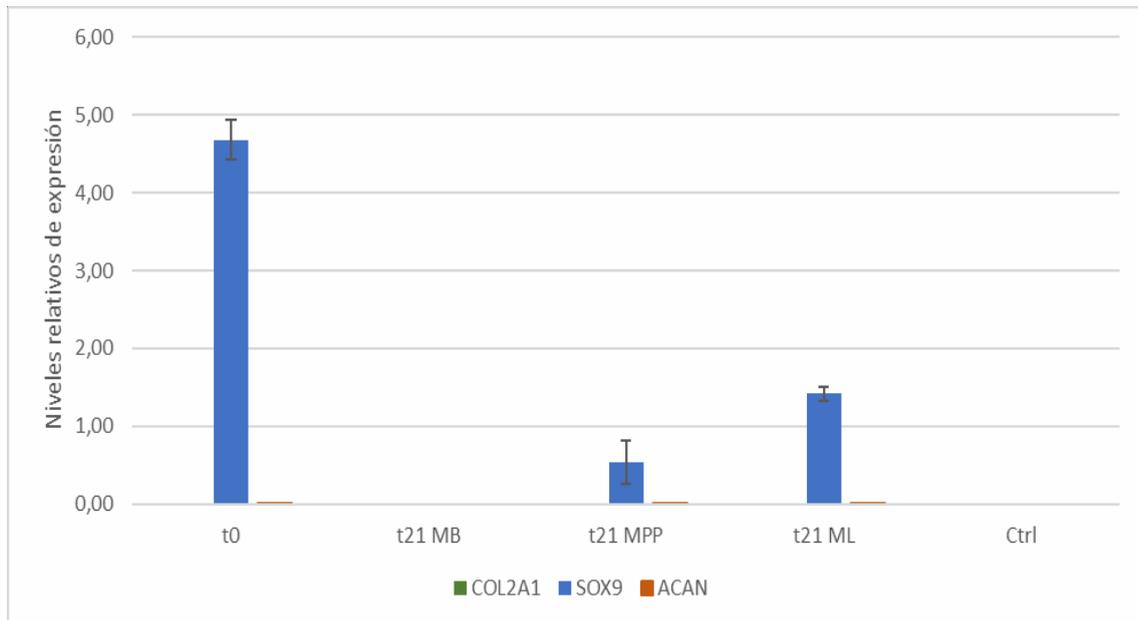


Figura 11. Niveles relativos de expresión de los genes COL2A1, SOX9 y ACAN frente al gen housekeeping YWHAZ.

5 Discusión

Las células de la línea 127TT *iMSC* obtenidas tras la descongelación mostraron una morfología fibroblástica similar a la obtenida con los cultivos primarios de *MSCs*. De acuerdo con estudios previos, la línea seleccionada es capaz de mantener su capacidad de diferenciación al triple linaje tras la inmortalización, a la vez que exhibe una mayor tasa de proliferación que los cultivos primarios de *MSCs* (33).

Los criogeles de ácido hialurónico presentan una amplia gama de aplicaciones potenciales gracias a su red estructural macroporosa, que permite el transporte efectivo de solutos macromoleculares. Estos materiales presentan importantes ventajas como su alta biocompatibilidad, resistencia y maleabilidad, permitiendo cambios en su composición según la función a la que vaya destinado (37). A pesar de que el criogel de ácido hialurónico mostró una elevada porosidad, apenas logró retener células en su estructura, impidiendo la comprobación del potencial de diferenciación de la línea 127TT *iMSC* en este biomaterial. La modificación de determinados parámetros en el proceso de síntesis, como el incremento de la concentración de producto metacrilado (37), podría ayudar a reducir el tamaño de poro, con el fin de conseguir una mayor retención celular en el interior de la matriz. Por otro lado, estudios realizados en otros biopolímeros obtuvieron mejores resultados de retención celular aplicando diferentes métodos de siembra celular, como es la siembra por perfusión, en lugar de la siembra convencional sobre la superficie del criogel (37,38). Los resultados obtenidos en estos estudios indican un éxito significativamente mayor en los biomateriales sembrados por perfusión frente a los sembrados por siembra en superficie convencional (38). De este modo, la optimización del proceso de siembra podría ayudar a facilitar la incorporación de las *iMSCs* en el interior del criogel.

Las esponjas de colágeno presentan un gran potencial en medicina regenerativa del cartílago articular debido a su capacidad de retención celular en su superficie y su posterior degradabilidad una vez sintetizada la matriz celular (39). En el análisis histomorfológico de las esponjas de colágeno se observó una adherencia de las células a la superficie, siendo más evidente en el t0 en la cara del biomaterial donde se sembraron estas. Con respecto a los t21, se observó la

expansión de las células en todos los medios empleados. En las muestras en las que se empleó MB para el cultivo, se mantuvo la morfología celular fibroblástica y no se sintetizó MEC. En los cortes realizados a los biomateriales cultivados con MPP y ML se apreció la presencia de MEC, o al menos lo que podría calificarse como un comienzo de síntesis de esta, presentando colágeno tipo II y proteoglicanos, sobre todo en las muestras cultivadas con ML. Estos resultados se fundamentan en el hecho de que tanto el ML y el MPP son medios de diferenciación condrogénica que presentan el factor de diferenciación *TGF-β3*, el cual es un factor de transformación que induce diferenciación condrogénica en *MSCs*. En contra, el MB consiste simplemente en medio de cultivo DMEM 10% que no induce diferenciación condrogénica (40).

Comparando los resultados obtenidos con estudios previos se observa que, a pesar de no ser demasiada, la MEC sintetizada y teñida con Safranina-O en los cortes de las esponjas de colágeno t21 MPP y t21 ML se asemeja a la sintetizada en las esponjas de colágeno de estos estudios (35,41). Si bien es cierto que la tinción del Tricrómico de Masson obtenida en los cortes del presente trabajo difiere del azul característico que presenta la MEC de las esponjas de colágeno al ser teñida con esta tinción, hay indicios de comienzo de síntesis de fibras de colágeno en las imágenes tomadas (35,41).

A pesar de todo lo mencionado anteriormente, los resultados del análisis de la expresión génica no resultaron ser nada esclarecedores para poder verificar la diferenciación condrogénica de las *iMSCs* y síntesis de MEC por parte de estas en las esponjas de colágeno. Los análisis mostraron que, a excepción del gen *housekeeping YWHAZ* y del gen *SOX9*, la expresión del resto de genes de estudio fue nula para todas las muestras. Tras la obtención de los datos de la expresión relativa y al comparar los niveles de *SOX9* en el t0 frente a los del t21 se observó que, contra todo pronóstico, la expresión relativa de *SOX9* se redujo significativamente del t0 al t21 en todas las muestras. Aunque en primera instancia esto debería indicar la presencia de una mayor diferenciación condrogénica en las muestras a t0, no tendría ningún sentido afirmar esto, ya que como se observó, en el t0 tan sólo existían células de la línea 127TT *iMSC* sembradas en el biomaterial, sin diferenciar. Todo esto nos lleva a pensar que, tal vez, en las muestras t0 al no estar las células tan adheridas al biomaterial

como en las otras muestras y/o al no llevar tanto tiempo cultivadas en la esponja de colágeno, la extracción de ARN dio mejor resultado en estas muestras frente a las demás. Otro hecho que podría respaldar esta teoría es que si elimináramos la expresión relativa de *SOX9* en el t0 observaríamos que los valores de los t21 (los cuales sí estuvieron el mismo tiempo de cultivo en las esponjas de colágeno) sí siguen un patrón esperado, es decir, una menor expresión en el t21 MB frente a una mayor expresión en los t21 MPP y t21 ML. Además, si comparamos la expresión relativa de *SOX9* en todos los tiempos y medios de diferenciación frente a la expresión relativa de *COL2A1* y *ACAN* (la cual resultó nula para ambos) podemos observar que tan sólo existen diferencias significativas en el t0 y el t21 ML, lo que pone aún más en duda la validez de los datos de la expresión relativa de *SOX9*.

Al comparar la expresión de *SOX9* en el t21 MPP y en el t21 ML se vio que, para el segundo, la expresión relativa del gen fue significativamente mayor. Sin embargo, debido a los datos atípicos obtenidos habría que repetir el experimento para confirmar estas observaciones. Asimismo, puesto que *SOX9* es un marcador temprano de condrogénesis (42), el estudio de su expresión a tiempos más cortos (por ejemplo 14 días) podría ayudar a entender estas observaciones, y detectar diferencias entre los medios utilizados.

La ausencia de expresión génica de agrecano y colágeno tipo II podrían deberse a un fallo en el protocolo de extracción del ARN de las matrices. En este sentido, futuros estudios deberían de encaminarse a la optimización de los protocolos de extracción de ARN de este tipo de biomateriales. Un ejemplo sería mantener el protocolo de trituración de los biomateriales con el molino mezclador MM200, en lugar de con un mortero convencional, pero optimizando los tiempos y pasos a seguir en la extracción.

En otros estudios de diferenciación condrogénica de *MSCs* en esponjas de colágeno en los que se realizó un análisis de la expresión génica midiendo los niveles relativos de expresión de *SOX9*, *COL2A1* y *ACAN*, entre otros, se obtuvo un incremento en los niveles relativos de expresión de todos los genes bajo estudio al cultivar los biomateriales sembrados con medios de diferenciación condrogénica. Asimismo, se observaron diferencias significativas claras entre las

muestras cultivadas a t0 (D0) y las cultivadas con medio de diferenciación condrogénica (con *BMP-2* y *TGF-β1*) (43). Esto evidencia aún más la idea de que los resultados obtenidos en el análisis de la expresión génica del presente trabajo distan de poder afirmar completamente la existencia de diferenciación condrogénica en las esponjas de colágeno tras 21 días en los medios de diferenciación condrogénica.

Está comprobado que otro tipo de factores, como el nivel de oxígeno durante el cultivo o ligeros cambios en la composición del biomaterial, pueden influir en los resultados obtenidos del proceso de diferenciación condrogénica (44,45). Con respecto a la presencia de oxígeno durante el cultivo de los biomateriales, existen estudios en los que se concluyó que gracias a la reducción del nivel de oxígeno de un 21% a un 5% en presencia del factor de diferenciación *TGF-β3* existió un incremento significativo en la síntesis de cartílago (44).

La mayor o menor expresión relativa de ciertos genes se ve influida también por la naturaleza del biomaterial en cuestión (45), por lo que el empleo de diferentes esponjas o geles en un futuro sería una opción a tener muy en cuenta.

Finalmente, cabe señalar que la repetición del cultivo de la línea 127TT *iMSC* y con un mayor número de réplicas o incluso la ampliación del tiempo en el que se mantienen los biomateriales en los diferentes medios, podría no sólo suponer resultados más precisos y esclarecedores en el análisis de la expresión génica, sino también mayor proliferación celular, diferenciación condrogénica y síntesis de MEC en el análisis histomorfológico.

6 Conclusiones

- Los criogeles de ácido hialurónico no permitieron la retención celular de la línea 127TT *iMSC*, ni por tanto su proliferación, diferenciación condrogénica y síntesis de MEC. Por el contrario, las esponjas de colágeno resultaron útiles como soportes, ya que permitieron la adherencia, proliferación, diferenciación condrogénica y síntesis de MEC de la línea 127TT *iMSC*.
- La línea celular 127TT *iMSC*, sembrada sobre las esponjas de colágeno, presentó capacidad de diferenciación condrogénica en los diferentes medios de diferenciación condrogénica utilizados (MPP y ML), siendo mayor a la observada en el control de células cultivadas en el MB.

7 Perspectivas futuras

- Ajustes en la composición, el tamaño de poro y el método de siembra en los criogeles deberían ser realizados en un futuro para aumentar la retención celular por parte de este.
- Repeticiones del cultivo en las esponjas de colágeno ajustando el protocolo de extracción de ARN y aumentando el tiempo que permanecen en los diferentes medios podrían generar mejores resultados en el análisis de la expresión génica.

8 Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis dos directoras, la Dra. Silvia Díaz Prado y la Dra. Ana Rey Rico, por comprometerse con este proyecto y ayudar a que saliera adelante.

Gracias también a la gente del INIBIC y a todo el grupo TCMR: a Clara, a María, a Natalia, a Ángela, a Juan y, sobre todo, a Silvia por ayudarme durante todo este TFM, por tener paciencia con mis “lunes” en el laboratorio, por andar siempre pendiente de mandar correos y noticias interesantes y por el magnesio en el Hangar 4.

Agradecer a mis compañeras de máster por hacer que este curso pareciera una semana, y a mis familiares y amigos por estar siempre en las buenas y en las malas, se os quiere.

Finalmente, muchas gracias a ti también por haber encontrado este TFM y llegado hasta este punto. Espero que te pudiera ser de ayuda.

9 Bibliografía

1. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage [Internet]. Vol. 36, Clinics in Sports Medicine. W.B. Saunders; 2017 [cited 2021 Feb 8]. p. 413–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278591917300030>
2. Gomoll AH, Minas T. The quality of healing: Articular cartilage. Wound Repair Regen [Internet]. 2014 May 1 [cited 2021 Feb 8];22:30–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/wrr.12166>
3. Blanco García FJ, Cañete Crespillo JD, Pablos Álvarez JL directores. Técnicas de Investigación Básica en Reumatología. Madrid: Sociedad Española de Reumatología: Panamericana; 2007. 400 p.
4. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis [Internet]. Vol. 7, Nature Reviews Rheumatology. Nature Publishing Group; 2011 [cited 2021 Feb 13]. p. 50–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2010.198>
5. Ichimura S, Wu JJ, Eyre DR. Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. Arch Biochem Biophys. 2000 Jun 1;378(1):33–9.
6. Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasher A, et al. The minor collagens in articular cartilage [Internet]. Vol. 8, Protein and Cell. Higher Education Press; 2017 [cited 2021 Feb 13]. p. 560–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28213717/>
7. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis [Internet]. Vol. 23, Current Opinion in Rheumatology. NIH Public Access; 2011 [cited 2021 Feb 15]. p. 471–8. Available from: </pmc/articles/PMC3937875/>
8. Negri S, Farinato S, Fila C, Pagliaro P, Bellomi A, Bellomi • A, et al. Tissue engineering: chondrocyte cultures on type I collagen support. Cytohistological and immunohistochemical study. Springer [Internet]. 2007 [cited 2021 Feb 15];8:57–63. Available from: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.c

om/content/pdf/10.1007/s10195-007-0169-6.pdf&casa_token=EhBqkgHkUo0AAAAA:kzWcx3Eq-PSgMSsfwgoM44_7c40IEYUFEf9z39xt1kLKUhKa06ZBpRjXztqF5wwq95blnOEzePiiV-E

9. Medvedeva E V., Grebenik EA, Gornostaeva SN, Telpuhov VI, Lychagin A V., Timashev PS, et al. Repair of damaged articular cartilage: Current approaches and future directions [Internet]. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018 [cited 2021 Feb 8]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30103493/>
10. SMART - Servier Medical ART [Internet]. [cited 2021 Mar 21]. Available from: <https://smart.servier.com/>
11. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use [Internet]. Vol. 23, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2015 [cited 2021 May 29]. p. 1233–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25865392/>
12. Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, Anthony JM, Zhang Y, Wilson PWF, et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham study. Am J Public Health [Internet]. 1994 Oct 7 [cited 2021 Feb 16];84(3):351–8. Available from: <http://ajph.aphapublications.org/>
13. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis [Internet]. Vol. 24, Clinics in Sports Medicine. W.B. Saunders; 2005 [cited 2021 Feb 16]. p. 1–12. Available from: <http://www.sportsmed.theclinics.com/article/S0278591904000948/fulltext>
14. Claus S, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, et al. Cartilage-Characteristic Matrix Reconstruction by Sequential Addition of Soluble Factors During Expansion of Human Articular Chondrocytes and Their Cultivation in Collagen Sponges. Tissue Eng Part C Methods [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2021 Feb 16];18(2):104–12. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tec.2011.0259>

15. Sakalauskienė G, Jauniškienė D. Osteoarthritis: etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 2010 Nov 13 [cited 2021 Feb 16];46(11):790. Available from: <http://www.mdpi.com/1010-660X/46/11/790>
16. Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review [Internet]. Vol. 325, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2021 [cited 2021 May 24]. p. 568–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33560326/>
17. Fuentes-Boquete IM, del Carmen Arufe Gonda M, Díaz Prado SM, Hermida Gómez T, de Toro Santos FJ, Blanco García FJ. Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatol Clínica*. 2007 Oct 1;3:S63–9.
18. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Oct 6 [cited 2021 Feb 17];331(14):889–95. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199410063311401>
19. Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2021 Feb 17];81-B(6):1064–8. Available from: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/abs/10.1302/0301-620X.81B6.0811064>
20. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. Two-to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2000 May [cited 2021 Feb 17];374(374):212–34. Available from: <http://journals.lww.com/00003086-200005000-00020>

21. Roberts S, Hollander AP, Caterson B, Menage J, Richardson JB. Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2021 Feb 17];44(11):2586–98. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131\(200111\)44:11%3C2586::AID-ART439%3E3.0.CO;2-I](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(200111)44:11%3C2586::AID-ART439%3E3.0.CO;2-I)
22. Oggu GS, Sasikumar S, Reddy N, Ella KKR, Rao CM, Bokara KK. Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity [Internet]. Vol. 13, *Stem Cell Reviews and Reports*. Humana Press Inc.; 2017 [cited 2021 Jan 21]. p. 725–40. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-017-9760-2>
23. Lanza R, Langer R, Vacanti J, Atala A. *Principles of tissue engineering*. 2020 [cited 2021 Feb 18]; Available from: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Fz_ZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Principles+of+Tissue+Engineering+Robert+Lanza,+Robert+Langer,+Joseph+P.+Vacanti,+Anthony+Atala&ots=UGanWbG13R&sig=uc hqc8-pkgjiLGPs5Wl1QygcDAo
24. Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Toneguzzi S, Grassi F, Cavallo C, et al. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. *Biomaterials*. 2005 Oct 1;26(28):5677–86.
25. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. In: *European Spine Journal* [Internet]. Springer; 2008 [cited 2021 Feb 20]. p. 467–79. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00586-008-0745-3>
26. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE. Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 26 [cited 2021 May 24];26(9):2518. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2518>

27. Weißenberger M, Weißenberger MH, Wagenbrenner M, Heinz T, Reboredo J, Holzapfel BM, et al. Different types of cartilage neotissue fabricated from collagen hydrogels and mesenchymal stromal cells via SOX9, TGFB1 or BMP2 gene transfer. PLoS One [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Mar 21];15(8 August). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32790806/>

28. Fan C, Ling Y, Deng W, Xue J, Sun P, Wang DA. A novel cell encapsulatable cryogel (CECG) with macro-porous structures and high permeability: A three-dimensional cell culture scaffold for enhanced cell adhesion and proliferation. Biomed Mater [Internet]. 2019 Jul 19 [cited 2021 Feb 20];14(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31269472/>

29. Kao HH, Kuo CY, Chen KS, Chen JP. Preparation of gelatin and gelatin/hyaluronic acid cryogel scaffolds for the 3D culture of mesothelial cells and mesothelium tissue regeneration. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Sep 2 [cited 2021 May 24];20(18). Available from: </pmc/articles/PMC6770111/>

30. Nakamura R, Katsuno T, Kitamura M, Yamashita M, Tsuji T, Suzuki R, et al. Collagen sponge scaffolds containing growth factors for the functional regeneration of tracheal epithelium. J Tissue Eng Regen Med [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 May 24];13(5):835–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30808067/>

31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2021 Feb 20];8(4):315–7. Available from: <http://www.isct-cytotherapy.org/article/S1465324906708817/fulltext>

32. Frisch J, Venkatesan J, Rey-Rico A, Madry H, Cucchiarini M. Current Progress in Stem Cell-Based Gene Therapy for Articular Cartilage Repair. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015 Jan 14 [cited 2021 Feb 20];10(2):121–31. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-888X&volume=10&issue=2&spage=121>
33. Piñeiro-Ramil M, Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Rodríguez-Fernández S, Hermida-Gómez T, Blanco-García FJ, et al. Immortalizing Mesenchymal Stromal Cells from Aged Donors while Keeping Their Essential Features. *Stem Cells Int* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 17];2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32612662/>
34. Cheng L, Ji K, Shih TY, Haddad A, Giatsidis G, Mooney DJ, et al. Injectable Shape-Memorizing Three-Dimensional Hyaluronic Acid Cryogels for Skin Sculpting and Soft Tissue Reconstruction. *Tissue Eng - Part A* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Jun 1];23(5–6):243–51. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2016.0263>
35. Sanjurjo-Rodríguez C, Helvia Martínez-Sánchez A, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S, Blanco FJ, et al. Differentiation of human mesenchymal stromal cells cultured on collagen sponges for cartilage repair Histology and Histopathology From Cell Biology to Tissue Engineering. *Both Authors Contrib Equal *Histol Histopathol* [Internet]. 2016 [cited 2021 May 31];31:1221–39. Available from: <http://www.hh.um.es>
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
37. Razavi M, Qiao Y, Thakor AS. Three-dimensional cryogels for biomedical applications [Internet]. Vol. 107, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. John Wiley and Sons Inc.; 2019 [cited 2021 Jun 16]. p. 2736–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.36777>

38. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2003 Oct 20 [cited 2021 Jun 19];84(2):205–14. Available from: www.interscience.wiley.com
39. Claus S, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, et al. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng - Part C Methods* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2021 Jun 16];18(2):104–12. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2011.0259>
40. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001 Aug 15;268(2):189–200.
41. Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro FJ, Blanco FJ, et al. Human cartilage engineering in an In Vitro repair model using collagen scaffolds and mesenchymal stromal cells. *Int J Med Sci* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2021 Jun 19];14(12):1257–62. Available from: [/pmc/articles/PMC5666559/](http://pmc/articles/PMC5666559/)
42. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, De Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* [Internet]. 1999 [cited 2021 Jun 16];22(1):85–9. Available from: https://www.nature.com/articles/ng0599_85
43. Gómez-Leduc T, Hervieu M, Legendre F, Bouyoucef M, Gruchy N, Poulain L, et al. Chondrogenic commitment of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in collagen matrices for cartilage engineering. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2021 Jun 19];6(1):1–17. Available from: www.nature.com/scientificreports

44. Co C, Vickaryous MK, Koch TG. Membrane culture and reduced oxygen tension enhances cartilage matrix formation from equine cord blood mesenchymal stromal cells invitro. *Osteoarthr Cartil.* 2014 Mar 1;22(3):472–80.
45. Freyria AM, Ronzière MC, Cortial D, Galois L, Hartmann D, Herbage D, et al. Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type i or type II collagen scaffolds. *Tissue Eng - Part A* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2021 Jun 21];15(6):1233–45. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2008.0114>